

1 9 8 5 - 8 9 B

CODIGO: 080480466

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CELULAS REACTIVAS DEL SISTEMA INMUNE EN
CANCER DEL CERVIX UTERINO Y LESIONES
PRECURSORAS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARIA CECILIA HERNANDEZ ESCALONA

GUADALAJARA, JAL. JULIO DE 1994

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CELULAS REACTIVAS DEL SISTEMA INMUNE
EN CANCER DEL CERVIX UTERINO Y
LESIONES PRECURSORAS

PRESENTA
MA. CECILIA HERNANDEZ ESCALONA

LUGAR DE REALIZACION
INSTITUTO DE PATOLOGIA INFECCIONES Y EXPERIMENTAL
"DR. FRANCISCO RUIZ SANCHEZ"

DIRECTOR DE TESIS
M. EN C. ADRIAN DANERI NAVARRO

A DIOS

Porque ahora se que siempre estuvo conmigo y nunca me abandono, porque con su amor y la fé de seguir adelante he logrado todo.

A MIS PADRES

Sí no fuera por ellos, no hubiera logrado estar aquí y ser lo que soy.

A MIS HERMANOS

Porque con su ánimo, apoyo y amor, me impulsan a seguir adelante en todas mis metas por pequeñas o grandes que sean.

AL DR. ADRIAN

GRACIAS, por la oportunidad, aceptación y gran enseñanza que he recibido de su parte, a la cual no se como agradecer.

A LILI, ANGELICA Y ESPECIALMENTE A SUSI

Por su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo que significa mucho para mi.

ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
INV	Cáncer Invasor
LIE	Lesión Intraepitelial Escamosa
LIEGA	Lesión Intraepitelial Escamosa de Grado Alto
LIEGB	Lesión Intraepitelial Escamosa de Grado Bajo
ml	mililitro
M	Molar
mg	Miligramos
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
nm	Nanómetros
PBS	Solución Balanciada de Fosfatos
pH	Concentración de iones hidrógeno en una solución
VPH	Virus de Papiloma Humano
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
ANTECEDENTES.....	3-6
JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVO.....	9
MATERIAL Y METODOS.....	10-13
RESULTADOS.....	14-16
FIGURAS Y FOTOS.....	17-25
DISCUSION.....	26-28
CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFIA.....	30-33

RESUMEN

El carcinoma del cervix uterino es la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres de nuestro país. Es una neoplasia de origen multifactorial pero estrechamente asociada a la infección por algunos tipos de virus del papiloma humano. Se desconoce la participación de los componentes del sistema inmune en las diferentes etapas de la historia natural de este tumor. El propósito de este trabajo fue describir el patrón de infiltración, el número de células del sistema inmune y el grado de expresión de las moléculas de histocompatibilidad clase *in situ*, en muestras cervicales de cada etapa de la historia natural de este tumor. Para tal efecto, se emplearon ensayos con streptavidina-biotina y peroxidasa -anti-peroxidasa en 41 muestras de tejidos cervicales de mujeres normales, pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo, alto y tumores invasores cervicales. Los resultados no permitieron definir patrones únicos de respuesta, pero sí tendencias en cada grupo, la infección por VPH se asoció a una disminución en las células de Langerhans; por su parte el 50% de los tumores invasores no expresaron moléculas de histocompatibilidad clase I. En su conjunto los resultados nos indican que se requieren otros estudios y estrategias para contestar las preguntas surgidas en este trabajo.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El carcinoma del cervix uterino es un problema de salud pública en nuestro país, su etiología es multifactorial, pero se ha asociado a variables del comportamiento sexual que predisponen a la transmisión de agentes infecciosos como el virus del papiloma humano (VPH), en etapas inmaduras del epitelio de la unión escamo-columnar (1,3). Resalta la importancia de la respuesta inmune en evidencias como una incidencia más elevada de cáncer invasor y lesiones precursoras en mujeres con inmunodeficiencia, principalmente celular (14,15). En forma general, se desconoce la participación de cada uno de los componentes del sistema inmune contra la infección viral por VPH, así como contra células displásicas e invasoras del cervix uterino. En particular, se desconoce el patrón de respuesta de las células del sistema inmune a nivel local en las diferentes etapas de la historia natural del carcinoma invasor del cervix uterino, y se desconoce también el grado de expresión de las moléculas de histocompatibilidad clase I en las células correspondientes a cada etapa de la historia natural del cáncer del cervix(20). El propósito de este trabajo de tesis fue describir el patrón de infiltración y el número de células del sistema inmune por mm² de tejido en muestras de pacientes con carcinoma invasor y lesiones intraepiteliales escamosas del cervix uterino; así como el porcentaje de tumores invasores cervicales que no expresan antígenos de histocompatibilidad clase I. Para tal efecto, se estudiaron muestras de tumores invasores, lesiones intraepiteliales de grado alto y bajo (LIEGA y LIEGB) y tejidos normales cervicales, mediante ensayos inmunohistoquímicos con streptavidina-biotina y peroxidasa-anti-peroxidasa (27,28).

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Antecedentes generales del cáncer de cervix uterino. El cáncer del cervix uterino, representa casi la tercera parte de los tumores malignos que ocurren en la mujer, en especial en la etapa más productiva de la vida, donde la incidencia global anual llega a un caso por mil mujeres (1).

Los carcinomas escamosos del cervix uterino, evolucionan a partir de lesiones intraepiteliales escamosas, en particular las clasificadas como de grado alto por el sistema Bethesda, en un período variable de tiempo.

Sistema Bethesda (1988) para el reporte y Diagnóstico Citológico de Anormalidades en las Células Escamosas del Cervix Uterino (2).

-
- Células Escamosas atípicas Indeterminadas
 - Lesiones Intraepiteliales Escamosas (LIE)
 - Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Grado Bajo (LIEGB)
 - (Cambios Celulares Asociados a VPH)
 - (Displasia Leve / NIC 1)
 - Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Grado Alto (LIEGA)
 - (Displasia Moderada / NIC 2)
 - (Displasia Severa / NIC 3)
 - (Carcinoma in situ / NIC 3)
 - Carcinoma invasor de Células Escamosas
-

La diversidad de factores de riesgo que se han asociado al cáncer del cervix uterino y las evidencias experimentales en torno al mismo, sugieren una etiología multifactorial. Al respecto, sobresale la asociación de variables del comportamiento sexual que facilitan la transmisión de agentes infecciosos; tales como el virus del papiloma humano tipo 16 y en menor grado 18, 31, 33 y 35 que

se involucran en las lesiones intraepiteliales escamosas de grado alto, caracterizadas por una deficiencia en la maduración epitelial y un riesgo elevado de progresar a cáncer invasor. El genoma viral de los tipos 16 y 18, se ha identificado en el 70% de los carcinomas escamosos invasores del cervix. Se ha observado también su integración en el genoma de las células epiteliales provenientes de tumores invasores y de líneas de estirpe cervical (3,4).

Se ha reportado que los genes E6 y E7 de estos virus, son capaces de transformar queratinocitos humanos y de inactivar a genes supresores (anti-oncogenes), tales como el p53 y el gen supresor que se inactiva en los retinoblastomas (5,6). Sin embargo, se ha señalado que la infección con el virus del papiloma humano es un factor importante pero insuficiente por sí mismo en el desarrollo del carcinoma invasor del cervix uterino (3). En este sentido, se han implicado a otros factores de riesgo, tales como el tabaquismo (7), uso de anticonceptivos orales (8), deficiencia de vitamina A (9), C (10), y ácido fólico (11). En forma interesante, se ha señalado una incidencia mayor de cáncer cervical en pacientes inmunocomprometidas debido a quimioterapia o enfermedad de Hodgkin (12); también se ha observado una frecuencia y recurrencia mayor de lesiones intraepiteliales del cervix en mujeres infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana que en la población general (13,14). Incluso en los Estados Unidos de Norteamérica la prevalencia de displasias cervicales es 10 veces mayor en pacientes infectadas con el VIH en relación a la población normal; además a partir de diciembre de 1992 el CDC de Atlanta considera al carcinoma cervical como otro criterio de S.I.D.A. (15).

Respuesta inmune contra los tumores. El principio fundamental de la inmunología de los tumores, se basa en la existencia de antígenos específicos de los tumores que le permiten al sistema inmune reconocer a las células cancerosas como extrañas y montar una respuesta contra ellas. La existencia de tales antígenos se demostró desde hace varias décadas en modelos experimentales de tumores inducidos por agentes externos (virus, agentes químicos y físicos).

