

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NKG2D Y CD16 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO DIFUSO

Juan Jesús Calvillo Ramirez^a, María Alicia Díaz Y Orea^a, Jorge Armando López Díaz^b, Rogelio González López^b, Claudia Teresita Gutiérrez Quiroz^b, Álvaro José Montiel Jarquín^b

^aFacultad de Medicina – Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

^bCentro Médico Nacional, Unidad Médica de Alta Especialidad, "General de División Manuel Ávila Camacho" del Instituto Mexicano del Seguro Social

RESUMEN

Las células Natural Killer (NK) tienen un papel primordial en la inmunovigilancia del cáncer. NKG2D al unirse a sus ligandos MICA/B y ULBP en el tejido tumoral y CD16, una proteína transmembrana, marcador de la célula NK, que ante la presencia de anticuerpos tumorales específicos, puede inducir la citotoxicidad. Se evaluó la expresión del receptor NKG2D y CD16 en biopsias de pacientes con cáncer gástrico difuso. Se identificó presencia o ausencia de células en anillo de sello, invasión linfovascular y/o perineural. Se recolectaron los datos de clasificación de Borrmann, estadio clínico con categoría TNM, tratamiento quirúrgico, hábito tabáquico, ingesta de alcohol y la existencia de comorbilidades. Se reportó la presencia o ausencia del receptor NKG2D evaluado mediante inmunoperoxidasa indirecta y del receptor CD16 evaluado por inmunofluorescencia.

Palabras clave: Cáncer, Gástrico, Inmunoperoxidasa

ABSTRACT

The Natural Killer (NK) cells have a primordial role in the immunosurveillance of cancer. NKG2D when binding to its MICA/B and ULBP ligands in the tumor tissue and CD16, a transmembrane protein, marker of the NK cell, which in the presence of specific tumor antibodies, can induce cytotoxicity. The expression of the NKG2D and CD16 receptor was evaluated in biopsies of patients with diffuse gastric cancer. The presence or absence of signet ring cells, lymphovascular and / or perineural invasion was identified. We collected the Borrmann classification data, clinical stage with TNM category, surgical treatment, smoking habit, alcohol intake and the existence of comorbidities. The presence or absence of the NKG2D receptor was reported and evaluated by indirect immunoperoxidase and the CD16 receptor was evaluated by direct immunofluorescence.

Keywords: Cáncer, Gastric, Immunoperoxidase

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se puede definir como el crecimiento acelerado de células tumorales, con incremento de masa tumoral [1]. A nivel mundial es más frecuente en pacientes masculinos, mayores de 65 años y el 70% de los afectados son mayores a 50 años.

Según el GLOBOCAN, una dependencia de la Organización Mundial de la Salud, encargada de la vigilancia epidemiológica del cáncer, en el año 2018 las neoplasias de estómago se detectaron en 1,033,701 individuos y tuvo una mortalidad de 782,631 personas en el mundo [2].

Se puede clasificar según su localización anatómica en cardial o distal; de acuerdo al grado de invasión en precoz si se localiza en la capa mucosa o submucosa del tejido y en avanzado si ha penetrado más allá de dichas capas; histológicamente en intestinal, etapa en la cual se preservan las uniones intercelulares o en difuso, caso en el cual dichas uniones se pierden; morfológicamente en la clasificación de Borrmann se dividen en polipoide, ulcerados con bordes bien definidos, ulcerados con bordes mal definidos y en infiltrantes difusos sin evidencia de masa o ulceración[3].

Los factores de riesgo asociados a la aparición del cáncer gástrico son la infección por *Helicobacter pylori*, la presencia de la patología gastritis crónica atrófica, la displasia y metaplasia intestinal, pólipos adenomatosos gástricos, el consumo de tabaco, antecedente familiar de enfermedades como cáncer y poliposis adenomatosa familiar, el consumo de carnes ahumadas embutidos y medicamentos en forma crónica, tales como los antiinflamatorios no esteroideos [3].

Las células Natural Killer (NK), fueron descubiertas en 1970, estas cumplen su rol principal en la modulación de la inmunidad innata. Su principal característica es su capacidad de distinguir células estresadas, transformadas o infectadas mediante receptores de activación tales como son NKG2D, DNAM-1, NCR y son moduladas mediante receptores de inhibición como KIR, TIGIT y CD96 [4].

2. TEORÍA

El receptor activador Natural killer group 2 member D (NKG2D) es una proteína transmembrana tipo II, localizado en las células citotóxicas (NK, LT $\gamma\delta$, LT CD8, $\alpha\beta$, NKT). Se codifica en el gen KLRK1 en el cromosoma 12. La unión del ligando (NKG2DL), activa la fosforilación de la proteína adaptadora de señalización “DNAX-activating protein of 10 kDa (DAP10)” y el reclutamiento de la cinasa-3-fosfatidilinositol (PI3K) o del complejo Grb2-Vav1, se requieren ambos para una activación completa [5].

Los ligandos de NKG2D están ausentes o en niveles muy bajos en células normales y sobre expresados en células infectadas, transformadas, senescentes o estresadas. Se han asociado

niveles altos de expresión de NKG2D con mayor supervivencia general en el cáncer gástrico [5].

