



ARTÍCULO ORIGINAL

Distribución y estado de maduración de células dendríticas y activación de linfocitos CD4+ en adenocarcinoma prostático

Torres Salazar J.J.,¹ Sánchez González D.J.,² López Rivera M.G.,³ Corona Perezgrovas M.A.³

RESUMEN

Introducción: La inmunidad celular juega un papel muy importante en la respuesta antitumoral, y las células dendríticas son las encargadas de iniciar esta respuesta mediante activación de linfocitos. No se conoce la relación que existe entre la distribución y estado de maduración de células dendríticas y el estado de activación de los linfocitos CD4+ en el adenocarcinoma prostático.

Objetivos: Establecer relación entre distribución y estado de maduración de células dendríticas y cantidad de linfocitos CD4+ en adenocarcinoma prostático e hiperplasia prostática benigna (HPB).

Metodología: Se utilizaron 20 tejidos prostáticos incluidos en parafina del 2000 al 2002: 15 con adenocarcinoma de próstata y 5 con HPB como grupo control. Se procesaron mediante inmunohistoquímica indirecta de dos pasos, utilizando anticuerpos contra CD1a, CD83, CD4 y DC-SIGN.

Resultados: Existe aumento en la expresión intratumoral de CD1a y DC-SIGN ($p < 0.001$) al comparar Gleason 8-9 con 5-6. Existe aumento en la expresión intratumoral de DC-SIGN ($p < 0.01$) al comparar Gleason 8-9 con 2-4. Se observó mayor

SUMMARY

Introduction: The cellular immunity plays a very important role in the antitumorlike answer and the dendritic cells are the ones in charge to initiate this answer by means of activation of lymphocytes. The relation is not known that exists between the distribution and state of maturation of dendritic cells and the state of activation of lymphocytes CD4+ in adenocarcinoma prostate.

Objectives: To establish the relation between distribution and mature state of dendritic cells and CD4+ lymphocytes in prostatic adenocarcinoma and benign prostatic hyperplasia (BPH).

Material and methods: We used 20 paraffin embedded prostatic tissues since 2000 until 2002: 15 were prostatic adenocarcinomas and 5 BPH as control group. They were processed by two steps indirect immunohistochemistry, using antibodies against CD1a, DC-SIGN, CD83 and CD4.

Results: There was an increased intratumoral expression of CD1a and DC-SIGN ($p < 0.001$) in the comparison between Gleason 8-9 versus 5-6. There was an increased intratumoral expression of DC-SIGN ($p < 0.01$) in the comparison between Gleason 8-9 versus 2-4. An increased intratumoral

1 Jefe del Departamento de Urología, Hospital Central Militar. 2 Jefe del Laboratorio de Histología y profesor titular del curso de Histología, Escuela Médico Militar. 3 Residente Rotatorio de segundo año, Hospital Central Militar.

Correspondencia: Miguel Corona Perezgrovas. Presa Salinillas UH Loma Hermosa, edif. 10-A, depto. 304, Col. Loma Hermosa, Delegación Miguel Hidalgo, México, DF. Tel.: 5557-0750; celular: 044(55) 1948-3348. Correo electrónico: gualori@hotmail.com.

expresión intratumoral que peritumoral de CD1a y DC-SIGN en Gleason 8-9 ($p < 0.05$). No se encontró marca específica para CD83. Se encontró marca específica para CD4 en 5 laminillas ($p < 0.05$).

Conclusiones: La expresión de CD1a y DC-SIGN no aumenta de manera progresiva en relación con el grado histológico del adenocarcinoma prostático. Se demostró la coexpresión de CD1a y DC-SIGN. No se observó relación entre células dendríticas y linfocitos CD4. No es suficiente el uso de CD1a y DC-SIGN como únicos criterios para identificar células dendríticas.

Palabras clave: células dendríticas, cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, inmunohistoquímica, CD1a, DC-SIGN, CD83, CD4.

CD1a and DC-SIGN expression was observed at 8-9 Gleason in comparison with peritumoral areas ($p < 0.05$). There was no expression found with CD83. It was found expression of CD4 in 5 slides.