Sin embargo, se había dudado su presencia en tumores espontáneos, tanto en el hombre como en los animales. En los últimos años, se han descrito cada vez más mutaciones en oncogenes, genes supresores u otras proteínas, motivadas por translocaciones cromosómicas, mutaciones puntuales, deleciones internas o inserciones virales en diferentes tumores humanos. Por lo menos en teoría, algunas de estas proteínas mutadas tienen la capacidad de generar una respuesta inmunológica contra las células tumorales que las exhiben (16). La respuesta inmune contra los tumores puede ser inespecífica y estar mediada por macrófagos, células asesinas naturales, células activadas por linfocinas y aún por los componentes que participan en la respuesta inflamatoria; o puede ser específica y mediada por linfocitos B a través de la producción de anticuerpos y fijación del complemento o citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, o mediada por linfocitos T a través de células citotóxicas y producción de citocinas. Las evidencias en modelos experimentales y por otro lado en la clínica sugieren que la respuesta inmune celular mediada por los linfocitos T es la respuesta efectora más importante contra los tumores inmunogénicos (17). Los linfocitos T reconocen a los antígenos tumorales o virales en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad clase I, esto quiere decir que las células tumorales o infectadas con virus deben expresar en forma correcta estas moléculas en la superficie para que puedan ser reconocidas por el sistema inmune celular (18). Por otro lado, las células tumorales que no expresan estos antígenos de histocompatibilidad, pueden ser reconocidas y destruidas por los linfocitos asesinos naturales o por las células activadas por linfocinas (19).

Se ha descrito en la literatura que la disminución en la expresión de las moléculas de histocompatibilidad clase I en la superficie de las células tumorales, tanto de algunos tumores humanos como murinos, se asocia a un mayor grado de malignidad. Así, se ha comunicado que en carcinomas de mama, colon, vejiga urinaria y riñón, más del 54% de los tumores presentan poblaciones celulares que sí expresan los antígenos de histocompatibilidad clase I, mientras que sus respectivas metástasis en aproximadamente un 75% son negativas (20).

Desde hace tiempo los patólogos han observado en diferentes tumores, la asociación entre el mayor grado de filtración con células respectivas del sistema inmune y un mayor pronóstico. Se considera que la infiltración por células del sistema inmune, representa una expresión de la respuesta inmune del huésped contra el tumor. Las células que infiltran los tumores corresponden a una población celular heterogénea que son atraídas por factores quimiotácticos y de adhesión celular. Sin embargo, se observan diferencias importantes en base a la estirpe o variedad histológica (17, 21, 22).

Respuesta inmune en cáncer de cervix y lesiones precursoras. Aparte de las evidencias en favor del papel del sistema inmune contra las infecciones por papiloma virus y cáncer cervical, aportadas por los estudios en pacientes con inmunodeficiencias, Crum y colaboradores revisaron en 1991 los problemas para abordar la patobiología y respuesta inmune contra la infección cervical por papilomavirus en particular desde el punto de vista serológico y del reconocimiento de los determinantes antigénicos virales (23). Además, se han reportado otros estudios que no han contemplado todas las etapas de la historia natural de este tumor. Así, se ha comunicado en las lesiones intraepiteliales escamosas con infección con el virus del papiloma humano: una disminución en el número de células de Langerhans intraepiteliales (24), un aumento en los linfocitos granulares grandes a nivel local (25), pero una disminución de la actividad asesina natural en sangre (26).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El carcinoma del cervix uterino es un problema de salud pública en nuestro país. La mayor incidencia de cáncer invasor y lesiones intraepiteliales escamosas del cervix uterino en paciente inmunocomprometidas, sugiere una participación importante del sistema inmune contra el desarrollo de este tumor; sin embargo se desconoce el patrón de respuesta de las células del sistema inmune a nivel local en las diferentes etapas de la historia natural del carcinoma invasor del cervix uterino. Así mismo no se conoce el grado de expresión de las moléculas de histocompatibilidad clase I, en las mencionadas etapas.

HIPOTESIS

HIPOTESIS

1. Los carcinomas invasores y lesiones intraepiteliales escamosas del cervix uterino muestran un patrón definido de infiltración de células del sistema inmune, en cuanto a número y población celular
2. Una proporción importante de tumores invasores del cervix uterino no expresa moléculas de histocompatibilidad clase I.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

General

Describir el patrón de infiltración de células del sistema inmune y expresión de los antígenos de histocompatibilidad clase I, en muestras de pacientes con carcinoma invasor y lesiones intraepiteliales escamosas del cervix uterino.

Particulares

1. Describir el patrón de respuesta y número de linfocitos T CD3+, CD4+, CD8+; linfocitos B CD19+, macrófagos CD68+ y células de Langerhans positivas al antígeno S-100a+, por mm² de tejido en muestras de cáncer invasor del cervix y lesiones precursoras.
2. Definir el porcentaje de tumores que no expresan moléculas de histocompatibilidad clase I, en muestras de carcinomas invasores del cervix uterino

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

Plan general.- Tomando en cuenta los resultados de las citologías exfoliativas (En acuerdo al sistema Bethesda), criterios de inclusión y exclusión, así como las consideraciones éticas, se tomaron biopsias de cervix a mujeres clasificadas en los siguientes grupos (confirmadas por estudios histopatológicos): Normales, LIEGB, LIEGA y Ca Invasor, para describir el patrón y número de células reactivas del sistema inmune (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD68+ y S-100a+) por mm² de tejido y el porcentaje de muestras positivas a los antígenos de histocompatibilidad clase I, mediante ensayos inmuno-histoquímicos, empleando los sistemas streptavidina-biotina o peroxidasa-antiperoxidasa.

Pacientes.- El estudio se realizó en un total de 41 pacientes de los servicios de Ginecología y Anatomía Patológica del Nuevo Hospital Civil de Guadalajara, se incluyeron mujeres de 20 a 60 años de edad, de condición socioeconómica baja y de residencia en el occidente del país en los últimos 10 años; se excluyó de la investigación a las pacientes que recibieron quimioterapia, radioterapia, drogas inmunosupresoras y/o datos clínicos, laboratoriales o de gabinete que sugirieron otras neoplasias, infección por VIH, estados inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunes e infecciones cervicovaginales; también se excluyeron mujeres embarazadas. En acuerdo al sistema Bethesda para el reporte citológico del cervix uterino, se estudiaron 10 pacientes con el diagnóstico de LIEGB, 10 con LIEGA, 11 con carcinoma invasor (10 escamosos y 1 adenocarcinoma) (INV), finalmente 10 mujeres con citología normal que cumplieron los mismos criterios de inclusión y exclusión de los grupos anteriores y a las cuales se les extirpó el útero por condiciones benignas que no implicaron patología cervical. En todos los casos el diagnóstico se corroboró mediante los estudios histopatológicos.

Consideraciones Éticas.- Se informó ampliamente a las integrantes de este estudio el motivo de la investigación y la importancia de su participación. Después de su aprobación por escrito se hicieron las tomas de las muestras que en todos los casos formaron parte del procedimiento diagnóstico y/o terapéutico realizado en los servicios de Ginecología y Anatomía Patológica del Nuevo Hospital Civil de Guadalajara.

Muestras.- Se tomó una biopsia del tumor o tejido cervical, de aproximadamente 100 a 150 mg de peso húmedo, la cual se dividió en dos fragmentos; uno para estudios histológicos de rutina, y el otro se incluyó en Tissue OTC (Amies Laboratories) y se preservó a -70 °C hasta que se realizaron los cortes de tejidos. Así mismo se tomaron muestras de secreción vaginal, endocervical y ectocervical para análisis en fresco, cultivo bacteriológico (gelosa sangre y gelosa chocolate) y micológico (Sabouraud), inmunofluorescencia directa para *Chlamydia trachomatis* (Syva Company), para excluir a las pacientes con microorganismos patógenos (excepto pacientes positivas al VPH). También, se tomaron 5 ml de sangre venosa sin anticoagulante en tubo al vacío, con la finalidad de obtener el suero para la determinación de anticuerpos contra VIH 1 y 2 (Testpack, Abbott Laboratories) y descartar a las mujeres seropositivas .

