

RĂSPUNSUL IMUN MEDIAT CELULAR ÎN CANCERUL PANCREATIC

I. ȘIMON¹, R. TOGANEI¹, O. CEBOTARI¹, O. FABLAN¹, M. CAZACU¹,
E. RYSCHICH², J. SCHMIDI²

¹ Clinica Chirurgie IV, UMF Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, Romania

² Departamentul de Chirurgie, Universitatea Heidelberg, Germania

Rezumat

În studiul de față, am investigat expresia HLA clasa I în carcinomul pancreatic uman.

Au fost investigate prin metode imunohistochimice standard expresia HLA clasa I în tumorile pancreatice și extinderea infiltrației tumorale cu diferite populații de celule T, la 31 de pacienți cu cancer de pancreas, obținând o expresie: negativă în 33%, heterogenă în 40% și pozitivă în 27% din cazuri.

Carcinomul pancreatic și țesutul peritumoral au demonstrat o creștere semnificativă a infiltrației cu limfocite CD3+, CD4+ și CD8+, comparativ cu țesutul pancreatic situat la distanță de tumoră. Expresia negativă a fost uniform însoțită de o densitate scăzută a infiltrației tumorale citotoxice cu celule T, iar expresia pozitivă de acumulare substanțială de limfocite.

Cancerul pancreatic induce frecvent un răspuns imun celular care determină infiltrarea intra și peritumorală cu celule T.

Cuvinte cheie: carcinom pancreatic, infiltrare limfocitară, HLA I

Summary. The cell- mediated immune response in pancreatic cancer

In the present study, we investigated the expression of HLA class I in human pancreatic carcinoma. The expression of HLA class I and the extent of tumor infiltration by different T-cells population were investigated in 31 pancreatic cancer patients by standard immunohistochemistry obtaining following types of expressions: negative in 33%, heterogeneous in 40% and positive in 27% of cases.

Pancreatic carcinoma and tumor-surrounding tissue demonstrated a significantly higher infiltration by CD3+, CD4+ and CD8+ T-cells compared to the tumor-distant pancreatic tissue. The negative expression of HLA class I was uniformly accompanied by a low density of tumor-infiltrating cytotoxic T-cells whereas the HLA class I positive tumors were characterised by substantial lymphocyte accumulation.

Pancreatic carcinoma induces frequently a cellular immune response which resulted in intra- and peritumoral T-cell infiltration.

Keywords: pancreatic carcinoma, lymphocytes infiltration, HLA class I

Introducere

Zonele genetice implicate în respingerea țesuturilor străine sau celor infectate cu virusuri sunt cunoscute ca și complex major de histocompatibilitate (MHC) sau ca antigen leucocitar uman (HLA) la oameni. Dezvoltarea tumorilor maligne reprezintă nu numai transformarea neoplazică dar și eșecul rezistenței gazdei în eliminarea celulelor aberante. Celulele neoplazice exprimă frecvent antigeni de suprafață care pot fi recunoscuți ca străini și activează reacția citotoxică a celulelor T.

Studiul de față are ca scop studierea răspunsului imun celular în cancerul pancreatic. S-a demonstrat prin tehnici imunohistochimice că expresia clasei HLA I este frecvent alterată în cancerul pancreatic. Majoritatea cancerelor pancreatice au arătat o expresie pozitivă sau heterogenă a HLA clasa I, care a fost acompaniată de infiltrare limfocitară profundă a țesutului tumoral. Tumorile cu expresie negativă a HLA clasa I au arătat o densitate scăzută a infiltrației tumorale citotoxice cu celule T.

Material și metodă

Pacienții incluși în studiu au fost operați de cancer pancreatic în Departamentul de Chirurgie al Universității din Heidelberg. Au fost recoltate 30 de piese tisulare de cancer pancreatic ductal (20 tumori primare și 10 metastaze). 7 piese au conținut atât țesut tumoral cât și țesut peritumoral. Tumorile au fost clasificate histopatologic în adenocarcinoame bine, moderat sau slab diferențiate, în concordanță cu clasificarea OMS. Au fost recoltate suplimentar 14 piese de țesut pancreatic non-malign de la 5-10 cm distanță de tumoră. Aceste probe au fost considerate ca fiind țesut tumoral la distanță, în contrast cu țesutul pancreatic peritumoral. S-au folosit două piese de splină ca martor. Pentru analiza supraviețuirii au fost selectați doar pacienții cu rezecție R0 (n=17)..