Conclusions: *The CD1a and DC-SIGN expression does not increase progressively in relation of prostatic adenocarcinoma histologic grade. It was demonstrated the co-expression of CD1a and DC-SIGN. There was not observed any relation between dendritic cells and CD4 lymphocytes. It's not enough to use CD1a and DC-SIGN as unique criteria to identify dendritic cells.*

Key words: *dendritic cells, prostatic cancer, benign prostatic hyperplasia, immunohistochemistry, CD1a, CD83, DC-SIGN, CD4.*

INTRODUCCIÓN

La próstata es la glándula sexual más grande del hombre, pesa 20 gramos y carece de cápsula bien definida, lo que facilita la diseminación del cáncer. El cáncer de próstata es predominantemente una neoplasia que se presenta en hombres de edad avanzada. En México, este tipo de cáncer ocupa el segundo lugar de frecuencia en hombres después del cáncer de piel y la segunda causa de muerte.^{1,2}

El adenocarcinoma acinar conforma 95% del total de casos y el 5% restante corresponde a diversos tipos como: ductal, carcinosarcoma, mucinoso, de células escamosas y de células transicionales;² 75% de los pacientes con enfermedad localizada en la glándula desarrollarán extensión local en el curso de diez años y 65% de ellos muere por esta causa; 50% de los pacientes con enfermedad metastásica fallece por la enfermedad antes de tres años.

Por lo general, las células tumorales expresan moléculas alteradas o que normalmente no se expresan; estas moléculas pueden funcionar como antígenos tumorales que son reconocidos por el sistema inmune.

Las células dendríticas son las más potentes células presentadoras de antígenos (CPAs) descritas a la fecha; están distribuidas ampliamente en diferentes órganos y tejidos y juegan un papel

clave en la respuesta inmune, ya que son las únicas CPAs especializadas en estimular a los linfocitos T vírgenes (linfocitos encargados de la inmunidad celular), en una respuesta primaria, debido a su capacidad de expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y II; moléculas coestimuladoras y de adhesión (CD40, CD80, CD83, CD54, CD58, CD209, entre otras), así como la producción de citocinas (IL-12, IL-1, TNF-alfa, etcétera).³⁻⁶

Las células dendríticas constituyen un complejo sistema de células hábiles para inducir respuestas primarias inmunes. Las células madres de estas células en la médula ósea dan vida a precursores sanguíneos que llegan a los tejidos, donde se establecen como células inmaduras con gran capacidad fagocítica. Cuando se enfrentan por primera vez a antígenos extraños, estas células se activan y procesan dicho antígeno para presentárselo a los linfocitos T, los cuales a su vez inician una respuesta inmunológica en contra de dicho antígeno.⁷⁻¹²

Las moléculas de superficie celular (proteínas que se encuentran ancladas a la membrana celular) que se estudiaron en esta investigación fueron: CD1a, estructuralmente similar al complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC 1), se expresa

en timocitos CD4+, CD8+ (linfocitos inmaduros) y células dendríticas inmaduras. DC-SIGN (CD 209), que es un receptor de manosa que pertenece a la superfamilia de las lectinas tipo C y sirve de unión a las células endoteliales; su expresión es exclusiva de células dendríticas. CD83 (HB15) pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y se expresa en células dendríticas activadas o maduras. CD4 es un marcador de superficie de linfocitos T colaboradores.^{13-15,17,18}

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Establecer la relación entre la distribución y estado de maduración de las células dendríticas, así como la cantidad de linfocitos CD4+ en los diferentes estadios del adenocarcinoma prostático, ya que la inmunidad celular representa un factor clave en la respuesta antitumoral y las células dendríticas son las encargadas de iniciar esta respuesta mediante la activación de linfocitos. No se conoce la relación que existe entre la distribución y el estado de maduración de las células dendríticas y la cantidad de linfocitos CD4+ en el cáncer de próstata, por lo que, para investigar dicha relación, diseñamos un estudio de expresión génica en su segundo nivel (traducción de la proteína), mediante inmunohistoquímica.