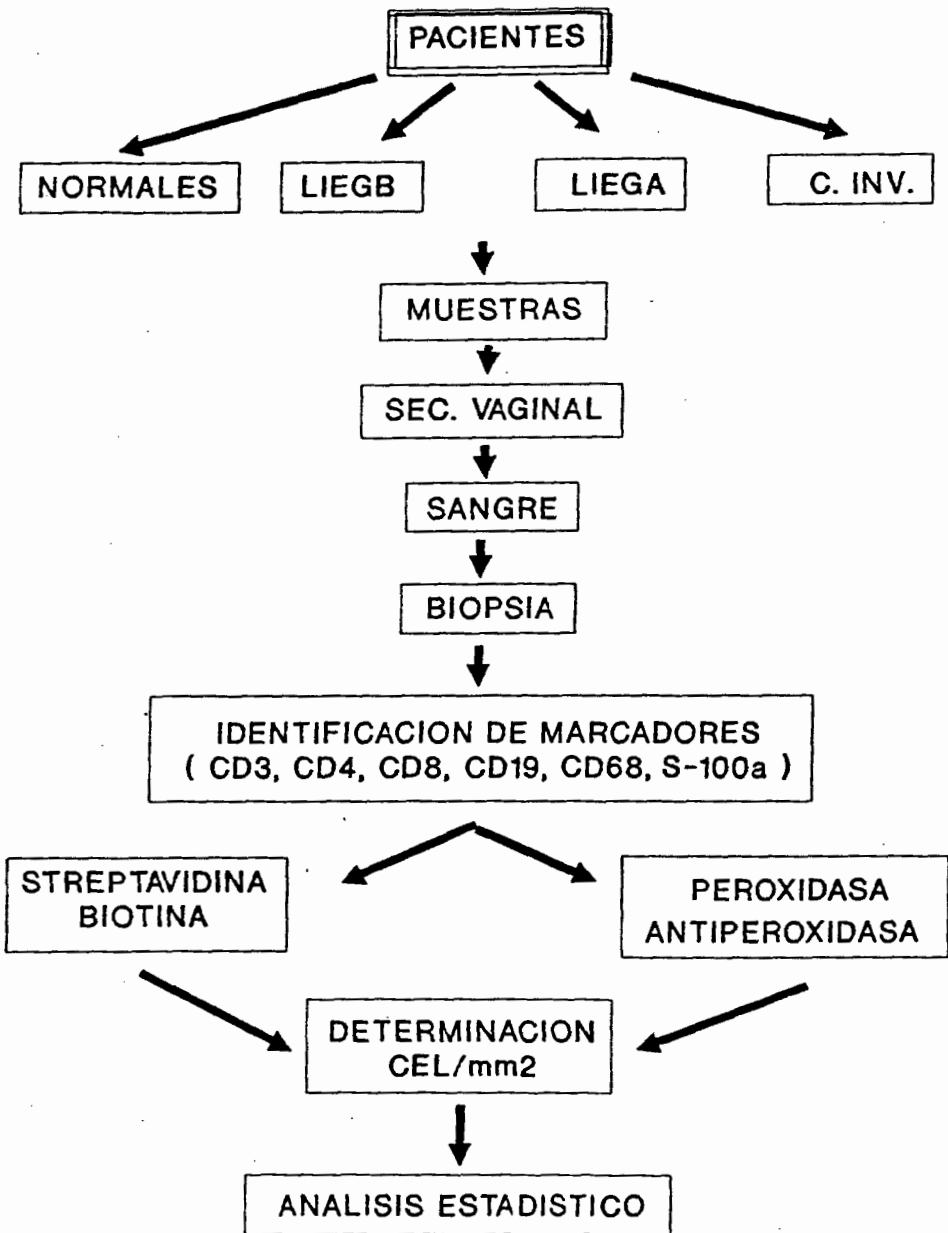
Ensayos inmuno-histoquímicos con streptavidina-biotina.

A partir de las muestras de tejidos incluidos en tissue OTC, se realizaron cortes de 5 a 7 μ m de grosor en criostato. Después de fijar los cortes (portaobjetos) en acetona durante 2 minutos, se lavaron por inmersión en una solución Tris-fosfato 0.050 M pH 7.2 (solución lavadora); para enseguida bloquear la actividad de peroxidasa endógena, mediante peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo de la unión inespecífica a proteínas se realizó con suero de cabra no inmune estandarizado para este fin. Para identificar a las células infiltrantes se incubaron anticuerpos monoclonales contra: CD3 (1: 100), CD4 (1: 20), CD8 (1:20), CD19 (1:25) y CD 68 (1: 75) (Dako Corporation) y para la observación de los antígenos de

histocompatibilidad clase I: anticuerpo monoclonal anti-antígeno HLA clase I humano (1: 100) (Dako Corporation) a las diluciones señaladas en los paréntesis, durante 20 minutos a temperatura ambiente; seguido de un lavado e incubación durante 20 minutos con anticuerpos biotinilados de cerdo contra inmunoglobulinas de ratón (Dako Corporation). Después de otro lavado se incubaron las muestras con streptavidina conjugada con peroxidasa durante el mismo lapso de tiempo, y otro lavado e incubación con 3-amino-9-etilcarbazol en N,N dimetil-formamida y peróxido de hidrógeno al 0.3% por 20 minutos a la temperatura ambiente. Finalmente se lavaron los cortes en agua desmineralizada, se contratiñeron en hematoxilina de Mayer y se montaron en gelatina-glicerol. La observación se realizó en un microscopio de luz con un lente para medición morfológica (Carl Zeiss, Alemania) por 3 personas diferentes en la cual se observó que las células tomaron una coloración roja . Como control negativo se empleó suero no inmune de ratón y como positivos, muestras con células de cada antígeno (27).

Ensayos inmuno-histoquímicos con peroxidasa-antiperoxidasa. El proceso de fijación y bloqueo fue similar al descrito para la técnica anterior. Para identificar las células de Langerhans se incubaron los cortes de tejido con anticuerpos policlonales prediluidos (de conejo contra la proteína S-100a o antígenos del papiloma) toda la noche a 4 °C. Después de un lavado en Tris-fosfatos 0.050 M pH 7.2 durante 5 minutos, se cubrieron las muestras con anticuerpos porcinos contra inmunoglobulina de conejo durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavado e incubación con anticuerpos de conejo anti-peroxidasa ligados a peroxidasa de rábano por otro período igual de tiempo. Después de otro lavado, se agregó el substrato (3-amino-9-etilcarbazol en N,N dimetil-formamida y peróxido de hidrógeno al 0.3%) y se incubó 10 minutos al ambiente (Dako PAP Kit system 40, Dako Corporation). La preparación final de las laminillas y su lectura fue similar a la descrita con streptavidina-biotina (28).

Análisis Estadístico. El número de células positivas a los diferentes antígenos se reportó como el promedio \pm error estandar por mm² de tejido, los resultados de los 4 grupos de estudio se realizaron mediante la prueba de U Mann-Whitney.



RESULTADOS

RESULTADOS

En acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión del proyecto, resultados histopatológicos y consideraciones éticas, se seleccionaron 11 mujeres con tumores cervicales invasores y 10 de cada grupo restante, de un total de 85 mujeres registradas. El promedio de edad fue similar en los 4 grupos (cercano a los 40 años), con rangos de 30 a 65 años de edad. Todas las pacientes con tumores invasores escamosos, correspondieron a carcinoma epidermoide invasor de células grandes no queratinizantes moderadamente diferenciado, mientras que el adenocarcinoma fue del tipo papilar bien diferenciado. Por su parte de las lesiones intraepiteliales de Grado Alto, el 50% correspondió a *Ca in situ*; el 29 % a displasias severas y el 21 % a displasias moderadas. En el 60 % de las Lesiones de Grado Alto, se encontraron evidencias histopatológicas y presencia de antígeno del virus del papiloma (fotografía N° 1), contra el 70 % de las de Grado Bajo que en todos los casos correspondieron a displasias leves.

Células de Langerhans S-100a+. En la figura 1, se observa que no hay una diferencia significativa en el número de células de Langerhans por mm² de tejido al comparar el epitelio ectocervical normal con el epitelio de LIEGB, LIEGA y epitelio ectocervical adyacente a tumores invasores a tumores invasores. Sin embargo al separar las LIEGB y LIEGA en positivas y negativas respecto a evidencias citológicas e inmunológicas de infección por virus del papiloma humano, se observó un comportamiento bimodal, donde la presencia de cambios displásicos sin infección con este virus se asocia a un incremento significativo del número de células de Langerhans por mm² de tejido (LIEGB : 47.39 ± 14.84 ; LIEGA : 45.20 ± 8.34) en contraste con una disminución en las lesiones displásicas con evidencias de infección por papilomavirus (LIEGB : 10.76 ± 2.53 ; LIEGA: 10.20 ± 3.13) en comparación a los tejidos normales (figura N° 2).

Linfocitos T CD3+ y sus subpoblaciones CD4+ y CD8+. En el epitelio ectocervical y estroma de las muestras normales del cervix, se observan muy escasos linfocitos T y sus subpoblaciones CD4+ y CD8+. En tanto, en las LIEGB se observa 8 veces más linfocitos CD3+, principalmente CD4+ (fotografía N° 2) y en menor grado CD8+ sin un patrón general y principalmente en el estroma subyacente, se apreciaron algunos agregados focales y otros en forma difusa. También en las LIEGA se observó un incremento equivalente, principalmente en el estroma subyacente, pero con un predominio no significativo de células CD8+ en relación a CD4+ en patrones con predominio focal sobre los difusos. En los casos de *Ca in situ*, se observó un infiltrado en banda de linfocitos CD4+ subyacente al epitelio cervical (fotografía N° 3). En los cortes de tumores invasores se observó una mayor variabilidad en cuanto al número y patrón de células infiltrantes T, con un predominio de células CD4+ (patrón difuso) sobre CD8+ (patrón focal) entre las células tumorales (fotografía N° 4) y zonas adyacentes del estroma (datos sumarizados en la figura 3).