Au fost tăiate secțiuni de 5 mm, uscate la aer și fixate în acetonă. Lamele au fost păstrate la -20°C înainte de orice folosire ulterioară. Secțiunile au fost colorate în trei timpi, utilizând kitul LSAB și acid hemalum Mayer. Au fost utilizate următoarele clone de anticorpi monoclonali

purificați: W6/32 (epitop monomorfic de lanț greu al clasei HLA I), 246-E8. E7 (beta2-microglobulin), mixtură de Ae1/A3 (pancitokeratină), UCHT1 (anti-CD3, celule T), MT310 (anti-CD4, celule T-helper), DK25 (anti-CD8, celule T citotoxice), UCHL1 (CD45RO, celule T de memorie), MOC1 (antiCD56, celule NK).

HLA clasa I la nivelul celulelor tumorale a fost investigată folosind o scală a celulelor tumorale descrisă de Garrido și colab. astfel: negativă (<25%) heterogenă (25-80%), pozitivă (>80%).

Analiza cantitativă a colorației imunohistochimice a fost realizată printr-o metodă imagistică asistată computerizat. Pentru acest scop, câmpurile microscopice au fost alese aleator de un microscop optic, digitalizate cu o cameră video color în imagini histologice stocate într-un computer. Toate măsurătorile au fost realizate folosindu-se un software special (Histo) care permite separarea zonelor în diferite culori și măsurarea suprafețelor acestor zone separate. Frecvența relativă a celulelor tumorale a fost evaluată printr-o mărire (x50) a câmpului histologic (2,9 mm²) și a fost exprimată ca procent al suprafeței celulare care a fost pozitiv colorată de anticorpii anticitokeratină.

Pentru măsurarea infiltrației tumorale de către celulele T s-au folosit două caracteristici, în funcție de distribuția limfocitară în țesutul tumoral. În primul rând, a fost evaluată densitatea limfocitelor care infiltrază difuz țesutul și care nu au format acumulări dense. Valoarea lor medie a fost determinată ca densitate limfocitară difuză. În al doilea rând, numărul limfocitelor în zonele cu o acumulare maximă limfocitară a fost determinat ca densitate limfocitară cumulată. Pentru măsurarea densității limfocitare au fost alese aleator, două câmpuri cu distribuție limfocitară difuză și două câmpuri cu acumulare limfocitară crescută (suprafața câmpului de 0,12

mm²) (mărire x250). Limfocitele colorate pozitiv au fost numărate și exprimate pe 1 mm² de suprafață tumorală.

Analiza statistică a fost efectuată folosindu-se programul SAS. Densitatea limfocitară a fost prezentată grafic. Pentru subgrupele de pacienți, în funcție de densitatea limfocitară, s-a aplicat testul U Mann-Whitney, coeficientul de corelație Spearman și analiza de regresie liniară pentru determinarea asocierii dintre infiltrația limfocitară și valoarea colorației cu citokeratină. În analizarea supraviețuirii pacienților cu cancer pancreatic, a fost utilizată estimarea Meier. La ultimul control efectuat, doar 5 pacienți au fost găsiți în viață. A fost calculată supraviețuirea medie, folosindu-se un interval de confidență de 95% (i.c.).

Rezultate

Expresia HLA clasa I de către țesuturile pancreatice maligne și nonmaligne a fost investigată folosind anticorpi împotriva determinantului monomorfic al lanțului greu din această moleculă. Țesutul splenic de control a arătat un nivel crescut a expresiei HLA clasa I al oricărui tip celular, cu excepția celulelor musculare netede din peretele vascular. Pancreasul nonmalign exprimă HLA clasa I heterogen. Celulele ductale, endoteliale și endocrine au demonstrat o expresie pozitivă, abundentă, a HLA clasa I, în timp ce țesutul exocrin situat la distanță de tumoră nu a exprimat acest complex molecular. Expresia HLA clasa I în țesutul pancreatic malign a fost detectată în celulele stromale, endoteliale și limfoide. Celulele tumorale au exprimat diferit această moleculă: 10 cancere pancreatice (33%) HLA I negativ, 12 (40%) HLA I heterogen, 9 (27%) HLA I pozitiv. Expresia negativă a HLA clasa I a fost mai frecventă în tumorile slab diferențiate, comparativ cu tumorile bine sau moderat diferențiate (tabelul I).

