

Expresión de TLR-9 en muestras de tejido con diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso de laringe del Hospital Central Militar

Mayor M.C. Raúl Aragón-Franco,* Mayor M.C. Flor de María Cortés-Espinosa,**
Mayor M.C Yessenia Tlatelpa-Mastranzo,** Mayor M.C. Isabel Mora-Mendoza,***
Mayor M.C. José Ricardo Sánchez-Santa Ana***

Escuela Médico Militar/Hospital Central Militar. Ciudad de México.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la expresión de TLR 9 en tejido con diagnóstico histopatológico de cáncer escamoso de laringe de pacientes del Hospital Central Militar.

Material y métodos. Estudio retrospectivo longitudinal de tipo descriptivo observacional, se obtuvieron muestras de tejido de pacientes del Hospital Central Militar del Archivo de Patología diagnosticadas como cáncer escamoso de laringe. Para el estudio de las mismas se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón (Anti-TLR9 humano), así como la técnica de inmunohistoquímica misma que se realizó en el área de inmunohistoquímica del Servicio de Patología del Hospital Central Militar, encontrando que la concentración adecuada del anticuerpo primario anti-TLR9 humano fue de 1:200.

Resultados. Se obtuvieron un total de 1,276 biopsias realizadas en cabeza y cuello efectuadas en los años 2007, 2008 y 2009 a partir de las cuales comenzamos a delimitar nuestra población. Hallamos que sin tomar en cuenta el diagnóstico histopatológico del total de las biopsias de laringe, éstas representaron 10% (127) del total de las mismas. De éstas se estudiaron 25 muestras de tejido diagnosticadas como cáncer escamoso de laringe en el periodo de 2007-2009. De acuerdo con la distribución por sexo, se encontró un predominio de pacientes del sexo masculino con 72% (18). De acuerdo con la técnica de inmunohistoquímica se encontraron dos tipos de expresión de TLR9, positiva y negativa de las cuales se obtuvo lo siguiente: en tejido sano se expresó de manera positiva en cinco muestras y 19 en tejido con cáncer haciendo un total de 19 muestras positivas. En cuanto a la negatividad, en tejido sano no encontramos ninguna muestra con expresión negativa mientras que en tejido con cáncer se identificaron 11.

Discusión. Encontramos que las células cancerosas de laringe expresan menos TLR9 que las células de tejido de laringe sana, por lo que éstas representan un blanco potencial de ligandos de este receptor, iniciando el proceso de inflamación aguda. El estudio de la expresión de este receptor (TLR9) ha demostrado su importancia,

Expression of TLR-9 in tissue with histopathological diagnosis of laryngeal squamous cell cancer of the Hospital Central Militar

SUMMARY

Objective. Determine the expression of TLR9 in tissue with histopathological diagnosis of laryngeal squamous cell cancer in Hospital Central Militar patients.

Materials and methods. Retrospective longitudinal study type observational descriptive, there was obtain tissue samples of Hospital Central Militar patients in Pathology registry with diagnosis of laryngeal squamous cell cancer. To study of this we utilized mouse monoclonal antibody (anti-TLR9 human), the technique utilized is immunohistoquímica it was realized in Military Central Hospital pathology service were was find suitable concentration 1:200.

Results. There was obtain 1,276 Biopsies they are was realized un head and neck making in 2007, 2008 and 2009 beginning from we are start to delimit our population. We found without histopathological diagnosis larynx, this represent 10% (127) of all. We were studied 25 samples with histopathological diagnosis of laryngeal squamous cell cancer in period 2007-2009. In agreement with sex distribution. It was found prevalence male patients with 72% (18). In agreement with technique Immunohistoquímica we found 2 types of TLR9 expression, positive and negative: in healthy tissue it was expressed positive in 5 samples and 19 in cancer tissue it was represent 19 positive samples. In agreement with negativity, in healthy tissue we wasn't found any sample with negative expression while in cancer tissue we found 11.