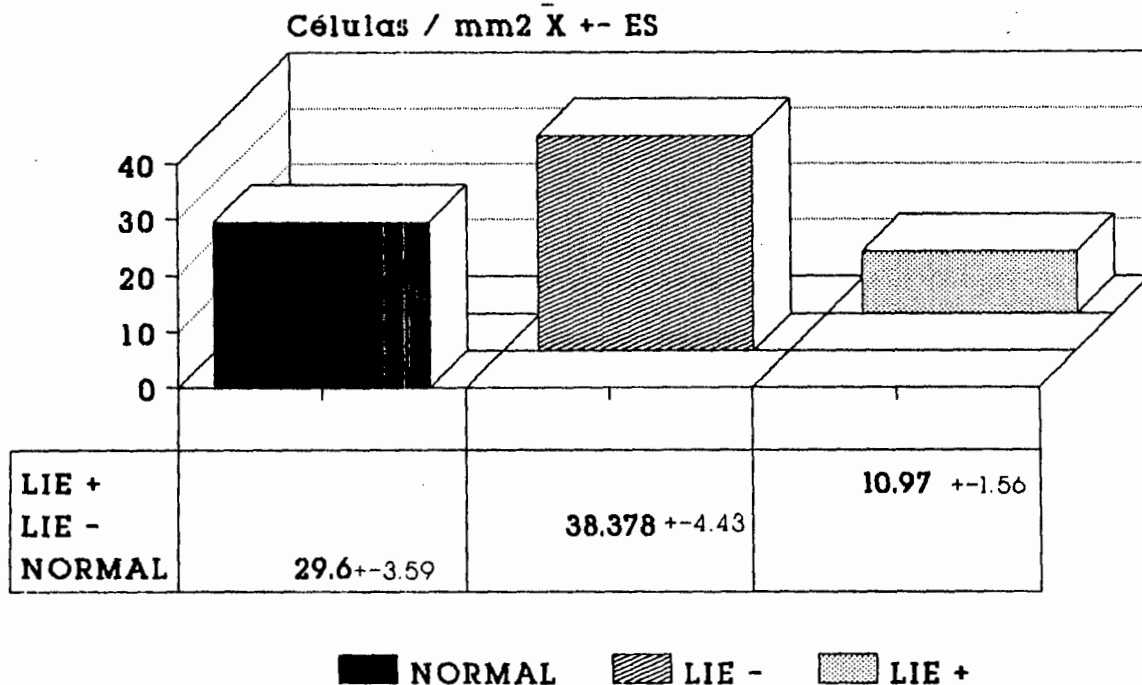
Linfocitos B CD19+. Se observan escasos linfocitos B en forma aislada, en el estroma subyacente al epitelio ectocervical de tejidos normales. Por su parte en las LIEGB se observa en promedio aproximadamente 10 veces más células CD19+ con patrón focal (fotografía N° 5) y una variación importante entre una muestra y otra. En las LIEGA y tumores invasores, se observa un número intermedio de estas células en relación al grupo normal y LIEGB, con patrón difuso en LIEGA y focal entre las células tumorales invasoras (figura 4).

Macrófagos CD68+. Se observaron escasos macrófagos en el estroma de los tejidos normales del cervix, mientras que en las LIEGB se apreció un promedio de aproximadamente 30 veces más macrófagos en patrones difusos y en menor grado focal en el estroma subyacente al epitelio ectocervical (fotografía 6). Por su parte en las LIEGA y tumores invasores se cuantificaron promedios intermedios de macrófagos con un predominio de patrón focal. Es importante mencionar que la variación entre las muestras fue alta en todos los grupos (figura N° 4).

Expresión de antígenos de histocompatibilidad clase I. En las muestras de tejidos normales, se observó un marcaje intenso en el ectocervix (fotografía N° 7), endocervix, endotelio de vasos sanguíneos y células del estroma. En algunas muestras de LIEGB (30%) se notó un marcaje irregular en la zona profunda (fotografía N° 8). El 50 % de los tumores invasores estudiados, no expresaron antígenos de histocompatibilidad clase I, o lo expresaron solamente en algunos segmentos de los tejidos malignos (fotografía N° 9).

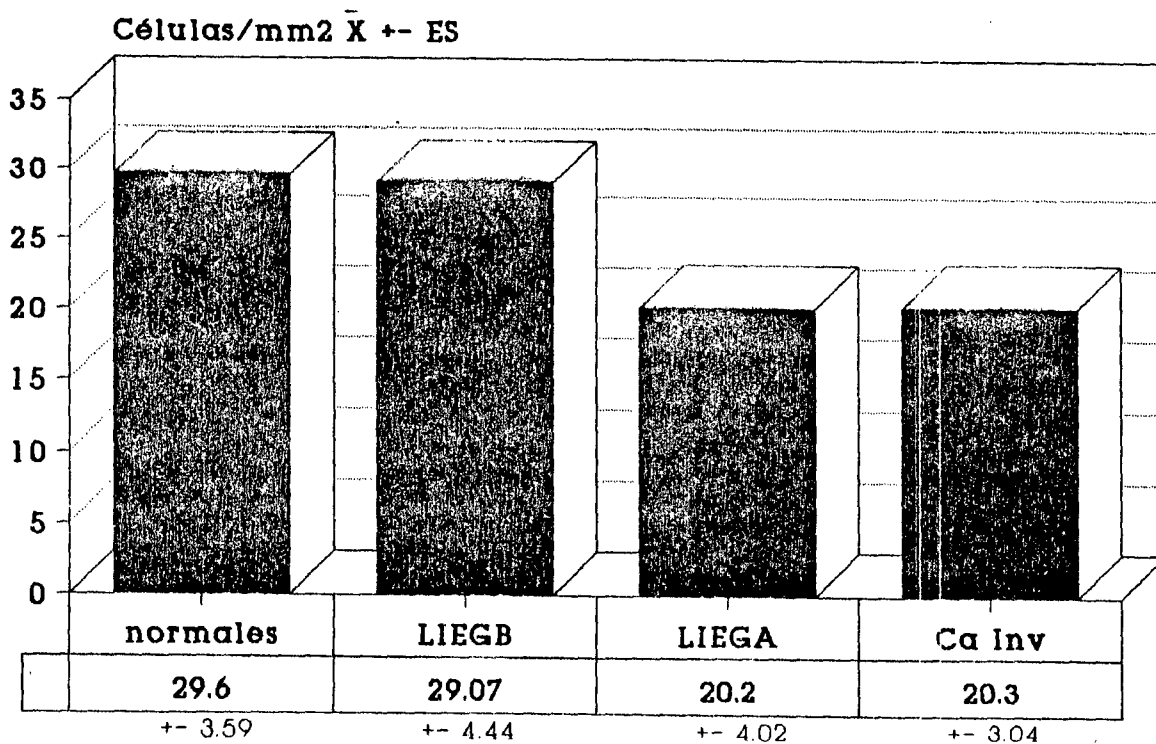
FIGURAS Y FOTOS

Fig 2 Células de Langerhans en tejidos con LIE de acuerdo a la infección o no con virus del papiloma.



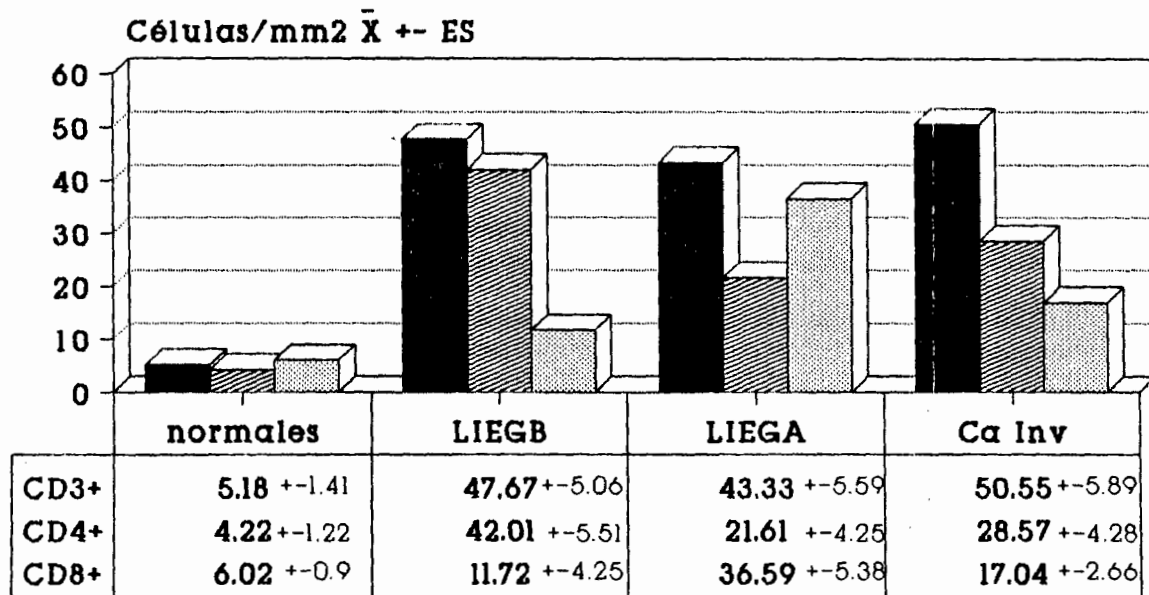
gpo. normal vs lie - n.s.
 gpo. lie - vs lie+ p(0.05)

Fig 1. Células de Langerhans en tejidos con cáncer cervical invasor y lesiones precursoras.



La comparación entre los 4 grupos por la U de M resultó no significativa

Fig 3 Subpoblaciones de linfocitos T en tejidos con cáncer cervical invasor y lesiones precursoras.