METODOLOGÍA

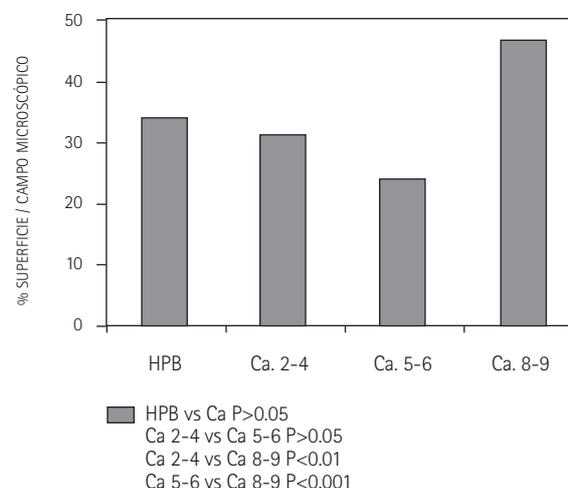
Se tomaron del archivo de Patología del Hospital Central Militar todos los tejidos prostáticos incluidos en parafina del 2000 al 2002, obtenidos mediante prostatectomía radical con los diagnósticos histopatológicos de cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna (HPB), corroborados por dos patólogos. Para la selección de la muestra se formó el grupo de casos de 15 bloques con el diagnóstico de cáncer de próstata: cinco bien diferenciados, cinco moderadamente diferenciados y cinco mal diferenciados, así como un grupo control con HPB. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica sencilla indirecta de dos pasos, en el laboratorio de la Escuela Médico Militar, utilizando los anticuerpos contra las proteínas CD1a, CD83, CD4 y DC-SIGN.

RESULTADOS

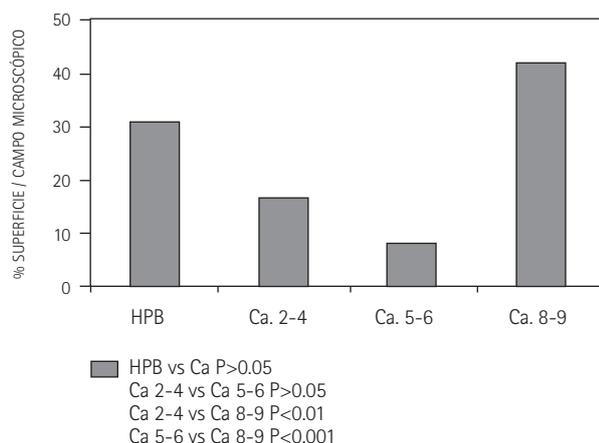
Expresión de CD1a y DC-SIGN

Se procesaron las muestras con técnica de inmunohistoquímica indirecta de dos pasos y en todas las muestras se encontró un patrón similar para la expresión de CD1a y DC-SIGN intratumoral. Para CD1a, el porcentaje de superficie marcada por campo microscópico 20x, para el grupo de Gleason 2-4, varió de un mínimo de 18.42% a un máximo de 57.82%, con una media de 28.2% y un promedio de 31.72%. Para el Gleason 5-6, varió la expresión de un mínimo de 10.33% a un máximo de 40.02%, con una media de 26.66% y un promedio de 24.17%. Para el Gleason 8-9, varió la expresión de un mínimo de 21.98% a un máximo de 69.54%, con una media de 47.28% y un promedio de 47.28% (Gráfica 1).

Los valores encontrados para DC-SIGN fueron: para el grupo de Gleason 2-4, varió de un mínimo de 2.37% a un máximo de 33.07%, con una media de 16.39% y un promedio de 16.86%. Para el Gleason 5-6, varió la expresión de un mínimo de 0.11% a un máximo de 34.33%, con una media de 2.12% y un promedio de 8.26%. Para el Gleason 8-9, varió la expresión de un mínimo de 10.27% a un máximo de 83.93%, con una media de 36.30% y un promedio de 41.87% (Gráfica 2).



Gráfica 1. Porcentaje de superficie con marca específica para CD1a por campo microscópico (200x), comparando los diferentes estadios del adenocarcinoma prostático y el grupo control con hiperplasia prostática benigna.



Gráfica 2. Porcentaje de superficie con marca específica para DC-SIGN por campo microscópico (200x), comparando los diferentes estadios del adenocarcinoma prostático y el grupo control con hiperplasia prostática benigna.

De igual forma, se encontró marca específica tanto para CD1a como para DC-SIGN en tejido peritumoral, con distribuciones similares orientadas hacia la luz de los conductos glandulares y con morfología epitelial. El porcentaje de superficie marcada para CD1a en el tejido peritumoral para el grupo de Gleason 2-4, varió de un mínimo de 23.13% a un máximo de 58.47%, con una media de 35.96% y un promedio de 37.23%. Para el Gleason 5-6, varió la expresión de un mínimo de 19.76% a un máximo de 55.65%, con una media de 32.40% y un promedio de 33.58%. Para el Gleason 8-9, varió la expresión de un mínimo de 12.81% a un máximo de 61.11%, con una media de 29.77% y un promedio de 31.67%.