Tabelul nr. I: Corelația între gradul de diferențiere și expresia HLA clasa I în cancerul pancreatic uman

Expresia HLA clasa I	Număr de cazuri	Grad de diferențiere (%)		
		Bine	Moderat	Slab
Pozitivă	9	1 (11%)	7 (78%)	1 (11%)
Heterogenă	12	2 (17%)	8 (66%)	2 (17%)
Negativă	10	0	6 (60%)	4 (40%)

Colorația lanțului greu al HLA clasa I și beta2microglobulinei a demonstrat o expresie identică în splină și în țesutul pancreatic nonmalign. Celulele tumorale pancreatice au arătat o expresie identică a beta2microglobulinei ca și a lanțului greu al HLA clasa I în 28 de cazuri și o expresie mai mare a beta2microglobulinei în 2 cazuri. Nu au fost piese care să arate o colorație mai scăzută a beta2microglobulinei în comparație cu colorația lanțului clasei HLA I din țesutul pancreatic malign.

Țesutul pancreatic situat la distanță de tumoră a inclus câteva limfocite care au prezentat atât markeri CD3 cât și markeri CD8. În țesutul pancreatic situat la distanță de tumoră, limfocitele CD4+ și CD56+ (celule NK) au fost aproape absente. În contrast cu țesutul tumoral non-malign situat la distanță, carcinomul pancreatic și țesutul pancreatic din jurul tumorii au prezentat frecvent o crescută infiltrație limfocitară CD3+, CD4+ și CD8+.

Densitatea cumulată a trei populații limfocitare din carcinomul pancreatic a fost semnificativ mai mare decât în țesutul pancreatic situat la distanță de tumoră (figura 1), în timp ce densitatea limfocitară difuză nu a diferit semnificativ. Țesutul pancreatic din jurul tumorii a prezentat o creștere semnificativă a densității limfocitare

difuze cu celule CD3+, CD4+ și CD8+, comparativ cu țesutul tumoral și țesutul pancreatic situat la distanță de tumoră (figura 1). Densitatea cumulată a trei populații de celule T în țesutul ce înconjoară tumora a fost semnificativ mai mare decât în țesutul pancreatic situat la distanță de tumoră, deși infiltrarea cu celule T CD8+ a fost semnificativ crescută doar în țesutul din jurul tumorii (figura 2). Infiltrarea cu celule T de tip CD45RO+ în țesutul tumoral a corespuns cu infiltrația limfocitară CD8+. Infiltrația cu celule NK a țesutului malign sau nonmalign a fost foarte scăzută.

Analiza densității limfocitare în diferitele expresii ale HLA clasa I a demonstrat că în tumorile HLA I negative a existat o infiltrație scăzută cu celule T, care nu au depășit valoarea de 200/mm² (figura 3). În contrast cu aceste tumori, carcinoamele pancreatice cu expresia pozitivă sau heterogenă a HLA clasa I au arătat o infiltrație limfocitară cumulată semnificativ mai mare cu celule CD3+, CD4+ și CD8+, decât tumorile cu HLA clasa I negative ($p=0,063$, $p=0,2$, $p<0,001$) (figura 3) și care a depășit 200 de celule/mm² în cele mai multe cazuri (figura 3). Densitatea difuză a tuturor celor trei populații limfocitare nu a fost semnificativ diferită între grupurile cu o expresie diferită a HLA clasa I.

