

EXPRESIA MOLECULELOR HLA DR ÎN TUMORILE MALIGNE TIROIDIENE- STUDIUL IMUNOHISTOCHEMIC

Ionela PAȘCANU¹, Claudia BĂNESCU¹, Angela BORDA², HORVATH EMOKE²
1 - Disciplina de Genetică, UMF Tg Mureș, 2 - Disciplina de Morfopatologie, UMF Tg Mureș

Rezumat

În răspunsul imun asociat cancerului tiroidian poate fi importantă expresia aberantă a antigenelor de clasă II HLA și infiltratul limfocitar. Un număr de 31 de tumori maligne tiroidiene au fost supuse studiului imunohistochimic pentru evidențierea expresiei lanțurilor alfa ale moleculelor HLA DR: carcinom papilar 14 cazuri, carcinom papilar varianta foliculară 8 cazuri, carcinom folicular 4 cazuri, carcinom nediferențiat 2 cazuri, sarcom tiroidian 1 caz, carcinom medular 1 caz. Limfocitele infiltratului limfocitar au fost de asemenea supuse imunotipizării pentru HLA și antigenul CD45 R0. Studiul nostru evidențiază la 50% din cazurile de carcinom papilar o expresie aberantă a moleculelor HLA DR. Numai unul din cazurile de carcinom folicular a fost pozitiv pentru HLA la nivelul celulelor tumorale. Nici un caz de carcinom anaplastic, medular sau de sarcom tiroidian nu a fost HLA DR pozitiv. Dintre parametrii histopatologici investigați, indicatori de prognostic și diferențiere, numai prezența corpusculilor psamomatoși și fibroza tisulară s-au asociat cu expresia tumorală a HLA DR. Studiul nostru indică un răspuns imun activ dar variabil în carcinomul tiroidian.

Cuvinte cheie: cancer tiroidian, HLA DR, CD 45 R0

Summary. Hla dr expression in thyroid malignant tumor - immunohistochemical study. In the immune response against thyroid cancer might be important aberrant expression of HLA class II antigens and infiltrating lymphocytes. Our study was performing on 31 malignant tumors: 23 cases of papillary carcinoma, 4 cases of follicular carcinoma, 2 of anaplastic carcinoma, one case of thyroid sarcoma and one of medullary carcinoma. In all this we investigate the immunohistochemic expression of HLA DR alpha chains on tumor cells as well as expression of HLA DR molecules and CD 45 R0 on tumor infiltrating lymphocytes. Half of the papillary thyroid carcinoma and only one of the follicular carcinoma cases were positive for HLA DR on tumor cells. Neither of thyroid sarcoma, anaplastic or medullary carcinoma was positive. Number and distribution of CD 45 R0+ lymphocytes significantly correlated with aberrant HLA DR expression on tumor cells. We have also been studied the number of psammoma bodies, the amount of fibrous tissue and the extend of follicular differentiation. Only the first and the second of these histological findings were associated with aberrant expression of HLA DR on tumor cells. Our study indicates an active but variable immune response in thyroid carcinoma.

Key words: thyroid cancer, HLA DR expresion, CD 45 R0

Introducere

Una dintre cauzele variabilității comportamentului biologic în cancerele tiroidiene ar putea fi modificările în mecanismele imune de apărare. În carcinomul papilar, infiltratul limfocitar este frecvent descris [1,2]; ipoteza implicării sistemului imun în limitarea sau chiar protecția împotriva creșterii neoplazice a fost sugerată de unii cercetători [2,3]. Această ipoteză însă presupune ca celulele tumorale să prezinte antigene de suprafață recunoscute de sistemul imun, capabil astfel să reacționeze împotriva lor.

Material și metodă

Un număr de 31 de tumori maligne tiroidiene au fost supuse studiului imunohistochimic pentru evidențierea expresiei moleculelor HLA DR. Cazurile au fost încadrate în următoarele categorii: carcinom papilar 14 cazuri, carcinom papilar varianta foliculară 8 cazuri, carcinom folicular 4 cazuri, carcinom nediferențiat 2 cazuri, sarcom tiroidian 1 caz, carcinom medular 1 caz. S-a folosit tehnica imunohistochimică aplicată pe fragmente