El porcentaje de superficie marcada para DC-SIGN en el tejido peritumoral arrojó los siguientes resultados: para el grupo de Gleason 2-4, varió de un mínimo de 0.76% a un máximo de 61.07%, con una media de 43.12% y un promedio de 36.46%. Para el Gleason 5-6, varió la expresión de un mínimo de 0.39% a un máximo de 27.62%, con una media de 7.23% y un promedio de 9.18%. Para el Gleason 8-9, varió la expresión de un mínimo de 0.02% a un máximo de 28.94%, con una media de 1.23% y un promedio de 5.87% (Figuras 1 y 2).

El grupo de hiperplasia prostática benigna también presentó marca específica en todas las laminillas, tanto para CD1a como para DC-SIGN. Se encontró para CD1a un valor mínimo de 1.61% y un valor máximo

de 60.64%, con una media de 41.72% y un promedio de 34.31%. Con el anticuerpo para DC-SIGN se encontró un valor mínimo de 8.32 y un valor máximo de 56.93%, con media de 32.03% y promedio de 30.85%.

Expresión de CD83

Nuestra siguiente búsqueda fue para determinar si existen células dendríticas maduras, ya sea infiltrando el tumor o en la periferia. Se estableció que una célula dendrítica es madura cuando expresa la proteína CD83. No se encontró la expresión de CD83 en ningún caso ni intra ni peritumoral, como tampoco se encontró marca en el grupo control de hiperplasia prostática benigna.

Expresión de CD4

Se buscó la expresión de CD4 y se encontró marca específica en cinco laminillas de los 15 casos, de las cuales tres corresponden al grupo de Gleason 8-9, con un valor mínimo de 3.35% y un valor máximo de 16.23%, una media de 7.55% y un promedio de 10.14%. Una sola laminilla de los casos de Gleason 5-6 resultó positiva al marcaje para CD4 y se obtuvo un valor mínimo de 2.13%, un valor máximo de 5.84%, media de 3.98% y promedio de 3.98%. Una laminilla resultó positiva dentro del estadio Gleason 2-4, con un valor mínimo de 2.21%, máximo de 2.4%, media de 2.3% y un promedio de 2.3%. No se encontró marca específica en los controles de hiperplasia prostática benigna (Figura 3).

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, se pudo observar un aumento significativo en la expresión de CD1a ($p < 0.001$) y DC-SIGN ($p < 0.001$) dentro del adenocarcinoma prostático con Gleason 8-9 en relación con el grupo de Gleason 5-6. En la comparación de las áreas intratumorales de los Gleason 2-4 y 8-9 se observó un aumento significativo en este último ($p < 0.01$) de la expresión de DC-SIGN.

La expresión de ambos anticuerpos nos podría sugerir la presencia de células dendríticas inmaduras; sin embargo, la marca se observa distribuida en las células tumorales que se encuentran orientadas hacia la luz de los conductos glandulares, con morfología epitelial. Esta marca se observa en los estadios de Gleason bien y moderadamente

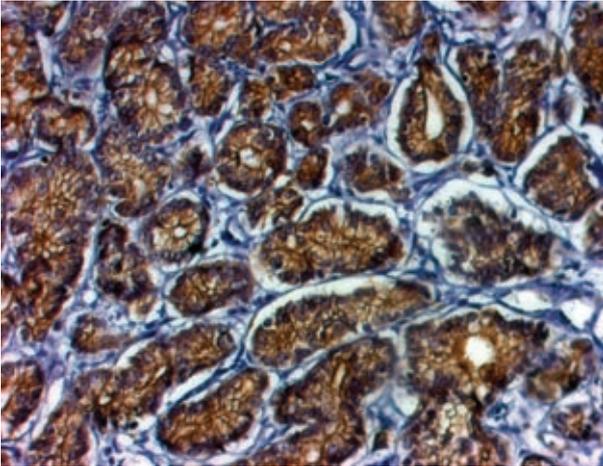


Figura 1. Microfotografía de adenocarcinoma prostático, donde se observa el epitelio glandular intensamente positivo para CD1a de color café tabaco. En esta imagen no se observan células dendríticas con su morfología clásica estrellada con prolongaciones citoplásmicas. El resto del tejido está contrateñido con hematoxilina en color azul-morado (200x).

