

# Infiltración linfocitaria en el cáncer colorrectal. Valor pronóstico

MIRIAM CUATRECASAS FREIXAS

Servicio de Anatomía Patológica. Centro de Diagnóstico Biomédico. Hospital Clínic. Barcelona. España.

El carcinoma colorrectal (CCR) es el segundo en prevalencia y la tercera causa de muerte por carcinoma en el mundo occidental. Se incluyen como factores de riesgo para su desarrollo la historia personal o familiar de adenomas o CCR, la existencia de una enfermedad inflamatoria intestinal, la edad y determinados factores ambientales. Aunque el estadio TNM es el principal factor pronóstico, también los son determinadas alteraciones genéticas y epigenéticas, el microambiente tumoral y la infiltración linfocitaria<sup>1</sup>. Las alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo del CCR están muy bien caracterizadas<sup>2</sup>, aunque es menos conocido el papel del microambiente tumoral<sup>3</sup>. El tumor altera la homeostasis de los tejidos vecinos iniciando varios mecanismos, incluida la activación de la inflamación y de la respuesta inmunitaria<sup>4,5</sup>.

Recientemente, se ha demostrado la influencia de la respuesta inmunitaria del huésped en la progresión y el riesgo de recidiva tumoral<sup>6-8</sup>. Ante la evidencia de que los marcadores inmunológicos sistémicos y locales no son únicamente factores pronósticos, sino que tienen un valor predictivo superior al TNM, tanto en la evolución tumoral como en la supervivencia global y libre de enfermedad, se ha propuesto utilizar un índice o gradación inmune para clasificar los carcinomas, que podría tener implicaciones terapéuticas<sup>9-14</sup>.

## Tumor y huésped. Microambiente tumoral

El desarrollo y la progresión tumoral están dirigidos por alteraciones genéticas intrínsecas a las células tumorales y por factores epigenéticos y microambientales. El microambiente tumoral es una compleja red de varios tipos de células y mediadores intracelulares que incluye células inflamatorias, inmunes, estromales, endoteliales y epiteliales. Estos elementos contribuyen a la iniciación y participan de forma activa en la progresión, la diseminación tumoral y el desarrollo de metástasis. El sistema inmunitario del huésped es un factor microambiental que modula el desarrollo tumoral. Funciona como un guardián contra el desarrollo de tumores y tiene un papel en la supresión de la progresión del CCR, por lo que la interacción mutua entre células transformadas y microambiente modifica el destino del tumor<sup>15</sup>. Así, la secuencia de alteraciones moleculares en la transformación neoplásica de la enfermedad inflamatoria intestinal es diferente de la secuencia adenoma-carcinoma del CCR esporádico. Mientras que en la mucosa inflamatoria pueden existir múltiples puntos de displasia que señala un "efecto de campo", en el CCR esporádico las lesiones preneoplásicas suelen ser focales. La pérdida de función de *APC* es frecuente y precoz en el CCR esporádico, pero es rara y tardía en la secuencia displasia-carcinoma asociada a la enfermedad inflamatoria intestinal. Por el contrario, en los carcinomas asociados a colitis la mutación en *TP53* es un evento inicial que puede detectarse en mucosa no displásica, siendo tardía en el CCR esporádico<sup>16</sup>.

### Puntos clave

- Recientemente se ha observado que los tumores alteran el microambiente y la homeostasis de los tejidos vecinos, iniciando una activación de la inflamación y de los brazos innatos y adaptativos de la respuesta inmune.
- Varios estudios han demostrado la influencia de la respuesta inmune del huésped en la progresión y el riesgo de recidiva tumoral.
- Ante la evidencia de que la densidad y el tipo de infiltrado inflamatorio tumoral son un factor esencial para establecer el pronóstico de un carcinoma, se propone introducir un índice o gradación inmune como uno de los marcadores para clasificar los carcinomas.
- El índice inmune se basa esencialmente en el infiltrado de linfocitos T citotóxicos CD8+ en el tumor.
- Algunos autores han demostrado que el índice inmune es un factor pronóstico más potente que el TNM en la predicción de la supervivencia libre de enfermedad y en la supervivencia global, especialmente en el CCR.