Discussion. We found that cancer cells of larynx express less TLR9 those cells of healthy tissue larynx. Therefore this represent a potential point of ligands of this receptor, to begin process acute inflammation. The study of expression of this receptor (TLR9), was demonstrated her importance, it was count on ligands of TLRs, on a future it was utilized like immunotherapeutic agents in treatment

* Subsección de Investigación. Escuela Médico Militar. U.D.E.F.A. ** Residentes Rotatorios. Hospital Central Militar. *** Servicios de Otorrinolaringología y Patología. Hospital Central Militar. Dirección General del Servicio de Sanidad. SEDENA. Ciudad de México.

Correspondencia: Dr. Raúl Aragón-Franco
Correo electrónico: raulmm@yahoo.com.mx

Recibido: Diciembre 3, 2012.
Aceptado: Febrero 10, 2013.

ya que al contar con ligandos de TLRs, en un futuro pueden ser utilizados como agentes inmunoterapéuticos en el tratamiento del cáncer laríngeo, ya sea como inmunoterapia directa o como potenciador de la respuesta inmune.

Palabras clave: Respuesta inmune, receptores tipo toll, TLR-9.

of laryngeal cancer, like straight immunotherapy or increased immune response.

Key words. Immune response, toll like, receptor, TLR9.

Introducción

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por alteraciones en las células, que tiene como resultado la modificación en los oncogenes, en los genes supresores tumorales y en la estabilidad genética. Además, el microambiente celular tumoral, el estroma y el sistema inmunitario tienen una función muy importante en el desarrollo del cáncer.¹

Los tumores secretan factor de crecimiento transformante β (TGF- β , y factor de crecimiento del endotelio vascular (EVGF), que inhibe la activación de las células dendríticas (DCs) y deteriora la inmunidad de las células T específicas del tumor.²

Representa uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, en México el cáncer es la segunda causa de muerte con 60 mil casos al año, sólo después de la diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones. El cáncer laríngeo representa 42 de 17.6% que ocupan los casos totales de lesiones malignas de cabeza y cuello, afecta principalmente a pacientes entre la 6a. y 8a. décadas de la vida.^{3,4}

Como la mayoría de los tumores, múltiples factores contribuyen al desarrollo de cáncer de laringe. Entre los más destacados está el uso del tabaco. El segundo es el efecto sinérgico producido por el tabaco y el alcohol. La enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE) recientemente ha sido identificada en varios estudios como un factor de riesgo significativo de cáncer de laringe. Los síntomas que comúnmente se presentan incluyen: disfonía, odinofagia y disfagia.⁵

El sistema inmune responde al cáncer de diferentes maneras, se han establecido varias teorías acerca de esto, una de las más aceptadas es la llamada inmunoección. Consiste en un proceso dinámico que está dividido en tres fases: eliminación, equilibrio y escape.⁶

La fase de eliminación consiste en detectar y eliminar células pre-tumorales y tumorales en estadios tempranos. Esta fase puede ser completa (todas las células tumorales son eliminadas), o incompleta (una porción de células tumorales se eliminan). Si existe eliminación parcial del tumor, se define un estado temporal de equilibrio entre el sistema inmune y el tumor. Durante este periodo, las células tumorales permanecen quiescentes o continúan evolucionando, acumulando cambios futuros (mutaciones de DNA o cambios en su expresión génica). Como este proceso continúa, el sistema inmunitario ejerce una presión selectiva a través de la eliminación susceptible de clones tumorales. La presión ejercida durante esta fase es suficiente para controlar la progresión tumoral, pero si la respuesta

inmune falla para completar la eliminación del tumor, el proceso resulta en la selección de las variantes celulares tumorales que son capaces de resistir, evadir o suprimir la respuesta inmune antitumoral, iniciando la fase de escape. Durante la fase de escape el sistema inmune no es capaz de contener el desarrollo tumoral y tiene como resultado el desarrollo tumoral progresivo.⁷

El principal mecanismo de inmunidad antitumoral es la eliminación de las células tumorales por los linfocitos T CD8+, reconociendo y eliminando las células malignas que expresan péptidos derivados de proteínas celulares mutantes o de proteínas víricas oncogénicas, que le son presentados a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I). El sistema inmunitario está compuesto por muchos tipos de células y mediadores que interactúan con células no inmunitarias y con otras redes complejas y dinámicas.