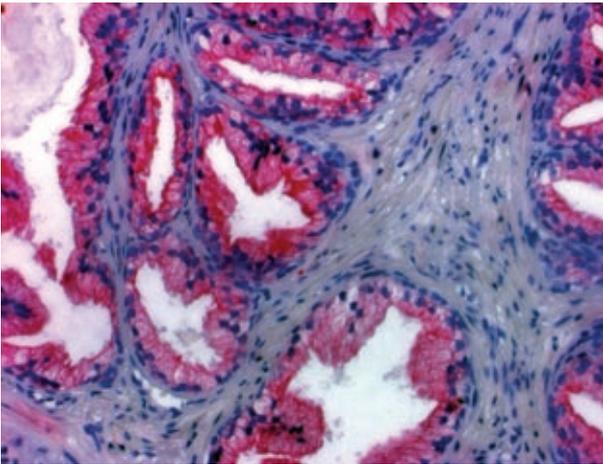


Figura 2. Microfotografía de adenocarcinoma de próstata, donde se observa el epitelio glandular positivo para DC-SIGN de color rojizo de menor intensidad en relación con CD1a, lo que se traduce en menor cantidad de proteínas presentes; sin embargo, el patrón de expresión en ambas proteínas es similar con ausencia de células dendríticas de morfología clásica. El resto del tejido está contrateñido con hematoxilina en color azul-morado (200x).

diferenciados, así como en la hiperplasia prostática benigna, mientras que en el Gleason poco diferenciado se encontró una distribución más heterogénea debido a la pérdida estructural del tejido.

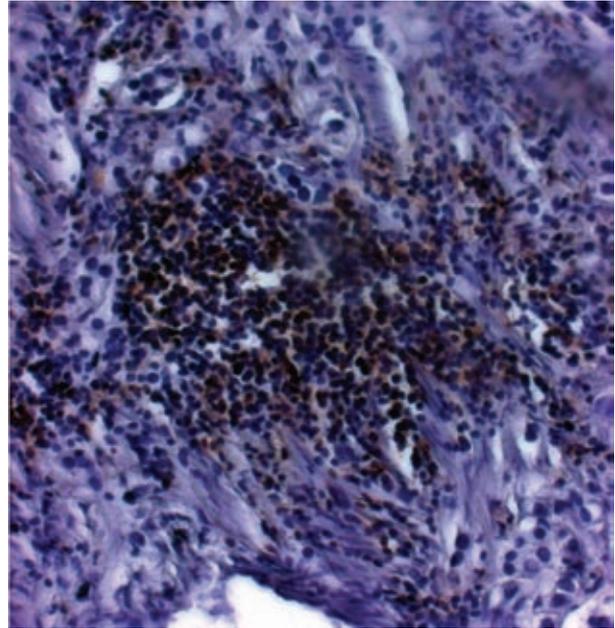


Figura 3. Microfotografía de adenocarcinoma prostático Gleason 8-9, donde se observa la presencia de marcaje específico para CD4, en color café tabaco, en células con morfología de linfocitos, en la región peritumoral. El resto del tejido contrateñido con hematoxilina en azul-morado (200x).

Al comparar los nidos de adenocarcinoma contra las áreas peritumorales dentro del grupo de Gleason 8-9, también se observó un aumento en relación con estas últimas que fue estadísticamente significativo para la expresión de ambos anticuerpos con una $p < 0.05$ para CD1a y una $p < 0.001$ para DC-SING. De existir una morfología de células dendríticas, con este resultado podríamos pensar en un aumento en el reclutamiento e infiltración tumoral de células dendríticas maduras, pero la morfología epitelial y la marca específica en estas células neoplásicas nos sugiere de manera más importante que dicho aumento pueda deberse al mayor número de células neoplásicas que normalmente se observa en este estadio.

En el resto de las comparaciones, en la expresión de CD1a y DC-SING no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las áreas peritumorales e intratumorales de los estadios de Gleason 2-4 y 5-6 ni en la comparación del grupo control de HPB con las áreas intratumorales de los estadios de Gleason 2-4, 5-6 y 8-9.

Expresión de CD83

Por medio de inmunohistoquímica indirecta de dos pasos se buscó la expresión de CD83, que se considera un marcador específico para células dendríticas; se utilizaron como control positivo cortes de ganglio linfático. No se encontró marca específica en ninguna laminilla tanto de cáncer como de HPB; sin embargo, en el control positivo de ganglio linfático se encontró marca específica para este anticuerpo (Figura 3), lo cual nos confirma que la técnica inmunohistoquímica fue adecuada y que en realidad no existen células dendríticas maduras dentro del tejido prostático estudiado.