## Inflamación y cáncer

El concepto de vínculo funcional entre inflamación y cáncer se basa en que los tumores atraen un influjo constante de células inflamatorias. Así, la inflamación crónica predispone a ciertos carcinomas, en especial al CCR<sup>17</sup>. Cuando las células del sistema inmunitario innato se encuentran en el microambiente tumoral, son polarizadas hacia una activación alternativa y actúan como un mediador inflamatorio que promueve el desarrollo tumoral, induce la proliferación de células iniciadas y altera la estroma<sup>18-21</sup>. En el desarrollo de carcinomas de mama, próstata y piel se ha descrito que la infiltración de células inmunes en lesiones displásicas aumenta con el grado de malignidad<sup>18,22</sup>. En colon se ha observado un aumento de factores angiogénicos, células inflamatorias (CD68, CD15, citocina, IL-6) y mediadores del sistema inmunitario innato, como TLR4, desde la mucosa normal al adenoma y adenocarcinoma. El eje TLR4-IL-6 es un vínculo molecular esencial entre inflamación y cáncer. La inflamación promueve la proliferación celular y el estrés oxidativo que daña el ADN, causa mutaciones, resistencia a la apoptosis y favorece las metástasis debido a la inestabilidad genética y metilación aberrante que interacciona con genes involucrados en vías de carcinogénesis colorrectal, como *TP53*, genes reparadores del ADN y factores como NF- $\kappa$ B. La activación de NF- $\kappa$ B estimula la IL-6 y contribuye a la carcinogénesis al inducir COX-2, aumentar la síntesis de prostaglandina E2 y activar la fosforilación de EGFR<sup>23,24</sup>. Todo ello inhibe la respuesta inmunitaria antitumoral, por lo que el huésped no reacciona contra el crecimiento tumoral. Muchos tumores, como el carcinoma renal, ovárico y CCR, tienen una expresión aumentada de IL-6 y TLR-4, que se asocia a peor pronóstico<sup>25</sup>. Esta vía de señalización está implicada en la regulación de la proliferación, supervivencia y metabolismo celular y es clave en la progresión tumoral<sup>25,26</sup>.

## Inmunidad antitumoral y CCR

Por otro lado, algunos autores han demostrado que una mayor infiltración por células inmunes es beneficiosa, ya que el sistema inmunitario del huésped tiene mecanismos antitumorales efectores con un importante papel en la supresión del crecimiento, la progresión y la recidiva tumoral<sup>12,27</sup>. Existe una relación entre las células procesadoras de antígenos y la presencia de linfocitos intratumorales.

En el CCR la presencia de abundantes linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se asocia a un mejor pronóstico, lo que implica que la modulación de los componentes de la maquinaria procesadora de antígenos, íntimamente ligada a los linfocitos intratumorales, puede aumentar la respuesta inflamatoria antitumoral y mejorar el pronóstico de estos pacientes<sup>28</sup>. Así, un microambiente tumoral con gran cantidad y densidad de linfocitos efectores T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> citotóxicos (LTC), linfocitos T *helper* CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, células NKT y macrófagos asociados a tumor está inversamente relacionado con la invasión vascular, metástasis y recidiva, y directamente relacionado con una mayor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global<sup>7,12</sup>. Los CCR con abundantes células inmunes, como LTC, tienen alta expresión de genes involucrados en respuestas tumorales citotóxicas (*CD3-z*, *CD8b*, *GZMB*, *GLNY*, *T-BET*, *IRF-1* e

*IFNG*) y una correlación inversa con la probabilidad de recidiva. Las vías citotóxicas de perforina y la mediada por Fas son los dos mecanismos efectores antitumorales de los LTC, aunque también participan otras como IFN $\gamma$  y LT $\alpha$ /LT $\beta$ <sup>29</sup> (fig. 1). Fas funciona como un supresor tumoral mediado por la respuesta inmunitaria celular. La vía Fas elimina linfocitos autorreactivos por apoptosis, evita respuestas inmunitarias crónicas y previene la autoinmunidad<sup>30</sup>. Fas también elimina células no deseadas o enfermas y funciona como guardián supresor del desarrollo tumoral. Además, TNF y linfoxina están implicados en la citotoxicidad antineoplásica de las células NK y monocitos<sup>31</sup>. Sin embargo, la interacción Fas-FasL puede originar una selección inmune de tumores resistentes a la apoptosis, con activación de ERK1/2 y NF- $\kappa$ B. Así, se pierde la expresión de Fas y se adquiere resistencia a la apoptosis, cambiando la señal de Fas de proapoptosis a pro-proliferación, con coexpresión de FasL y el inhibidor de apoptosis FLIP, resultando en metástasis<sup>32,33</sup> (fig. 2). La expresión/función de Fas estaría aumentada en el colon normal, baja en el CCR y ausente en las metástasis.