bioptice incluse în parafină. Anticorpii primari folosiți în studiul imunohistochimic au fost: anticorpus monoclonal pentru lanțul alfa al antigenului HLA DR (diluție 1/100, imunomarcaj citoplasmatic și membranar), anticorpus monoclonal împotriva antigenului CD 45 R0 (diluție: 1/75, imunomarcaj citoplasmatic), anticorpus monoclonal Ki 67 (diluție 1/100, imunomarcaj nuclear). Vizualizarea produsului reacției cu cromogen s-a efectuat cu cromogenul DAB (3,3'-diaminobenzidină tetrahidroclorod). Pentru aprecierea imunomarcajului am utilizat microscopul de tip Nikon Eclipse E 600. Am calculat proporția celulelor imunomarcate pe cinci câmpuri microscopice cu obiectivul 20, în cazul fiecărei lame examinate. Interpretarea marcatului imunohistochimic s-a efectuat în Laboratorul de Anatomie Patologică Târgu-Mureș de către un anatomopatolog experimentat. Expresia antigenelor de histocompatibilitate HLA DR la nivelul celulelor tumorale și a limfocitelor infiltrative peritumorale (LIT) a fost cuantificată semicantitativ, notându-se cu: 0, absența celulelor

HLA DR pozitive în interiorul tumorii; 1, prezența izolată de celule HLA DR pozitive; 2, identificarea unor focare de celule HLA DR pozitive; 3 reacție imunohistochimică intens pozitivă pentru antigenele HLA DR. Infiltratul inflamator peritumoral a fost de asemenea cuantificat semicantitativ (de la 0 la 3).

Expresia receptorului CD R0 45 la nivelul LIT, prin examinare cu obiectivul 10x a zece câmpuri microscopice și notarea cu: 0 limfocite CD 45 R0 negative; + prezența la sub 10% din limfocite a colorației imunohistochimice pentru CD 45 R0; ++ între 10 și 50% limfocite CD 45 R0 pozitive; +++ peste 50% pozitivitate pentru CD 45 R0. Marcarea imunohistochimică folosind anticorpul anti-Ki 67 realizează marcaj limitat strict la nivelul nucleului. Se apreciază imunoreactivitatea Ki 67 prin urmărirea celulelor tumorale din ariile uniform colorate, evitând focarele de necroză și hemoragie, considerând pozitivă orice colorare nucleară detectabilă (punctiformă sau difuză).

Rezultate

La unul dintre cazurile de carcinom papilar nu s-a obținut rezultate interpretabile imunohistochimic și a fost exclus din studiu. Trei cazuri de carcinom papilar și unul nediferențiat au fost imunotipizate pentru anticorpul Ki 67, un epitop nuclear asociat cu gradul proliferării, nici unul nu s-a dovedit a fi pozitiv pentru acest anticorp. Examinarea microscopică a nodulilor limfatici extirpați odată cu glanda tiroidă a evidențiat în cinci cazuri țesut metastazant de origine tiroidiană la acest nivel. Tumora primară de la nivel tiroidian era carcinom papilar în 3 cazuri (unul varianta foliculară), un carcinom folicular și unul nediferențiat. Toate aceste cazuri au fost de asemenea imunotipizate și incluse în studiul nostru, notându-se cu 0 absența metastazelor la nivel ganglionar, cu 1- prezența metastazelor, cu reacție negativă pentru HLA DR la nivelul celulelor tumorale metastazante, 1+ celule tumorale metastazante pozitive pentru HLA DR.

În secțiunile colorate cu hematoxilină eozină s-au studiat, pentru cazurile de carcinom papilar cu și fără arhitectură foliculară, următoarele patru caracteristici histologice: gradul de diferențiere oxifilică și insulară, prezența și numărul corpusculilor psamomatoși, gradul de extindere al țesutului fibros. Pentru fiecare dintre parametri s-a notat cu 0 absența elementului histologic, cu 1 prezența, redusă cantitativ și cu 2 nivelul de exprimare maxim.

Expresia HLA DR la nivelul celulelor tumorale tiroidiene a fost pus în evidență la un număr de 12 cazuri de carcinom tiroidian: 11 carcinoame

papilare (patru dintre ele erau forma cu arhitectură predominant foliculară) și la un caz de carcinom folicular. La nici un caz de carcinom nediferențiat, carcinom medular sau sarcom tiroidian nu s-a evidențiat celule tumorale HLA DR pozitive.