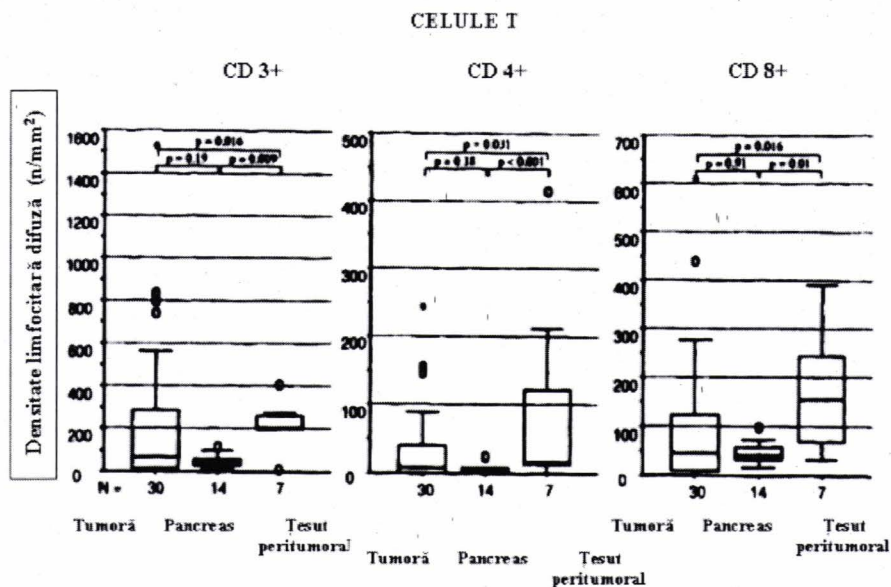


Figura 1: Densitatea limfocitară difuză a celulelor CD3+, CD4+ și CD8+ în țesutul tumoral (tumoră), țesutul peritumoral și țesutul la distanță (pancreas).

CELULE T

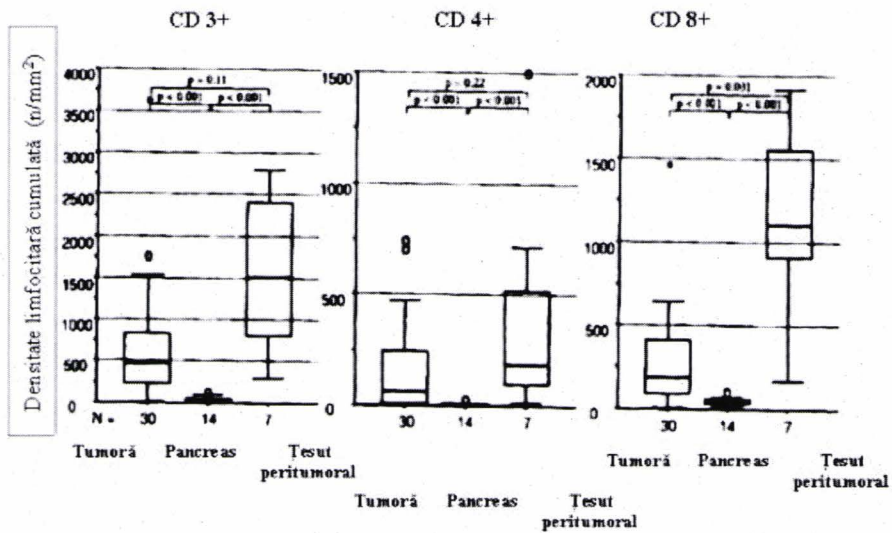


Figura 2: Densitatea limfocitară cumulată a celulelor CD3+, CD4+ și CD8+ în țesutul tumoral (tumoră), țesutul peritumoral și țesutul la distanță (pancreas).

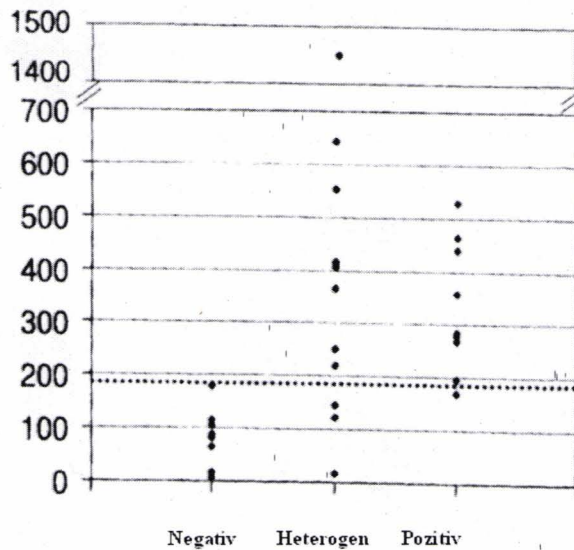


Figura 3: Densitatea limfocitară cumulată a celulelor CD8+ în tumorile pancreatice cu o expresie negativă, heterogenă și pozitivă: tumorile HLA I negative au arătat o infiltrare scăzută cu celule T. Densitatea limfocitară cea mai crescută nu a depășit valoarea de 200 celule/mm². Cancerul pancreatic cu o expresie a HLA clasa I pozitivă sau heterogenă a arătat o infiltrare limfocitară cumulată semnificativ mai mare cu celule CD8+ decât tumorile cu expresie negativă a HLA clasa I (p<0.001).