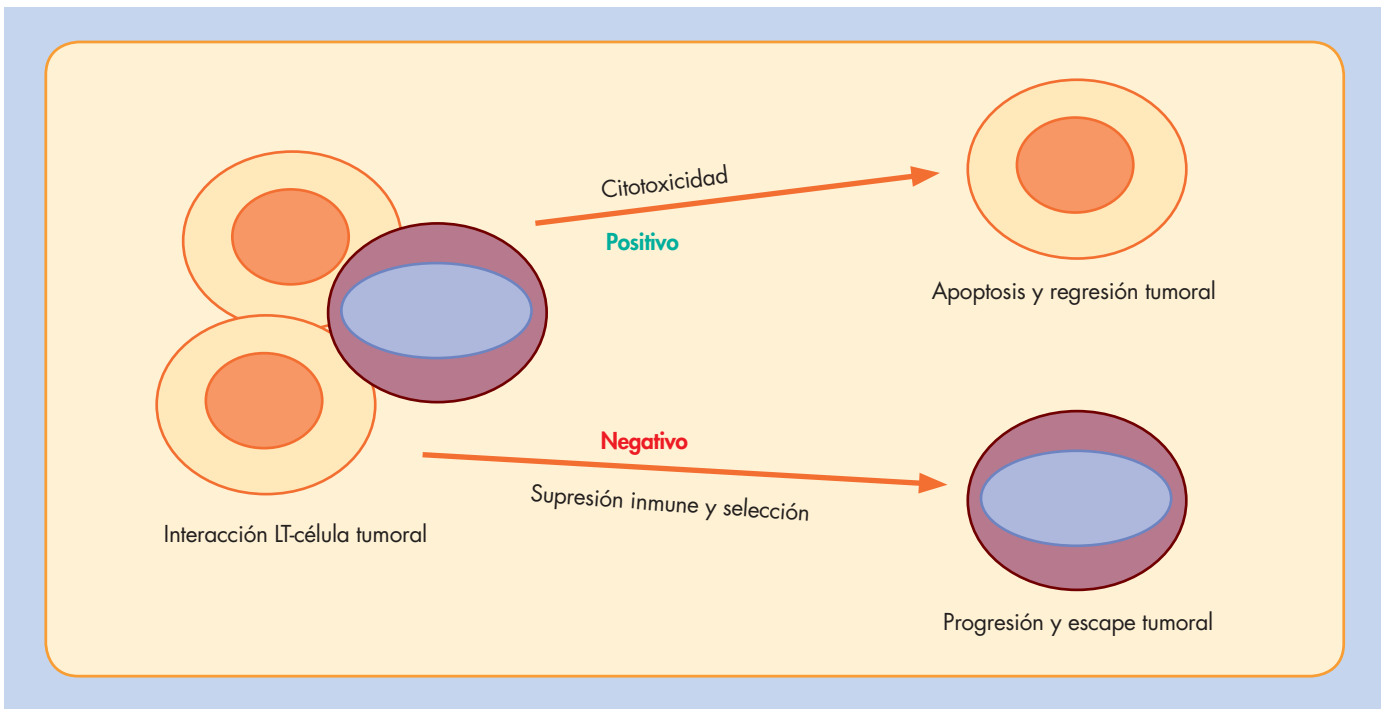
Contrariamente, los linfocitos T reguladores CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Tregs), cuyo marcador es el factor de transcripción Foxp3, se acumulan en el microambiente tumoral. Una relación CD3(+)/FoxP3(+) intraepitelial baja y la escasez de linfocitos T CD3(+) se asocia a tiempos de supervivencia más cortos, indicando la importancia pronóstica de una relación de células efectoras/Treg en el CCR<sup>7,12,34,35</sup>. Además, en pacientes que desarrollan metástasis se ha observado una escasez de células relacionadas con la respuesta inmunitaria celular y un cambio hacia la infiltración de linfocitos B en lugar de infiltración inmune<sup>36</sup>.