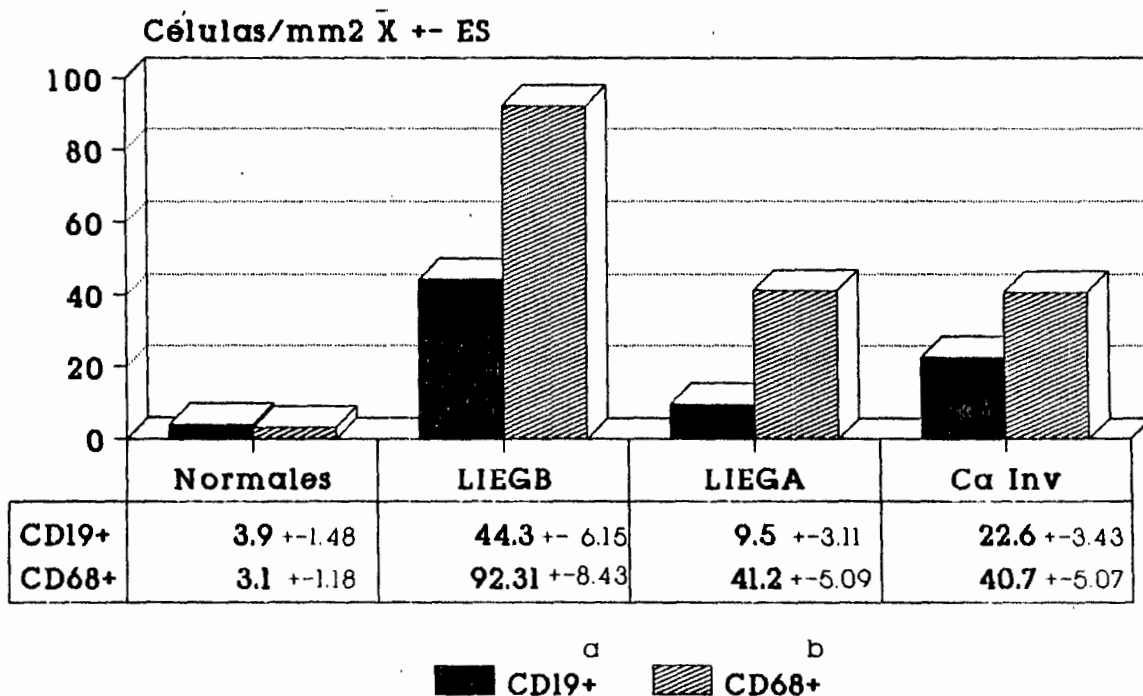
^a CD3+
 ^b CD4+
 ^c CD8+

a gpo. normal vs liegb, liega, inv p<0.025

b gpo. normal vs liegb p<0.025, gpo. normal vs liega p<0.05, gpo. normal vs inv p<0.025

c gpo. normal vs liegb n.s., gpo. normal vs liega, inv p<0.025

Fig 4 Linfocitos B y macrófagos en tejidos con cáncer cervical invasor y lesiones precursoras.



a gpo. normal vs liegb p<0.025, gpo. normal vs liega n.s., gpo. normal vs inv p<0.01
 b gpo. normal vs liegb, liega, inv p<0.005

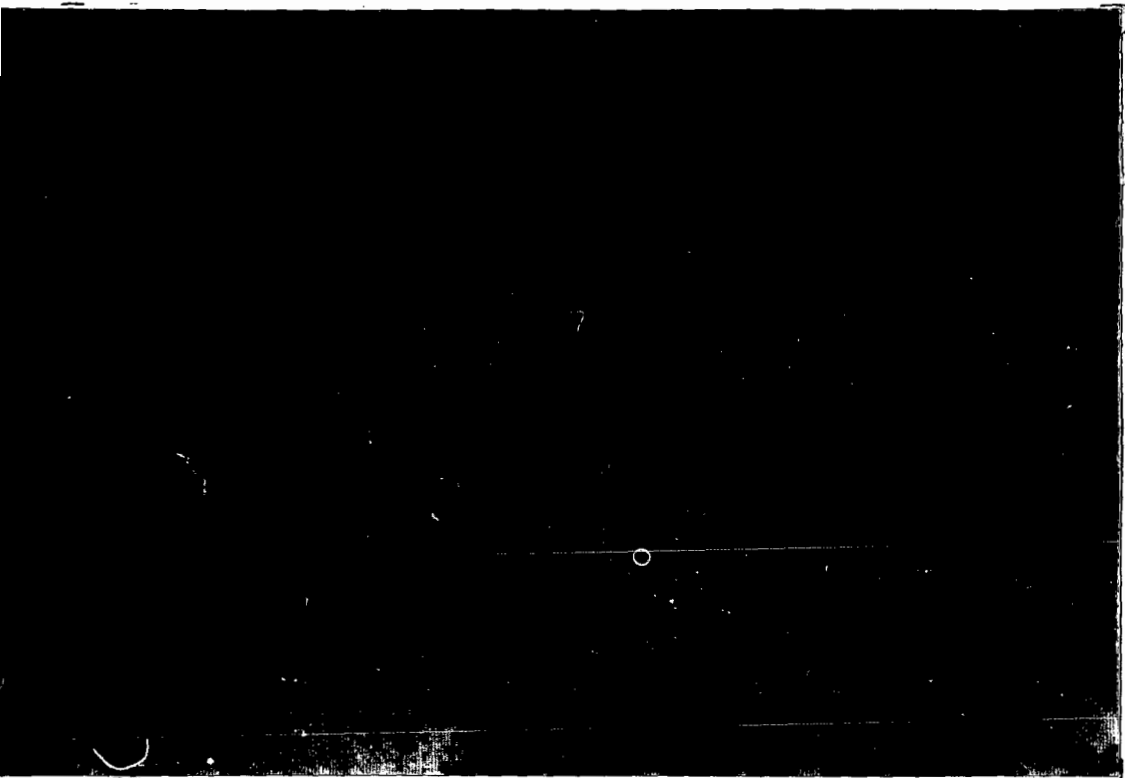


FOTO N°. 1 Se observa epitelio cervical con LIEGA, donde se aprecian células positivas a antígenos del virus del papiloma con un patrón nuclear (aumento 10) Nota: sin contratinción de Hematoxilina de Mayer.



FOTO N°. 2 Se observa en el estroma un infiltrado difuso de linfocitos CD4 + entre las glándulas endocervicales de un epitelio con LIEGB (aumento 10 x).

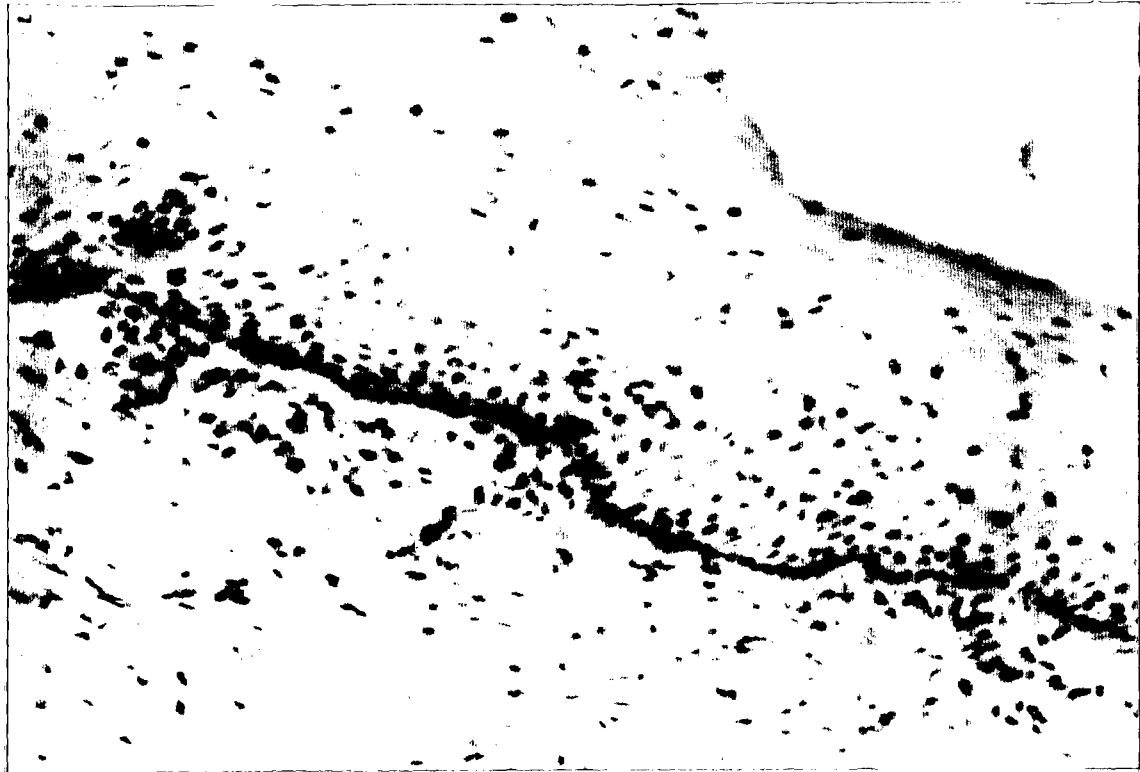


FOTO Nº. 3 Se observa un epitelio cervical con displasia leve, (adyacente a un Ca *in situ*) en el cual se observa un infiltrado en banda de linfocitos CD4+ en el estroma subyacente (aumento 10 x).