Las células Natural Killer (NK) reconocen y destruyen varios tipos de células tumorales, en especial las que expresan de manera reducida las moléculas del MHC I y que, por lo tanto, evitan la acción de los linfocitos T CD8+. Además pueden actuar contra las células recubiertas con inmunoglobulinas G (IgG) a través de los receptores Fc (Fc RIII o CD16) a través del mecanismo llamado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Ciertas citocinas, tales como los interferones y las interleucinas como IL-12 y IL-2 e potencian la capacidad tumoricida de las células NK.⁸

El concepto de que la respuesta inflamatoria y la inflamación crónica contribuyen a la carcinogénesis, progresión tumoral y neovascularización está apoyada por estudios epidemiológicos y hallazgos experimentales. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la inflamación crónica contribuye al desarrollo tumoral no están bien entendidos, aunque se ha propuesto al Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) como el principal responsable.⁹

Receptores tipo Toll

Pertenecen a los "Receptores de Reconocimiento de Patrón" (PRR) que inician la Respuesta Inmune Innata. Toll-like receptors o receptores tipo Toll (TLRs), son proteínas transmembrana tipo I que fueron descubiertos por primera vez en la mosca *Drosophilla*.

En mamíferos son la clave de la invasión patógena además de regular la actividad tumoral. Los TLRs están relacionados a los receptores de IL-1 (IL-1Rs). Sin embargo, las porciones extracelulares de TLRs e IL-1Rs son

completamente diferentes, la porción extracelular de los TLRs contienen repeticiones ricas en leucina, mientras IL-1Rs contienen tres dominios parecidos a inmunoglobulina.⁶

Los receptores tipo Toll, expresados en células centinelas del sistema inmune, incluyendo macrófagos y DCs, son la clave de la invasión patógena. Actualmente, trece TLRs se han identificado en mamíferos. TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 se expresan en la superficie celular; TLRs 3, 7, 8 y 9 son encontrados casi exclusivamente dentro de endosomas. Diferentes TLRs exhiben especificidad por ligandos derivados de patógenos; los TLRs 2, 3, 4, 5, 7 y 9 reconocen lipoproteínas bacterianas, RNA de doble cadena (dsRNA), lipopolisacárido (LPS), flagelina, RNA de cadena simple (ssRNA) y CpGs, respectivamente. Los ligandos para los TLRs 10, 12 y 13 continúan sin identificarse. El TLR10 se expresa en humanos, pero no en ratones, TLR8 no es funcional en ratones y los TLRs 11, 12 y 13 se expresan en ratón, pero no en humanos.⁸

TLR-9

El TLR-9 es estimulado por dinucleótidos CpGs desmetilados contenidos en el DNA viral y bacteriano y es expresado por un número limitado de células inmune humanas, principalmente células dendríticas plasmocitoides, células B y neutrófilos.^{10,11} El DNA bacteriano contiene esta secuencia de CpG que tiene múltiples efectos en el sistema inmune. Estos efectos directos e indirectos incluyen la inducción de proliferación de células B y producción de inmunoglobulinas, secreción de IFN- α , IFN- β , IL-12 e IL-18 por macrófagos y células dendríticas además de secreción de IFN- γ , IL-12 e IFN- α en células NK. Estas citocinas pueden inducir la diferenciación de células T CD4+ que encuentran antígenos específicos, resultando una respuesta inmune adaptativa.¹²

La activación celular a través de los miembros de la familia TLR (incluyendo TLR-9) está involucrada en una cascada de señalización que continúa a través de la diferenciación mieloide primaria en respuesta al gen 88 (MyD88), interleucina 1 (IL-1), receptor activador de cinasa (IRAK), el receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR) asociado el factor 6 (TRAF6) y culmina en la activación de muchos factores de transcripción, incluyendo el factor nuclear κ B (NF- κ B), proteína activadora 1, CCAAT/proteína aumentadora de fijación y proteína fijadora de elemento de respuesta-cAMP (CREB).^{13,14}