A fost obținută o corelație negativă semnificativă între celulele citokeratin-pozitive și densitatea cumulată a celulelor T CD8+ ($r = - 0,41$, $p=0,026$; Spearman) (figura 4). O densitate cumulată crescută a celulelor CD8+ a fost

însoțită de un număr scăzut de celule tumorale citokeratin-pozitive (figura 4). Tumorile care au fost caracterizate de o acumulare scăzută a celulelor T de tip CD8+ au avut valori atât ridicate, cât și scăzute de celule citokeratin-

pozitive (figura 4). Suplimentar, a fost efectuată o analiză Kaplan-Meier în scopul comparării influenței expresiei HLA clasa I și a infiltrației tumorale cu celulele citotoxice asupra timpului de supraviețuire. Timpul mediu de supraviețuire după rezecția R0 a fost de 9 luni (interval de confidență 95%: 6-24 luni) în timp ce pacienții cu operații paleative au avut o supraviețuire medie de numai 3 luni (interval de confidență 95%: 2-4 luni) ($p=0,002$).

Timpul de supraviețuire în grupul cu expresie pozitivă/heterogenă a HLA clasa I după rezecția R0 (mediana de 7,5 luni, IC. =95%: 9-24 luni) nu a fost semnificativ diferită față de cel din grupul cu expresie negativă (mediana 24 luni, IC=95%: 4-36 luni) ($p=0,28$) (figura 5). Nu s-au obținut corelații între infiltrarea tumorală cu celule CD8+ și timpul de supraviețuire după rezecția tumorală R0.

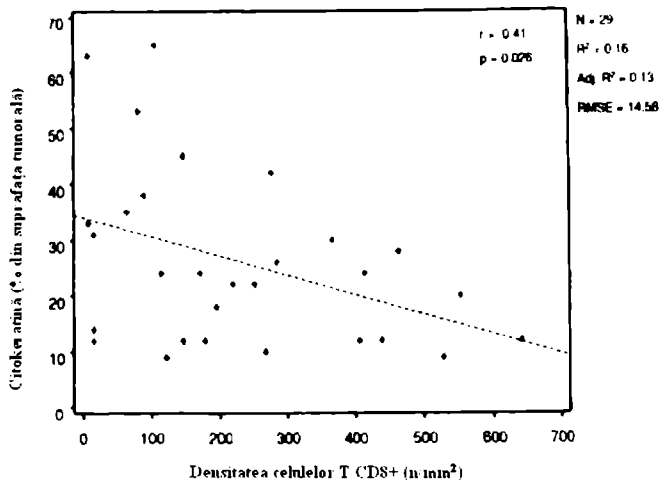


Figura 4: Corelația dintre infiltrarea tumorală cu celule CD8+ și suprafața tumorală citokeratin pozitivă: s-a obținut o corelație negativă între valoarea celulelor ce exprimă citokeratina și densitatea cumulată a celulelor CD8+ ($r = -0,41$; $p= 0,026$). O densitate cumulată crescută a celulelor CD8+ a fost însoțită de o valoare scăzută a celulelor tumorale pozitiv colorate de citokeratină sugerând că celulele tumorale sunt lizate de celule T.