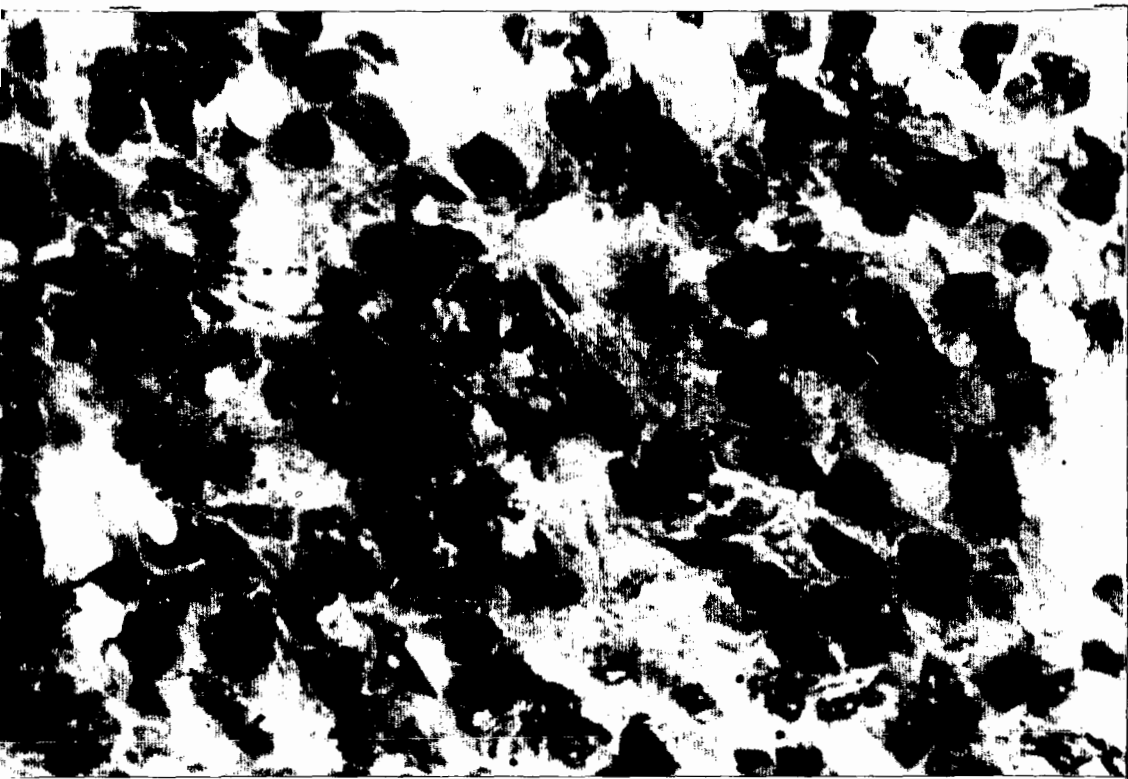


FOTO N°. 4 Se observan 3 linfocitos CD4+ entre los cordones de células de un tumor invasor del cervix (aumento 40 x).

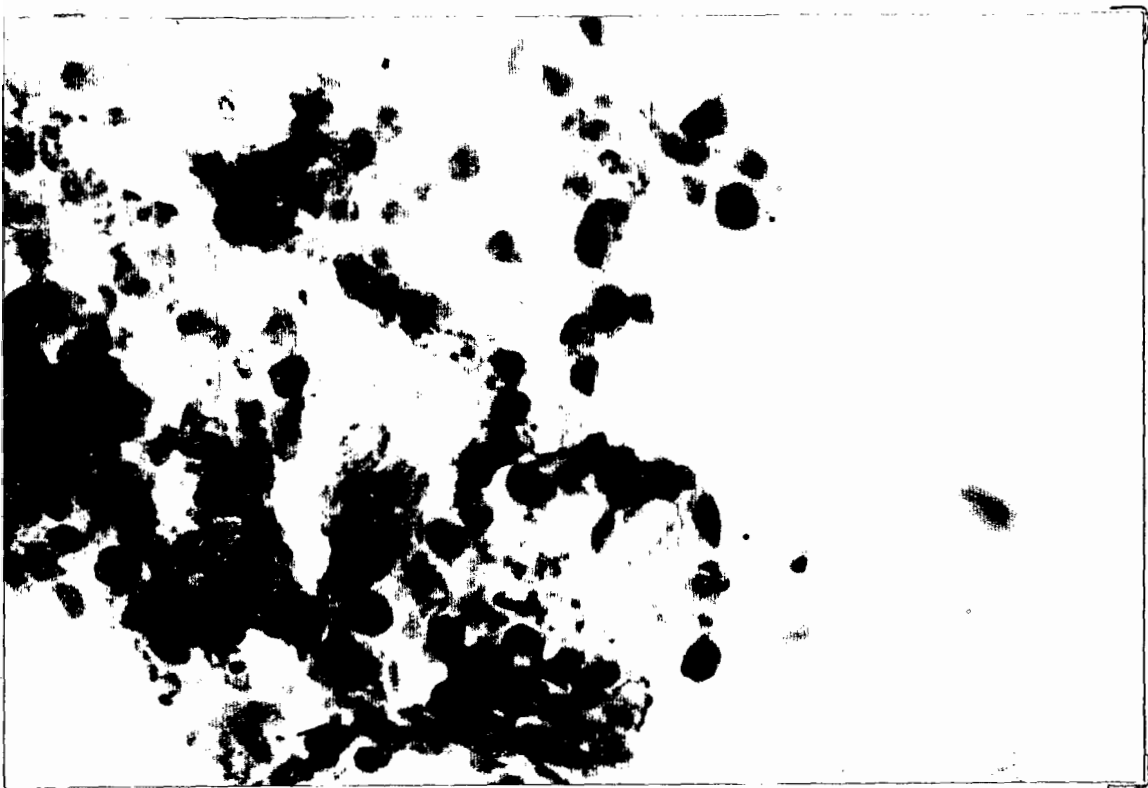


FOTO N°. 5 Se observa un infiltrado inflamatorio focal, de células CD19+ en el estroma subyacente a un epitelio con LIEGB (aumento 40 x).

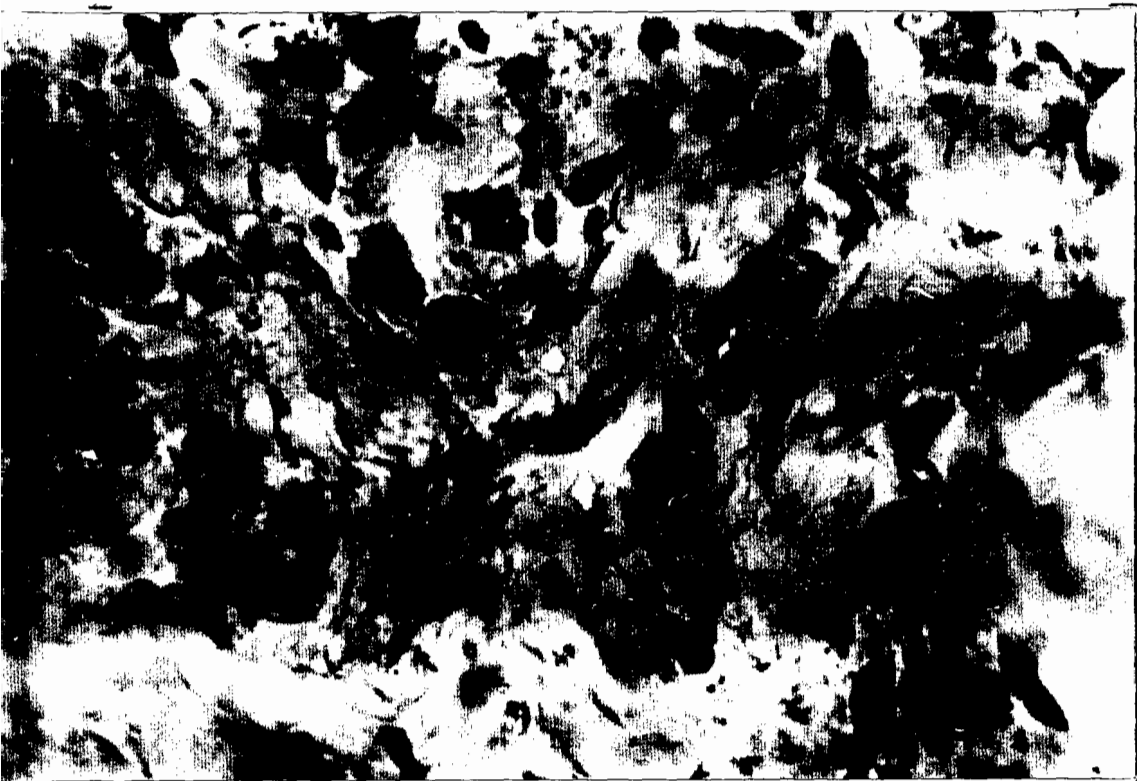


FOTO N°. 6 Se observa un infiltrado inflamatorio difuso donde se aprecian macrófagos (células CD68+) en el estroma subyacente de un epitelio cervical con LIEGB (aumento 40 x).