En el CCR existe, además, una correlación entre la alta densidad de linfocitos T de memoria (CD8<sup>+</sup> CD45RO) y la menor diseminación linfovascular, perineural y a ganglios linfáticos regionales. Este es el caso del CCR con inestabilidad de microsátélites (IMS) que tiene mayor inmunogenicidad y se asocia a mejor pronóstico y supervivencia global probablemente debido a la presencia de abundantes linfocitos intraepiteliales y agregados linfoides peritumorales tipo Crohn<sup>37</sup>. Además, el fenotipo IMS<sup>38,39</sup> genera mutaciones y, secundariamente, acumulación de péptidos inmunógenos capaces de generar una respuesta citotóxica con aumento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

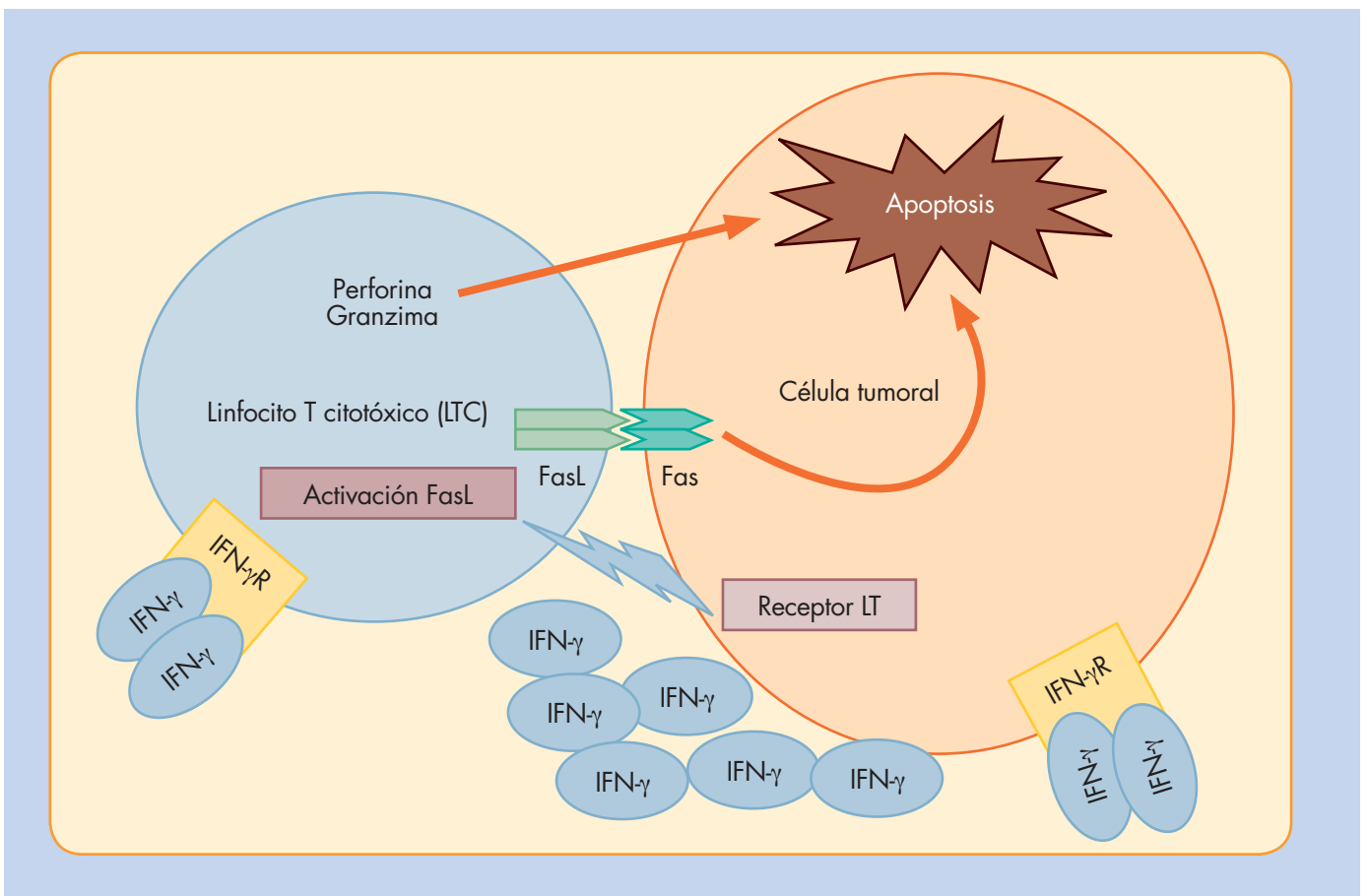
La densidad, el tipo y la localización del infiltrado linfocitario han demostrado predecir la evolución de los pacientes de forma más fiable que el estadio TNM basado en el estudio histológico convencional<sup>7,12,13</sup>. También se ha observado que la inmunoterapia de linfocitos T reactivos al tumor aumenta significativamente la supervivencia en el CCR<sup>40</sup>.