El TLR-9 está involucrado en la detección de dinucleótidos CpG desmetilados que son relativamente comunes en el DNA genómico de bacterias y virus, pero que no son comunes en genoma de vertebrados, y si se presentan están altamente metilados. Para aplicaciones terapéuticas, el TLR-9 generalmente es estimulado con oligodeoxinucleótidos sintéticos conteniendo uno o más dinucleótidos CpG no metilados.¹⁵

El TLR-9 demostró ser estimulado por DNA bacteriano, el cual, en contraste con el DNA de vertebrados, está

caracterizado por el acontecimiento frecuente de CpG dinucleótidos no metilados. Generalmente se supuso que la activación de TLR ayuda en la defensa contra patógenos invasores. Sin embargo, una contribución esencial de TLR-9 para combatir microbios sólo ha sido reportada para un número limitado de patógenos, incluyendo unas cuantas bacterias.¹⁶ Por lo que nosotros estudiamos la expresión de este receptor en células cancerosas de laringe y encontramos una expresión menor en relación a las células del epitelio laríngeo sin cáncer.

Material y métodos

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo longitudinal de tipo descriptivo observacional. Se obtuvieron muestras de tejido del archivo de Patología con diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso de laringe de pacientes el Hospital Central Militar que cumplieron los criterios de inclusión y que no estuvieron considerados en algún criterio de exclusión.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-TLR9 humano a través de la técnica de inmunohistoquímica realizada en el área de inmunohistoquímica del Servicio de Patología en el Hospital Central Militar.

Resultados

Se encontró un total de 1,276 biopsias realizadas en cabeza y cuello efectuadas en 2007, 2008 y 2009 a partir de las cuales comenzamos a delimitar nuestra población. Hallamos que, sin tomar en cuenta el diagnóstico histopatológico del total de las biopsias de laringe, éstas representaron 10% (127) del total de las mismas (*Figura 1*).

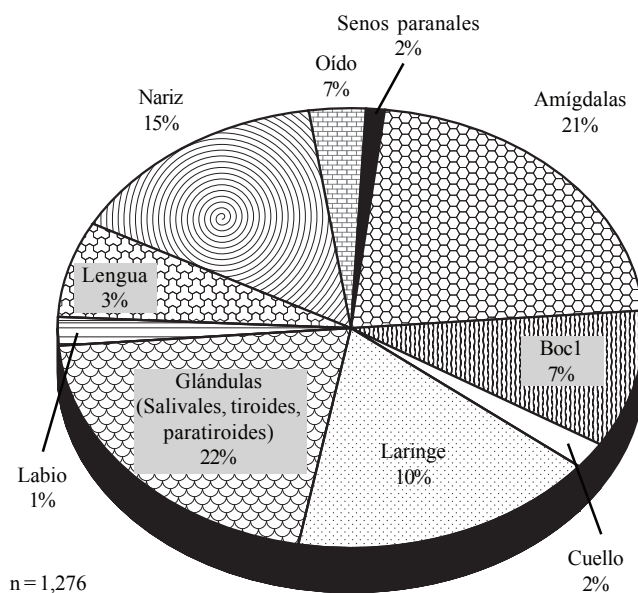


Figura 1. Número total y porcentaje de biopsias de cabeza y cuello del año 2007-2009. Fuente: Archivo de Patología H.C.M.

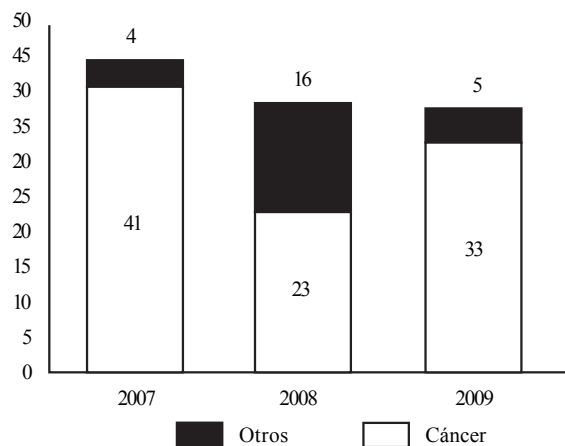


Figura 2. Número total de biopsias de laringe.