Colorația imunohistochimică se regăsea atât la nivelul citoplasmei cât și la nivel membranar în majoritatea cazurilor, numai în două cazuri de carcinom papilar colorația a fost evidențiată exclusiv la nivel membranar. Din cele cinci cazuri cu metastaze la nivel ganglionar, patru aveau celule tumorale pozitive pentru HLA DR la nivelul tumorii primare, din acestea, trei erau pozitive pentru HLA și la nivelul celulelor tumorale din metastaze. Infiltratul inflamator limfocitar peritumoral s-a regăsit la 16 cazuri, 9 dintre ele erau și HLA DR pozitive pentru celulele tumorale.

În carcinoamele papilare prezența diferențierii de tip oxifilic sau insular nu s-a corelat cu gradul expresiei HLA DR la nivelul celulelor tumorale. Imunotipizarea pentru HLA DR, cu intensitate variabilă de exprimare, a fost regăsită la cazurile la care erau descrise histopatologic corpusculi psamomatoși sau scleroză dar numărul acestor corpusculi și gradul de extindere al fibrozei nu au influențat pozitivitatea reacției HLA DR. Cea mai mare densitate de celule limfocitare HLA DR pozitive în infiltratul inflamator peritumoral se regăsește în carcinomul papilar clasic.

Expresia CD 45R0 se corelează pozitiv cu expresia moleculelor HLA DR atât la nivel tumoral cât și la nivelul infiltratului limfocitar ($p < 0,01$).

Discuții

Numeroși autori au descris, în proporții diferite, expresia moleculelor HLA DR la nivelul tireocitelor. Betterle et al [4] evaluează, printr-o metodă de imunofluorescență indirectă, expresia antigenelor de clasa I și II HLA la nivelul tireocitelor în 30 de carcinoame papilare, 6 carcinoame medulare, trei anaplastice și două carcinoame foliculare. Pentru moleculele HLA DR găsește o expresie anormală în 70% din cazurile de carcinom papilar, 50% din cele foliculare, 33% din cele anaplastice și la nici un carcinom medular. Aceiași metodă, aplicată de Lucas Martin [5] pe o sută de specimene obținute prin tiroidectomie pentru diferite afecțiuni patologice tiroidiene, găsește la 38% din carcinoamele papilare o expresie inadecvată a clasei II de molecule HLA.

Knoll et al [6] investighează prin metoda imunohistochimică asemănătoare celei aplicate în studiul nostru, expresia lanțurilor HLA alfa și beta în 54 de tumori primare tiroidiene și în patru din metastazele acestora. Expresia aberantă a lanțurilor de tip beta este descrisă în 28% din carcinoamele

papilare și 15% din cele foliculare. Trei din cazurile de carcinom papilar pozitive pentru lanțurile beta și toate cazurile de carcinom folicular au fost negative pentru lanțul alfa HLA.

Studiul nostru evidențiază la 50% din cazurile de carcinom papilar, independent de prezența sau nu a arhitecturii predominant foliculare, o expresia aberantă a moleculelor HLA DR, în cea mai mare parte la nivel citoplasmatic și membranar. În ceea ce privește carcinomul folicular la un caz din patru (25%) am evidențiat aceeași expresie aberantă a moleculelor complexului major de histocompatibilitate. Nici un caz de carcinom anaplastic, medular sau de sarcom tirodian nu a fost HLA DR pozitiv. Folosind o scară semicantitativă, carcinomul papilar clasic a avut numărul cel mai mare de celule HLA DR pozitive.

Dintre parametrii histopatologici descriși, indicatori de prognostic și diferențiere, numai prezența corpusculilor psamomatoși și fibroza tisulară s-au asociat cu expresia tumorală a HLA DR. Analiza extensivă a unor parametri de prognostic asemănători celor descriși de noi în studiul lui Linhorst [7] nu evidențiază nici o corelație statistic semnificativă între criteriile precum diferențierea oxifilică, foliculară sau insulară, numărul corpusculilor psamomatoși și expresia HLA DR. Una din constatările studiului nostru se referă la apariția celulelor tumorale pozitive atât la nivelul tumorii primare cât și la nivelul metastazelor în trei cazuri din cele cinci care s-au prezentat cu metastaze ganglionare. Două dintre cazuri erau carcinoame papilare și unul folicular.

Infiltratul inflamator s-a regăsit la 14 din cazurile noastre, cinci dintre acestea nu erau HLA DR pozitive la nivelul celulelor tumorale. Majoritatea studiilor citate [6,8] găsesc fie în carcinoamele papilare fie în cele foliculare cea mai mare densitate de celule HLA DR pozitive la nivelul infiltratului peritumoral. Lindhorst et al [7] descrie expresia acestor antigene la nivelul LIT în toate formele de carcinoame tiroidiene, inclusiv cele medulare și anaplastice fără a identifica o diferență în numărul acestor celule într-un anumit tip morfofopatologic de carcinom.