## Conclusiones

Clásicamente se ha considerado el estadio TNM como el factor pronóstico más importante en el CCR. Sin embargo, más recientemente se ha demostrado que el tipo de inflamación, función, densidad y localización de las células inmunes en las distintas regiones del tumor influyen en el riesgo de su recidiva. En el CCR, la presencia de un marcado infiltrado linfocitario intratumoral se ha asociado a una mayor supervivencia, ya que la invasión tumoral depende de la reacción inmunitaria del huésped<sup>9-13</sup>, por lo que se postula que el microambiente tumoral y la respuesta inmunitaria del huésped tienen un papel



**Figura 1.** Los linfocitos T citotóxicos (LTC) son las primeras células inmunes que atacan el tumor. La eficacia de los linfocitos T en citotoxicidad (respuesta o estímulo positivo) produce la muerte de células tumorales vía apoptosis y regresión tumoral. Sin embargo, la falta de respuesta inmunitaria en el huésped ocasiona la selección de clones de células tumorales con capacidad de crecimiento, progresión tumoral y metástasis.



**Figura 2.** Las vías citotóxicas de perforina y la mediada por Fas son los efectores antitumorales. El ligando FasL de superficie se une al receptor Fas de la célula tumoral e inicia la apoptosis mediada por Fas. La perforina dirige granzimas que fragmentan el ADN y causan apoptosis. La perforina tiene efectos antitumorales muy potentes en tumores pequeños y es poco efectiva en tumores grandes, donde es esencial el mecanismo FAS/FasL que suprime el crecimiento tumoral. También participan IFN $\gamma$  y LT $\alpha$ /LT $\beta$  en la supresión tumoral. Las funciones de Fas son múltiples, es un receptor "mortal" mediador de vías de señalización proapoptóticas y antiapoptóticas. LTC: linfocito T citotóxico.

clave en el control de la progresión tumoral<sup>15</sup>. Mientras que un gran número de células inflamatorias favorece la progresión del tumor, la presencia de marcadores de vigilancia inmune de tipo cooperador o *helper* y LTC se asocian a una mayor supervivencia<sup>14</sup>. Hay evidencias de que el contexto inmune del tumor primario tiene un valor pronóstico esencial, superior al TNM, en la predicción de la supervivencia libre de enfermedad y en la supervivencia general<sup>10-13</sup>. Por ello, se propone el análisis del infiltrado inflamatorio tumoral como un factor esencial para establecer el pronóstico del tumor. Además, teniendo en cuenta que el control inmunológico tumoral es universal, es importante considerarlo como un factor pronóstico e introducir el índice o gradación inmune como uno de los marcadores para clasificar los carcinomas. El índice inmune es un factor pronóstico más potente que el TNM, especialmente en CCR en estadios iniciales, y puede constituir una nueva herramienta para nuevas estrategias terapéuticas<sup>9-14</sup>.

## Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

■ Epidemiología

1. Troisi RJ, Freedman AN, Devesa SS. Incidence of colorectal carcinoma in the U.S.: an update of trends by gender, race, age, subsite, and stage, 1975-1994. *Cancer*. 1999;85:1670-6.
2. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:489-99.
3. Witz IP. Tumor-microenvironment interactions: dangerous liaisons. *Adv Cancer Res*. 2008;100:203-29.
4. Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*. 2008;358:2704-15.
5. Garber K. First results for agents targeting cancer-related inflammation. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:1110-2.
6. Dunn GP, Old LH, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21:137-48.
7. ●● Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:2654-66.
8. Banerjee A, Ahmed S, Hands RE, Huang F, Han X, Shaw PM, et al. Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer*. 2004;3:21.
9. ● Mlecnik B, Bindea G, Pagès F, Galon J. Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30:5-12.
10. ● Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Pages F, Galon J. Natural immunity to cancer in humans. *Cur Opin Immunol*. 2010;22:215-22.
11. ●● Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29:1093-102.
12. ●● Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313:1960-4.
13. ● Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathological-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*. 2011;29:610-8.
14. ●● Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:5944-51.
15. Galon J, Fridman WH, Pages F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: A novel perspective. *Cancer Research*. 2007;67:1883-6.
16. Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, et al. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res*. 2000;60:3333-7.
17. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*. 2007;117:155-66.
18. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30:1073-81.
19. De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:24-37.
20. ● Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420:860-7.
21. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumor progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:71-8.
22. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2007;9:212.
23. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9:405-10.
24. Chung YC, Chaen YL, Hsu CP. Clinical significance of tissue expression of interleukin-6 in colorectal carcinoma. *Anticancer Res*. 2006;26:3905-11.
25. Killeen SD, Wang JH, Andrews EJ, Redmond HP. Bacterial endotoxin enhances colorectal cancer cell adhesion and invasion through TLR-4 and NF-kappaB-dependent activation of the urokinase plasminogen activator system. *Br J Cancer*. 2009;100:1589-602.
26. Simpson JA, Al-Attar A, Watson NF, Scholefield JH, Ilyas M, Durrant LG. Intratumoral T cell infiltration, MHC class I and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer. *Gut*. 2010;59:926-33.
27. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes?. *Lab Invest*. 2006;86:231-45.
28. Kasajima A, Sers C, Sasano H, Jöhrens K, Stenzinger A, Noske A, et al. Down-regulation of the antigen processing machinery is linked to a loss of inflammatory response in colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2010;41:1758-69.
29. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:940-52.
30. Hughes PD, Belz GT, Fortner KA, Budd RC, Strasser A, Bouillet P. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity*. 2008;28:197-205.
31. Lu G, Janjic BM, Janjic J, Whiteside TL, Storkus WJ, Vujanovic NL. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotaxin(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis inducing ligand. *J Immunol*. 2002;168:1831-9.
32. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 2009;30:180-92.
33. Liu K, Caldwell SA, Abrams SI. Immune selection and emergence of aggressive tumor variants as negative consequences of Fas-mediated cytotoxicity and altered IFN-gamma-regulated gene expression. *Cancer Res*. 2005;65:4376-88.
34. Le Gouvello S, Bastuji-Garin S, Aloulou N, Mansour H, Chaumette MT, Berrehar F, et al. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut*. 2008;57:772-9.
35. ● Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ. A low intraepithelial effector (CD3+)regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts adverse outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology*. 2009;137:1270-9.
36. Camus M, Tosolini M, Mlecnik B, Pages F, Kirilovsky A, Berger A, et al. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Research*. 2009;69:2685-93.
37. Michael-Robinson JM, Biemer-Hüttmann A, Purdie DM, Walsh MD, Simms LA, Biden KG, et al. Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut*. 2001;48:360-6.
38. Schwitalle Y, Kloof M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, et al. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology*. 2008;134:988-97.
39. Tougeron D, Fauquembergue E, Rouquette A, Le Pessot F, Sesbotié R, Laurent M, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod Pathol*. 2009;22:1186-95.
40. Karlsson M, Marits P, Dahl K, Dagöo T, Enerbäck S, Thörn M, et al. Pilot study of sentinel-node-based adoptive immunotherapy in advanced colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:1747-57.

## Bibliografía recomendada

Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: A prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29:1093-102.

*En este artículo los autores revisan el infiltrado inflamatorio presente en los tumores y concluyen que la infiltración del tumor por linfocitos T de memoria (CD4<sup>+</sup>) y citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) es un factor pronóstico muy potente para determinar los periodos libres de enfermedad y supervivencia global.*

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313:1960-4.

*Analizan varias cohortes de CCR y concluyen que los datos inmunológicos (tipo, densidad y localización de las células inmunes en el tumor) son mejores predictores de la supervivencia*

*del paciente que los datos histopatológicos utilizados sistemáticamente para el estadio del carcinoma colorrectal. Apoyan la hipótesis de que la respuesta inmunitaria adaptativa influye en el comportamiento de los tumores humanos.*

Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, et al. Histopathological-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*. 2011;29:610-8.

*Comparan el significado pronóstico de los criterios inmunológicos con el de la extensión tumoral basado en el sistema de estadificación tumoral del American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer-TNM. Concluyen que la presencia de linfocitos T citotóxicos CD8(+) en el tumor proporciona un indicador de recidiva tumoral superior al predecible con la estadificación TNM.*