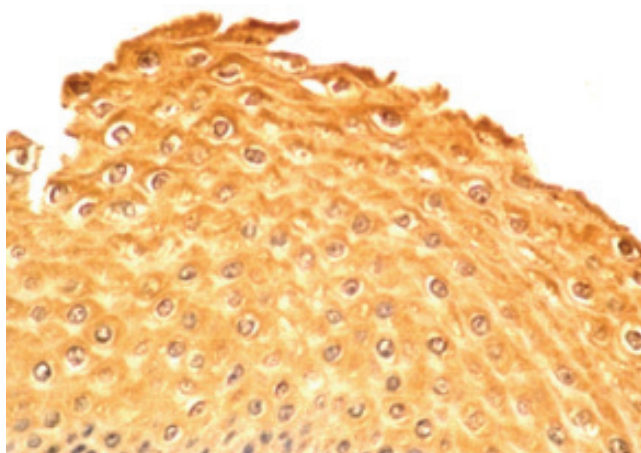


Figura 3. Microfotografía de inmunohistoquímica para TLR9 positiva en mucosa escamosa de laringe sana (40X).

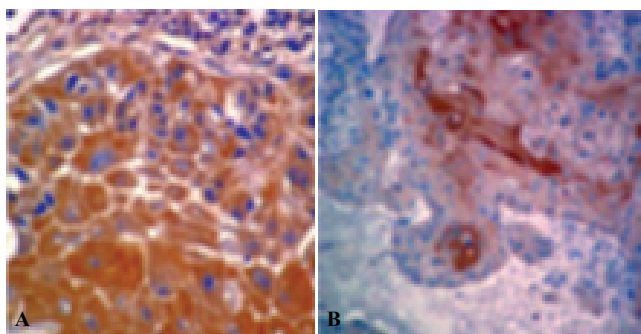


Figura 4. A (40X) y B (20X) microfotografía de inmunohistoquímica para TLR9, reacción de citoplasma con positividad difusa (A) y focal (B).

Se obtuvieron 33 muestras de tejido de pacientes con el diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso de laringe, de éstas, 13 con el diagnóstico de cáncer laríngeo, 11 con el diagnóstico de cáncer de cuerdas vocales, ocho con el diagnóstico de cáncer en glotis, y uno con el diagnóstico de cáncer en el seno piriforme. Del total de estas

muestras, nueve se excluyeron por no encontrar hallazgos histopatológicos de cáncer, por muestra insuficiente y que el tejido haya sido sometido a radiación antes de la toma de la biopsia.

Se estudió un total de 25 muestras de tejido obtenidas de pacientes del Hospital Central Militar del Archivo de Patología diagnosticadas como cáncer escamoso de laringe en el periodo de 2007-2009, que cubrieron los criterios de inclusión, exclusión y de eliminación.

Se encontraron dos tipos de expresión de TLR-9, positiva y negativa, de las cuales se obtuvo lo siguiente: en tejido sano se expresó de manera positiva en cinco muestras y 19 en tejido con cáncer haciendo un total de 19 muestras positivas. En cuanto a la negatividad, en tejido sano no encontramos ninguna muestra con expresión negativa mientras que en tejido con cáncer se identificaron 11.

Con estos resultados se puede afirmar que existe la suficiente evidencia de que hay una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes tipos de cáncer y una expresión disminuida o negativa del TLR-9, así como una Expresión Positiva de TLR-9 en los tejidos sanos a 95% de confianza $\chi^2 = 32.883$; 9 Grados de Libertad; $p < 0.05$

Consideramos como criterios de expresión del TLR-9 los siguientes:

- **Positivo:** Representa una expresión de TLR-9 de color café.
- **Positividad difusa:** Representa una expresión de TLR-9 cualitativamente importante en color café.
- **Positividad focal:** Representa una expresión de TLR-9 cualitativamente disminuida en color café.
- **Negativo:** Representa una expresión nula de TLR-9.