Limfocitele CD 45 R0 sunt în mare lor majoritate limfocite T cu memorie. În literatura de specialitate se descrie o scădere a numărului lor odată cu creșterea gradului de diferențiere al tumorilor maligne. Studiul nostru evidențiază o corelație pozitivă între numărul și distribuția acestor celule și expresia HLA DR la nivelul celulelor tumorale, asemănător studiului lui Knoll [6]. Alți autori [7] descriu o creștere semnificativă a celulelor limfocitare HLA DR pozitive din infiltratul limfocitar peritumoral în contextul prezenței

celulelor CD 45 R0 pozitive. Explicația acestor constatări rezidă din faptul că aceste celule cu memorie, active reprezintă o componentă majoritară a infiltratului peritumoral ceea ce explică prezența concomitentă a pozitivității pentru CD 45 R0 și HLA DR.

Există numeroase dovezi legate de expresia concomitentă a HLA-DR și a moleculelor de adeziune intercelulară (ICAM-1) la nivelul tireocitelor transformate malign în special în carcinoamele papilare. Unii autori [7] sugerează că această expresie în țesuturile neoplazice poate fi corelată cu expresia oncogenelor. Expresia HLA DR la nivelul tireocitelor tumorale este puternic constitutivă dar este influențată și de infiltratul limfocitar peritumoral. Dovezi în sprijinul acestei ipoteze este adus și de studiul nostru prin evidențierea corelației între expresia tumorală a moleculelor HLA DR și nivelul limfocitelor CD 45 R0.

Concluzii

Controlul imun în cancerul tirodian poate avea o importanță deosebită în limitarea creșterii tumorale. Studiul nostru aduce dovezi asupra existenței unei apărări imune active în special în cancerule papilare, în concordanță cu gradul diferențierii diverselor tipuri de carcinoame tiroidiene. Prin demonstrarea unei proporții asemănătoare de celule HLA DR pozitive în forma foliculară a carcinomelor papilare se confirmă prognosticul mai bun al acestor cancerule, asemănător celorlalte forme papilare comparativ cu formele foliculare pure. O mai bună înțelegerea a mecanismelor imunopatologice în cancerule tiroidiene poate culmina cu abordarea din perspectiva imună a terapiei acestor forme de cancer. Imunoterapia ar putea constitui una din viitoarele forme de terapie în patologia malignă tirodiană [1,9].

Bibliografie

1. Porto T, Coelho I, Boavida J, Pereira C, Association of HLA DQ4-DR8 haplotype with papillary thyroid carcinomas. Clin Endocrinol (Oxf). 2006 Jun;64(6):715.
2. Ribas A, Butterfield LH, Glaspy JA. Current developments in cancer vaccines and cellular immunotherapy. J Clin Oncol. 2003; 21(12):2415-32.
3. Boyd CM, Baker JR Jr. The immunology of thyroid cancer Endocrinol Metab Clin North Am. 1996; 25(1):159-79
4. Betterle C, Presotto F, Caretto A. Expression of class I and II human leukocyte antigens by thyrocytes and lymphocytic infiltration on human thyroid

- tumors. An immunofluorescence study. *Cancer*. 1991; 67(4):977-83.
5. Lucas-Martin A, Foz-Sala M, Todd I et al. Occurrence of thyrocyte HLA class II expression in a wide variety of thyroid diseases: relationship with lymphocytic infiltration and thyroid autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988; 66:367–375.
 6. Knoll MR, Schwab M, Oestreich K. HLA class II expression in well differentiated thyroid carcinoma: correlation with clinicopathological features. *J Exp Clin Cancer Res*. 1997;16(2):177-82.
 7. Lindhorst E, Schumm-Draeger PM, Bojunga J. Differences in tumor cell proliferation, HLA DR expression and lymphocytic infiltration in various types of thyroid carcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2002;110(1):27-31
 8. Feinmesser M, Stern S, Mechlis-Frish S. HLA-DR expression and lymphocytic infiltration in metastatic and non-metastatic papillary carcinoma of the thyroid. *Eur J Surg Oncol*. 1996; 22(5):494-501.
 9. Jager E, Jager D, Knuth A. Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines. *Int J Cancer*. 2003;106(6):817-20.