Expresión de CD4

Se determinó la expresión de CD4 por medio de inmunohistoquímica indirecta de dos pasos. De las 20 muestras analizadas (una por paciente) se encontró marca específica en cinco de ellas, de las cuales tres correspondieron al grupo de Gleason 8-9, una laminilla para el grupo de Gleason 5-6 y una para el grupo de Gleason 2-4. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido, tal vez, al pequeño tamaño de la muestra en el que se encontró marca. Dicha marca se encontró en el tejido peritumoral en áreas pequeñas bien definidas, formadas por células que morfológicamente parecen corresponder a linfocitos. Esto nos sugiere la presencia de linfocitos T CD4 infiltrando el tejido peritumoral.

CONCLUSIONES

Con base en nuestros objetivos y con los resultados obtenidos, podemos concluir que en nuestro estudio:

- La expresión de CD1a es mayor en el tejido tumoral con Gleason 8-9 respecto al resto de los estadios e hiperplasia prostática benigna.
- La expresión de CD1a no aumenta de manera progresiva en relación con el grado histológico del adenocarcinoma prostático.
- La expresión de DC-SING es mayor en el tejido tumoral en Gleason 8-9 respecto al resto de los estadios e hiperplasia prostática benigna.
- La expresión de DC-SING no aumenta de manera progresiva en relación con el grado histológico del adenocarcinoma prostático.

- Por medio de la técnica de inmunohistoquímica indirecta de dos pasos con doble tinción se demostró la coexpresión de Cd1a y DC-SING.
- No se pudo observar la relación entre células dendríticas y linfocitos CD4.
- No es suficiente el uso de CD1a y DC-SIGN como únicos criterios para identificar células dendríticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Herrera GA. Manual de Oncología: Procedimientos Médico-Quirúrgicos 2ª ed., Mc Graw-Hill Interamericana, 2003:584-6.
2. Tanagho EA, McAninch JW. Urología General de Smith. 12ª ed., Manual Moderno, 2001:399-420.
3. Stites DP, Abba IT, Parslow TG. Inmunología básica y clínica 9ª ed., Manual Moderno, 1998:725-36.
4. Belz GT, Heath WR, Carbone FR. The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol Cell Biol.* 2002;80:463-8.
5. Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of Tolerance by IL-10-Treated Dendritic Cells. *J Immunol.* 1997;159(10):4772-80.
6. Pardoll D. T cells and tumors. *Nature.* 2001;411:1010-2.
7. Peralta-Zaragoza O, Lagunas M, Madrid V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública de México.* 2001;43:340-50.
8. Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, et al. Dendritic Cells Capture Killed Tumor Cells and Present Their Antigens to Elicit Tumor Specific Immune Responses. *J Immunol.* 2000;165:3797-803.
9. Kumamoto T, Huang EK, Paek HJ. Induction of Tumor-specific protective immunity by in situ Langerhans cell vaccine. *Nat Biotechnol.* 2002;20(1):64-9.
10. Ávila MF, Sánchez TC. Alteración en la diferenciación de células dendríticas inmaduras humanas por adenocarcinomas pulmonares. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2002;15:135-142.
11. Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392:245-52.
12. Park SH, Bendelac A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature.* 2000;406:788-92.
13. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human CD25 CD4 T Regulatory Cells Suppress Naïve and Memory T Cell Proliferation and Be Expanded *In Vitro* without Loss of Function. *J Exp Med.* 2001;193:1295-1301.

14. Kazuo Sugamura T. Proteins Reviews CD25. *Blood* 2002;96:4272-82.
15. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA et al. Prevalence of Regulatory T Cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 2002;169:2756-61.
16. Coventry BJ, Lee PL, Gibbs D, Hart DN. Dendritic cell density and activation status in human breast cancer CD1a, CMRF-44, and CD83 expression. *British Journal of Cancer.* 2002;86:546-51.
17. Tjoa BA, Murphy G. Progress in active Specific Immunotherapy of Prostate Cancer. *Semin Surg Oncol.* 2000;18:80-7.
18. Boenisch T. Manual de métodos inmunohistoquímicos de coloración. DAKO Corporation, 3^{ra} ed. 2002:20-30.