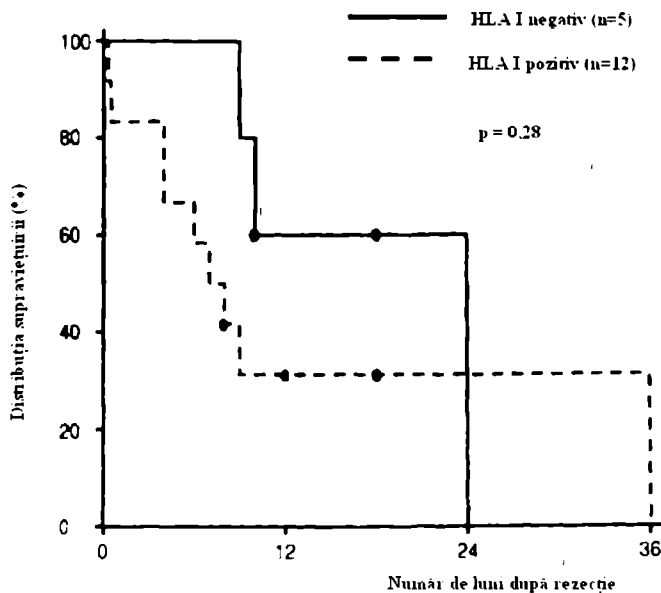


Figura 5: Analiza Kaplan-Meier a timpului de supraviețuire după rezecția tumorală R0 în funcție de expresia HLA clasa I: analiza statistică nu a arătat diferență semnificativă a timpului de supraviețuire după

rezeția R0 între tumorile cu expresii pozitive/ heterogene (supraviețuirea medie: 7,5 luni ,IC 95%: 4-36 luni) și negative (supraviețuirea medie:24 de luni, IC 95%: 9-24 luni) ale HLAclasa I (p=0,28).

Discuții

Dezvoltarea majorității tumorilor solide este asociată unei expresii reduse sau negative a HLA clasa I. Acest complex molecular mediază interacțiunea cu limfocitele T, care recunosc peptidele legate de moleculele clasei I, și a celulelor NK, care recunosc formele alelice particulare ale complexului clasei I. Investigațiile anterioare au demonstrat că în cancerul colorectal, mamar, cervical, tumorile cerebrale și melanomul malign apar alterări frecvente ale acestui complex molecular important.

În acest studiu au fost incluse mai multe cazuri, demonstrându-se alterarea expresiei clasei HLA I în 74% din piesele de cancer pancreatic. O pierdere totală a clasei HLA I pare să fie mai frecventă în tumorile slab diferențiate, în comparație cu tumorile bine sau moderat diferențiate. Colorația imunohistochimică a țesutului pancreatic nonmalign a arătat o expresie pozitiv normală a HLAclasa I în toate tipurile de celule pancreatice, cu excepția celulelor exocrine care formează marea masă a țesutului pancreatic. Aceasta ar putea avea o implicație importantă în imunologia bolii pancreatice, atât timp cât absența expresiei HLA clasa I reprezintă un privilegiu imunologic.

Folosind analizele imunohistochimice am investigat răspunsul imun celular și expresia HLA clasa I ca și un ghid pentru limfocitele T citotoxice în cancerul pancreatic uman. În acest studiu am demonstrat că celulele tumorale ale carcinomului pancreatic induc frecvent un răspuns imun distinct, care determină infiltrarea țesutului tumoral cu celule T.

S-a observat frecvent o acumulare limfocitară crescută în țesutul pancreatic malign, care nu are un format uniform și poate fi împărțit în două părți dependente de expresia HLA clasa I în celulele tumorale. Limfocitele pot infiltra difuz țesutul tumoral sau pot să se acumuleze la nivele cu densități crescute. Relevanța funcțională a acestor două tipuri de infiltrare limfocitară pare să fie diferită, deoarece locurile de acumulare limfocitară crescută depind doar de expresiile pozitive/heterogene sau negative ale HLA clasa I. Recunoașterea cancerului pancreatic uman de limfocitele citotoxice a fost posibilă doar dacă complexul molecular al HLA clasa I a fost exprimat pozitiv de cel puțin o parte a celulelor tumorale. În contrast cu tumorile cu expresie pozitivă a clasei HLA I, pierderea totală a HLA clasa I în celulele tumorale pancreatice a împiedicat efectiv infiltrarea cu celule T citotoxice.

Considerăm că aceste descoperiri sunt cruciale

pentru imunoterapia clinică a cancerului pancreatic, deoarece este necesară selecția pacienților cu tumori HLA clasa I pozitivă pentru o imunoterapie eficientă bazată pe celulele T.