Discusión

El sistema inmune es muy importante en el control del desarrollo del cáncer. El sistema inmune innato a través de los PRRs, iniciando el proceso de inflamación aguda. La expresión de TLR-7 en tejido con cáncer laríngeo no se ha estudiado. En el año 2010, Aragón y cols. estudiaron la expresión del TLR-7,¹⁷ en la misma neoplasia, donde se encontró que la expresión de este receptor se encontraba disminuido al igual que en nuestro (TLR9) trabajo de investigación. Se sabe de la potencial funcionalidad de TLR-9 por el conocimiento de las vías de señalización y su utilidad en la activación de la reacción inflamatoria aguda. Se ha demostrado la funcionalidad del TLR-9 con sus ligandos en otras patologías (linfoma no Hodgkin) según el estudio realizado por Friedberg y cols.¹⁸ donde concluyeron que realmente existe una activación de la respuesta inmune por lo que se debe estudiar en otros tipos de neoplasias para ampliar el conocimiento de su funcionalidad.

En este trabajo de investigación se estudio el cáncer laríngeo (carcinoma escamoso) y demostramos que el TLR-9 en tejido de cáncer laríngeo se expresa en menor canti-

dad que en tejido sano, lo que sugiere un blanco potencial para el tratamiento con ligandos de TLR-9.

Conclusiones

Mediante el presente trabajo de investigación demostramos la expresión de TLR-9 en el tejido con el diagnóstico de cáncer laríngeo. La importancia de la presencia de este receptor radica que al existir ligandos naturales y sintéticos de éstos, pueden utilizarse como inmunoterapia, como se ha demostrado en otros tipos de cáncer.

Referencias

1. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 59-73.
2. Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H. TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* 2008; 27: 218-24.
3. JRR. Mueren 60 mil personas al año por cáncer en México. *Excélsior*. Periódico semanal 03 de febrero del 2008, año XCI-tomo I, Número 33,023-México D.F.
4. DGE. Registro Histopatológico de las Neoplasias en México, 2007.
5. Myers E. Cancer of the head and neck. Editorial Saunders. 2003; 4a. Edición.
6. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-8.
7. Stagg J, Johnstone RW, Smyth MJ. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunological reviews* 2007; 20: 82-101.
8. Huang B, Zhao J, Unkeless J, Feng ZH, Xiong H.: TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. Review. *Nature Oncogene* 2008; 27: 218-24.
9. Cherfils-Vicini J, Cremer I. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest* 2010; 120(4): 1285-97.
10. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
11. Krieg AM. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene* 2008; 27: 161-7.
12. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 1989; 7: 145-73.
13. Takeshita F, Ishii KJ, Ueda A, Ishigatsubo Y, Klinman D. M. Positive and negative regulatory elements contribute to CpG oligonucleotide-mediated regulation of human IL-6 gene expression. *Eur J Immunol* 2000; 30: 108-16.
14. Hacker H. et al. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6. *J Exp Med* 2000; 192: 595-600.
15. Krieg CAM. Development of TLR-9 agonists for cancer therapy. Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, Massachusetts, USA. *J Clin Invest* 2007; 117(5): 1184-94.
16. Peter M, Bode K, Lipford GB, Eberle F, Heeg K, Dalpke AH. Characterization of suppressive oligodeoxynucleotides that inhibit Toll-like receptor-9-mediated activation of innate immunity. Department of Medical Microbiology and Hygiene, University Heidelberg, Heidelberg, Germany, and Coley Pharmaceutical Group, Inc., Wellesley, MA, USA. *Immunology* 2008; 123(1): 118-2.
17. Hernández AI, Martínez TL, Sánchez R, Mora I, Carrasco IG, Aragón FR. Expresión del receptor tipo toll 7 en muestras de tejido con diagnóstico histopatológico de carcinoma escamoso de laringe. *Rev Sanid Milit Mex* 2010; 64(1): 24-36.
18. Friedberg JW, Kim H, McCauley M, Hessel EM, Sims P, Fisher DC, Nadler LM, et al. Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide (1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma: increased interferon-alpha/beta-inducible gene expression, without significant toxicity. *Blood* 2005; 105: 489-95.