FOTO N°. 7 Se observa un epitelio cervical sin alteraciones morfológicas, donde se aprecia un marcaje y distribución normal de los antígenos de histocompatibilidad clase I, con una disminución en la intensidad a medida que maduran las células hacia la superficie (aumento 40 x).



FOTO N°. 8 Se observa un epitelio cervical con una zona profunda de LIEBG, donde se observa un marcaje irregular de los antígenos de histocompatibilidad clase I, mientras que en la zona superficial el marcaje es regular (aumento 20 x).

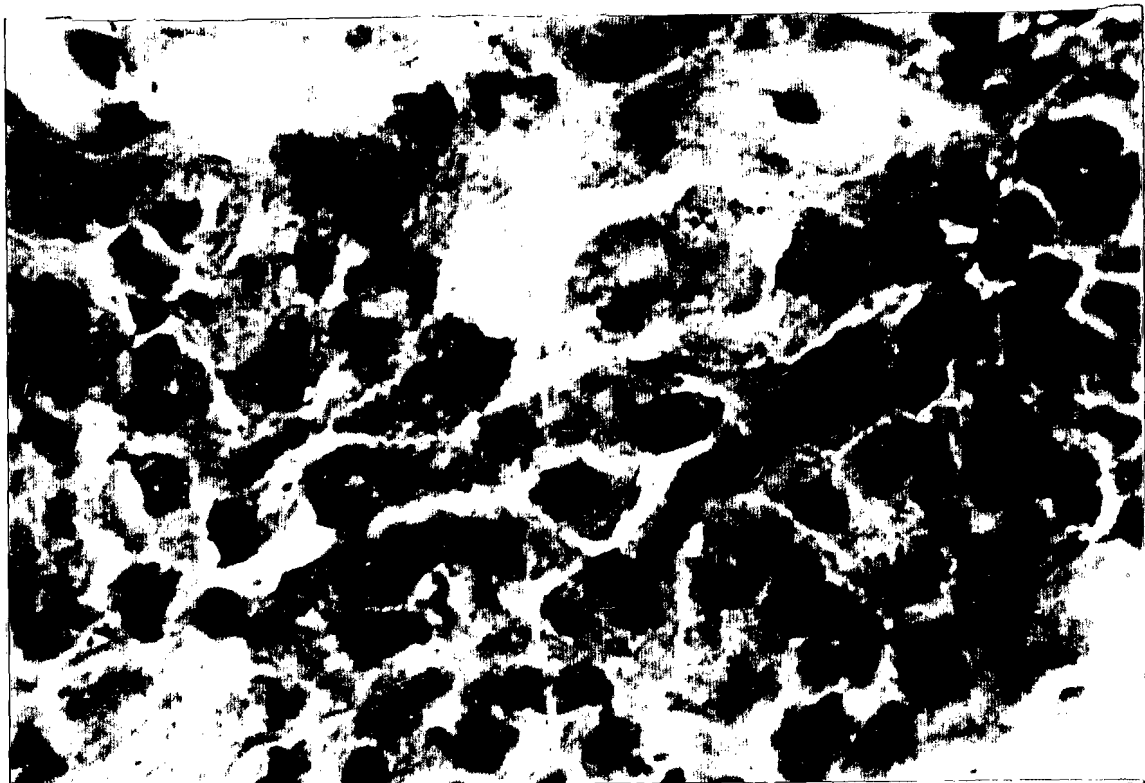


FOTO N°. 9 Se observan células tumorales de un carcinoma invasor del cervix, que no expresan antígenos de histocompatibilidad clase I, nótese el polimorfismo, hiper cromasia y dicariosis (aumento 20 x).

DISCUSSION

DISCUSION

Los controles negativos y positivos que se emplearon cada vez que se realizaron los procedimientos inmunohistoquímicos con streptavidina-biotina y peroxidasa-anti-peroxidasa, aseguraron un adecuado control de calidad, ya que en ningún caso se observó un control falso positivo o negativo. Es importante resaltar que se observó una variabilidad importante entre una muestra y otra, aún dentro del mismo grupo de estudio, lo cual refleja la variabilidad biológica de las mujeres estudiadas y la participación de agentes externos que no fue posible controlar, a pesar de que se excluyeron los casos que presentaron agentes patógenos en los estudios microbiológicos. Si bien, no se observó una diferencia significativa global del número de células de Langerhans por mm² de tejido entre los cuatro grupos estudiados, al separar las LIE como positivas o negativas a la infección por virus del papiloma humano, resultó una disminución significativa en las muestras positivas en contraste a un importante aumento en los tejidos displásicos sin evidencia de una infección productiva por papilomavirus. Desconocemos el significado de estos hallazgos, pero datos similares fueron publicados por McArdle y Colaboradores; estos autores sugieren que el aumento de las células de Langerhans podría corresponder a una forma de respuesta contra neoantígenos en las células displásicas ya que no presentan una infección por papilomavirus activa, pero que tal vez progresan hacia cáncer invasor (24). Resulta interesante que los hombres con infección genital por papilomavirus, presentan una disminución de estas células en el epitelio del pene, pero retornan a cifras normales después del tratamiento con 5-fluoracilo (29). Sin lugar a duda, las células de Langerhans re presentan un componente fundamental en el procesamiento y en la presentación de antígenos a los linfocitos T en la piel y mucosas, particularmente ante la presencia de interleucina 1 y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (30), lo que sugiere que

su disminución durante la infección por papilomavirus podría ocasionar una pobre respuesta inmune celular.

Resulta difícil establecer un patrón único de respuesta de linfocitos T, B y macrófagos en el cáncer del cervix uterino y lesiones precursoras, sin embargo tomando en su conjunto los resultados, nos sugieren que en las LIEGB, predomina un tipo de respuesta inflamatoria a base de macrófagos, linfocitos B y linfocitos T inductores/ cooperadores que pudieran mediar la reacción contra diferentes tipos de agentes, tanto virus (cualquiera de los tipos de VPH que infectan el tracto genital femenino), tal vez bacterias no consideradas patógenas clásicas, ya que excluimos a las muestras positivas a microorganismos patógenos u otros microorganismos no detectados por nuestros sistemas. Contrasta la respuesta en las LIEGA, donde predominan los macrófagos y células CD8+, tal vez en respuesta citotóxica contra los cambios antigénicos a nivel de membrana que acompañan a las displasias más avanzadas e infecciones virales por los tipos del VPH que se asocian a estas lesiones. Por su parte resulta interesante el infiltrado en banda de células CD4+ inmediatamente subyacente al epitelio en los *Ca in situ*, como si fuera una barrera para que no atravesasen las células tumorales la membrana de basamento. Finalmente en los tumores invasores se observa una respuesta variable de macrófagos y células CD4+ y escasa participación CD8+. En un artículo en Japonés, del cual se obtuvo un resumen en inglés (31), se señala que en los tumores invasores cervicales predominan los linfocitos CD4+, similar a lo reportado en este trabajo, sin embargo, al parecer no estudiaron lesiones precursoras ni investigaron linfocitos B, macrófagos o células de Langerhans. Otros estudios se han interesado en la participación de las células asesinas naturales y se ha reportado que estas células se encuentran presentes en las infecciones cervicales por VPH y displasias, sin embargo líneas cervicales infectadas por VPH, son resistentes a la actividad de estas células y sensibles a las células activadas por linfocinas (32). Lo anterior sugiere la importancia de la participación de células productoras de linfocinas que entre otras funciones pudieran generar células activadas por linfocinas *in vivo*.

La inexpressión de los antígenos de de histocompatibilidad clase I en el 50 % de los tumores invasores del cervix, nos señala que sus células malignas no tienen la oportunidad de ser reconocidas como extrañas por los linfocitos T. Desconocemos si los tumores que no expresaron estos antígenos, tienen un comportamiento más agresivo como ha sido reportado en la literatura con otros tumores (20). Por otro lado se ha reportado que el 80.8% al 83% de los tumores invasores cervicales expresan en forma aberrante antígenos de histocompatibilidad clase II, sin conocerse su repercusión biológica (31, 33). Probablemente uno de los hallazgos más interesantes de este trabajo, se refiere al marcaje irregular de los antígenos de histocompatibilidad clase I, en las lesiones precursoras particularmente en las zonas profundas, lo cual sugiere que aún antes del establecimiento de los tumores invasores, ya se han generado cambios que pudieran involucrar dificultades en el reconocimiento antigénico por la respuesta inmune celular, mediada por los linfocitos T .