În acest studiu a fost investigată expresia determinantilor monomorfici ai HLA clasa I și beta2microglobulinei. Pierderea acestor determinanți reflectă pierderea totală a HLA clasa I, care trebuie să fie clasificată în fenotipul I de alterare al HLA clasa I. În majoritatea tumorilor pancreatice, infiltratul limfocitar exprimă CD8 și CD45RO ca molecule celulare de suprafață, fiind reprezentat prin urmare de un stadiu matur și potențial citotoxic. Aceste descoperiri corespund bine unor rapoarte anterioare care au investigat markerii CD8 și CD45RO în carcinomul pancreatic. Aspectul crucial al infiltrației limfocitare este reprezentat pe de o parte prin faptul că răspunsul imun împotriva tumorii este restricționat de recunoașterea tumorală și migrarea în țesutul tumoral, iar pe de altă parte infiltrarea limfocitară tumorală influențează celulele tumorale.

Unele studii clinice anterioare de cancer colorectal, mamar și pulmonar au demonstrat că infiltrarea limfocitară poate exploata potențialul lor tumoral citotoxic, deoarece pacienții cu infiltrarea limfocitară crescută au avut un prognostic mai bun decât pacienții cu o infiltrare limfocitară scăzută. Prezentul studiu nu a arătat nici o influență a infiltrației limfocitare precum și a expresiei HLA clasă I asupra timpului de supraviețuire la pacienții cu cancer pancreatic. Totuși, s-a demonstrat că densitatea celulelor tumorale a fost corelată negativ cu acumularea celulelor T citotoxice. Prin urmare, este posibil ca aceste infiltrări limfocitare să cauzeze o distrucție parțială a celulelor tumorale, care oricum nu reprezintă un factor decisiv în supraviețuirea pacienților.

În concluzie, am investigat rolul expresiei HLA clasa I în răspunsul imun mediat de celulele T în cancerul pancreatic uman. Această investigație a demonstrat că neoplasmul pancreatic a indus un răspuns imun celular care a determinat o infiltrare a țesutului tumoral cu limfocite T specifice. Celulele T citotoxice recunosc celulele maligne și migrează în tumoră, dacă celulele tumorale exprimă moleculele complexului HLA clasa I.

Bibliografie

- DANIELS, M.A., JAMESON, S.C. – Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers. *J. Exp. Med.* 2000;191:335-346.
- ALGARRA, I., CABRERA, T., GARRIDO, F. – The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum. Immunol.* 2000;61:65-73.
- BROWNING, M., PETRONZELLI, F., BICKNELL, D., KRAUSA, P., ROWAN, A., TONKS, S., MURRAY, N., BODMER, J., BODMER, W. – Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 1996;47:364-371.
- JAGER, E., RINGHOFFER, M., ALTMANNBERGER, M., ARAND, M., KARBACH, J., JAGER, D., OESCH, F., KNUTH, A. – Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 1997;71:142-147.
- TORRES, M.J., RUIZ, CABELLO, F., SKOUDY, A., BERROSPE, G., JIMENEZ, P., SERRANO, A., REAL, F.X., GARRIDO, F. – Loss of an HLA haplotype in pancreas cancer tissue and its corresponding tumor derived cell line. *Tissue Antigens* 1996;47:372-381.
- SCUPOLI, M.T., SARTORIS, S., TOSI, G., ENNAS, M.G., NICOLIS, M., CESTARI, T., ZAMBONI, G., MARTIGNONI, G., LEMOINE, N.R., SCARPA, A., ACCOLLA, R.S. – Expression of MHC class I and class II antigens in pancreatic adenocarcinomas. *Tissue Antigens* 1996; 48:301-311.
- von BERNSTORFF, W., VOSS, M., FREICHEL, S., SCHMID, A., VOGEL, I., JOHNK, C., HENNE BRUNZ, D., KREMER, B., KALTHOFF, H. – Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patient. *Clin. Cancer res.* 2001;7:925s-932s.
- ADEMMER, K., EBERT, M., MULLER, OSTERMEYER, F., FRIESS, H., BUCHLER, M.W., SCHUBERT, W., MALFERTHEINER, P. – Effector T lymphocyte subsets in human pancreatic cancer: detection of CD8+ CD18+ cells and CD8+ CD103+ cells by multi-epitope imaging. *Clin. Exp. Immunol.* 1998;112:21-26.