Tomando en su conjunto nuestros resultados, consideramos que se han generados más preguntas que respuestas, en relación a la respuesta inmune contra el cáncer cervical y lesiones precursoras, por ejemplo ¿los linfocitos reactivos en los tumores invasores y lesiones precursoras cervicales, presentan actividad citotóxica contra células tumorales o infectadas por VPH? ; ¿cuál es el papel de las diferentes citocinas en esta respuesta inmunológica? ¿la inexpressión de las moléculas de histocompatibilidad clase I, en este tumor se asocia a mayor agresividad y mal pronóstico?; ¿es factible el desarrollo de vacunas contra VPH que prevengan el cáncer cervical?, entre otra preguntas que son fundamentales en el conocimiento de la historia natural completa del cáncer de cervix uterino y de su prevención y tratamiento.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se observó una variabilidad importante en el número de células / mm² entre las muestras de un mismo grupo, principalmente en cáncer cervical.
2. No se pudo definir patrones únicos de respuesta de células del sistema inmune en cáncer cervical y lesiones precursoras, pero sí tendencias en cada grupo estudiado.
3. Dentro de las lesiones precursoras se observó que la presencia de infección activa por papilomavirus, se asoció a una disminución significativa de las células de Langerhans en comparación a las lesiones sin manifestaciones activas de infección.
4. El 50 % de los tumores invasores del cervix uterino, no expresa moléculas de histocompatibilidad clase I.
5. En las lesiones precursoras, principalmente LIEGA, se aprecia una disminución en la intensidad de los antígenos de histocompatibilidad clase I.
6. Se requieren otros estudios y estrategias para contestar las interrogantes que no se contestaron en este estudio.

BIBLIOGRAFIA

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Registro Nacional del Cáncer, G. G. E., Secretaría de Salud. México, 1989.
- 2.- Ambros R. A., Kurman R. J.: Current concepts in the relationships of human papillomavirus infection to the pathogenesis and classification of precancerous squamous lesions of the uterine cervix. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 1990; 7:158-172.
- 3.- Reeves W. C., Rawls W. E., Brinton L. A.: Epidemiology of genital papillomavirus and cervical cancer. *Rev. Infectious Dis*. 1989; 11:426-439.
- 4.- Daneri-Navarro A., Del Toro-Arreola A.: Cáncer del cervix uterino y virus del papiloma humano. *Infectol. Microbiol. Clin. (Méx)*. 1991; 11:11-16.
- 5.- Dyson N., Howley P. M., Münger K., Harlow E.: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989; 243:934-937.
- 6.- Wernes B. A., Levine A. J., Howley P.M.: Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990; 248:76-79.
- 7.- Brinton L. A., Schairer C., Haenzel W., et al: Cigarette smoking and invasive cervical cancer. *J. A. M. A*. 1986; 255:3265-3269.
- 8.- Brinton L. A., Huggins G. R., Lehman H. F., et al: Long term use of oral contraceptives and risk of invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer*. 1989; 43:511-518.
- 9.- La Vecchia C., Franceschi S., Decarli A., et al: Dietary vitamin A and the risk of invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer*. 1984; 34:319-322.

- 10.- Rommery S. L., Duttagupta C., Basu J., et al: Plasma vitamin C and the uterine cervical dysplasia. *Am J. Obstet. Gynecol.* 1985; 151:976-980.
- 11.- Butterworth C. E., Hatch K. D., Gore H., et al: Improvement in cervical dysplasia associated with folic acid therapy in users oral contraceptives. *Am. J. Clin. Nutr.* 1982; 35:73-82.
- 12.- Sillman F. S., Stanek A., Sedlis A: The relationship between human papillomavirus and lower genital intraepithelial neoplasia in immunosuppressed women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1984; 150:300-308.
- 13.- Vermund S.H., Kelley K. F., Llein R. S., Feingold A. R., Schreiber K., Munk G., Burk R. D.: High risk of human papillomavirus infection and cervical squamous intraepithelial lesions among women with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1991; 165:392-400.
- 14.- Maiman M., Fruchter R. G., Serur E., Levine P. A., Arrastia C. D., Sedlis A.: Recurrent cervical intraepithelial neoplasia in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet. Gynecol.* 1993; 82:170-174.
- 15.- M. M.W.R.: 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents an adults. 1992; 41:1-3.
- 16.- Urban J. L., Schreiber H.: Tumor antigens. *Annu. Rev. Immunol.* 1992; 10:617- 644.
- 17.- Duckett T., Beldegrun A.: Immunology in cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 1992; 4:149-155.

- 18.- Ruíz-Cabello F., Klein E., Garrido F.: MHC antigens on human tumors. *Immunol. Lett.* 1991; 29:181-189.
- 19.- Ramírez R., Solana R., Carracedo J. Alonso M. C., Peña J.: Mechanisms involved in NK resistance induced by interferon-gamma. *Cell Immunol.* 1992; 140: 248- 256.
- 20.- Cordon-Cardo C., Fuks Z., Drobnjak M., Moreno C., Eisenbach L., Feldman M.: Expression of HLA-A,B,C, antigens on primary and metastatic tumor cell populations of human carcinomas. *Cancer Res.* 1991; 51:6372-6380.
- 21.- Gotoh K., Gouchi a., Akura Y., Tonaka N., Orita K.: Augmentation of cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes by biological response modifiers. *Int. J. Immunopharmacol.* 1991; 13:485-492.
- 22.- Nomura N., Uno E., Tamatani T., Miyasaka M., Susuki K., Susuki A., Kikuchi K., Uede T.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors. VI. The effect of lymphocyte chemotactic factors on lymphocyte adhesion to endothelial cells. *Int. Immunol.* 1992; 4:407-415.
- 23.- Crum C. P., Barber S., Roche J. K.: Pathobiology of papillomavirus-related cervical diseases: prospects for immunodiagnosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 4:270-285.
- 24.- Mc Ardle J. P., Muller K. H.: Quantitative assesment of Langerhans cells in human cervical intraepithelial neoplasia and wart virus infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1986; 154:509-515.
- 25.- McKenzie J., King A., Hare J., Fulford T., Wilson B., Stanley M.: Immunocytochemical characterization of large granular lymphocytes in normal cervix and HPV associated disease. *J. Pathol.* 1991; 161:75-80.

- 26.- Romanini C., Ciavattini A., Cignitti M., Tranquilli A. L., Valensise H., Garzetti G. G.: Lymphocyte subset in HPV infection. *Eur. J. Gynecol. Oncol.* 1992; 13:189-191.
- 27.- Giorno R.: A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn. Immunol.* 1984; 2: 161.
- 28.- Nadji M., Morales A. R.: Immunoperoxidase: Part I. The technique and its pitfalls. *Lab. Medicine.* 1983; 14:767-778.
- 29.- Morelli A. E., Ronchetti R. D., Secchi A. D., Cufre M. A., Paredes A., Faimboim L.: Assessment by planimetry of Langerhans cell density in penile epithelium with human papillomavirus infection: changes observed after topical treatment. *J. Urol.* 1992; 147:1268-1273.
- 30.- Heufler C., Koch F., Schuler G.: Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 1998; 167:700-705.
- 31.- Nakamura M: Immunohistological study on HLA class II antigen expression and lymphocyte infiltration in cancer tissues of the uterine cervix. *Nippon-Sanka-Fujinka-Gakkai-Zasshi.* 1992; 44:349-356. (Resumen en inglés, Medline).
- 32.- Evans C. H., Flugelman A.A., Diapolo J.A.: Cytokine modulation of immune defenses in cervical cancer. *Oncology.* 1993; 50:245-251.
- 33.- Glew S. S., Duggan-Keen M., Cabrera T., Stern P.L.: HLA class II antigen expression in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Res.* 1992; 52:4009-4016.

DR. CARLOS BEAS ZARATE
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

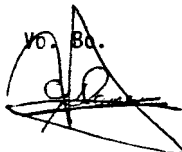
Por medio de la presente pongo a su consideración mi protocolo de tesis ti
tulado "CELULAS REACTIVAS DEL SISTEMA INMUNE EN CANCER DE CERVIX UTERINO -
Y LESIONES PRECURSORAS" que voy a realizar en el Instituto de Patología -
Infecciosa y Experimental "Dr. Francisco Ruíz Sánchez" de la Universidad -
de Guadalajara, bajo la dirección del M. en C. Adrián Daneri Navarro.

Sin otro particular, le reitero mi distinción y respeto.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. Marzo 13 de 1992

MARIA CECILIA HERNANDEZ ESCALONA
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN
BIOLOGIA

Yo, Bc.


M ERIC ADRIAN DANERI NAVARRO



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección
Expediente
Número

C. MARIA CECILIA HERNANDEZ ESCALONA
P R E S E N T E . . .

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "CELULAS REACTIVAS DEL SISTEMA INMUNE EN CANCER DE CERVIX UTERINO Y LESIONES PRECURSORAS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M.en C. Adrián Daneri Navarro.

A T E N T A M E N T E
"CIENCIA Y TRABAJO"
"AÑO DEL BIENTENARIO"
Guadalajara, Jal., 17 de Julio de 1991.
EL DIRECTOR



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C. *Adrián Daneri Navarro*
ADRIÁN DANERI NAVARRO
CIENTÍFICO CUENTAS LIMOS

EL SECRETARIO

Paula Escalona
BIOL. MARIO ALBERTO ESPINOSA ARANDA

M. en C. Adrián Daneri Navarro. Director de tesis para
obtener el expediente No. 11111111
MARIANA GIL

Al contestar este oficio citese fecha y número