El receptor NKG2D no puede coestimular la activación inducida por TCR de las células T CD8 inactivos, solo pueden aumentar la activación después de activarse in vitro. Después de un tiempo en incubación pueden eliminar células dependiendo de NKG2D. Los LT CD8 de epitelio intestinal en pacientes con enfermedad celiaca también tienen este tipo de actividad, posiblemente por exposición a grandes cantidades de IL-15 [6].

La estimulación excesiva por los NKG2DLs (MICA, MICB y ULBPs) en membranas o solubilizados inhiben la expresión del receptor en NK y LT CD8, internalizan a NKG2D los unen a fagosomas y se degradan. MIC soluble induce la pérdida del adaptador de señal de CD3 en LT y NK en pacientes con cáncer, después de la unión a NKG2D que activa caspasas e inhibe el funcionamiento de CD3 en estas células. También inhibe la habilidad de las NK de renovarse y altera su homeostasis. [7]

Molécula de la superfamilia de las Ig, involucrada en la citotoxicidad celular dependiente de Anticuerpos. Hay disminución en la expresión en las células NK de pacientes con cáncer en comparación con individuos sanos. Fisiológicamente el 90% de las células NK expresan CD16bright, con altos niveles de perforinas y 10% son inmaduras con CD16dim o CD16- [8].

CD 16 es un receptor activador perteneciente a la familia Ig like, se une a la porción Fc de los Ac IgG, activando la citotoxicidad dependiente de Ac mediada por células. Se produce en dos genes similares: CD16A (Fc gamma RIII A) en FCGR3A en el cromosoma 1 y CD16B (Fc gamma RIIB) FCGR3B en el cromosoma 1. CD16A es un polipéptido anclado heterooligomérico que se encuentra en macrófagos y en células NK. CD16B esta anclado en forma monomérica a glicosilfosfatidilinositol en neutrófilos. En células NK al activarse induce la transcripción de moléculas de activación de la membrana como CD25 y de citocinas como IFN-gamma y TNF. Iniciando la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígenos [8].

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se obtuvieron laminillas de biopsias de pacientes con diagnostico histopatológico de cáncer gástrico del servicio de gastrocirugía del Centro Médico Nacional, Unidad Médica de Alta Especialidad, "General de División Manuel Ávila Camacho" del Instituto Mexicano del Seguro Social. Se obtuvieron los datos clínicos de los pacientes de la base de datos proporcionado por el mismo servicio.

Se procesaron 18 muestras para la aplicación de técnica de inmunoperoxidasa para la detección de los receptores NKG2D y CD16.

La técnica para la determinación de NKG2D consistió en la desparafinización de las laminillas a 60 grados Celsius, rehidratación de tejidos con una serie de baños con xilol, alcohol al 100%, 96%, 80% y 70%, baños con solución buffer fosfato salino (PBS), aplicación de un anticuerpo primario dirigido contra el receptor NKG2D, posteriormente sumergiendo en etanol con peróxido de hidrógeno, aplicando un anticuerpo secundario y un marcaje con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno, se tiñó después con hematoxilina y se finalizó el proceso deshidratando el tejido con una serie de baños con alcohol al 70%, 80%, 96%, 100% y xilol, cubriéndose en ese momento con medio de montaje y un cubreportaobjetos.

La técnica para la determinación de CD16 consistió en la desparafinización de las laminillas a 60 grados Celsius, rehidratación de tejidos con una serie de baños con xilol, alcohol al 100%, 96%, 80% y 70%, baños con solución buffer fosfato salino (PBS), aplicación del anticuerpo dirigido contra el receptor CD16, posteriormente se realizó una contratinción con PBS y azul de Evans. Se finalizó el proceso cubriendo el tejido con medio de montaje y un cubreportaobjetos, sellando la laminilla con barniz.

La visualización de las laminillas procesadas para la determinación de NKG2D fue realizada mediante un microscopio óptico propiedad de la Universidad Autónoma de Puebla, utilizando un aumento de 100x para la toma de las fotografías. Figuras 1 y 2.

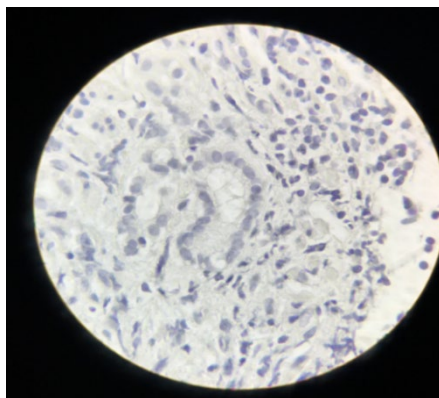


Figura 1. Laminilla NKG2D negativa en paciente femenino de 53 años clasificación TNM: T3N2M1

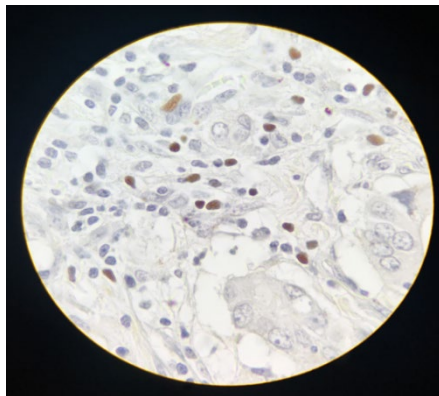


Figura 2. Laminilla NKG2D positiva en paciente femenino de 24 años, clasificación TNM: T4N1M0

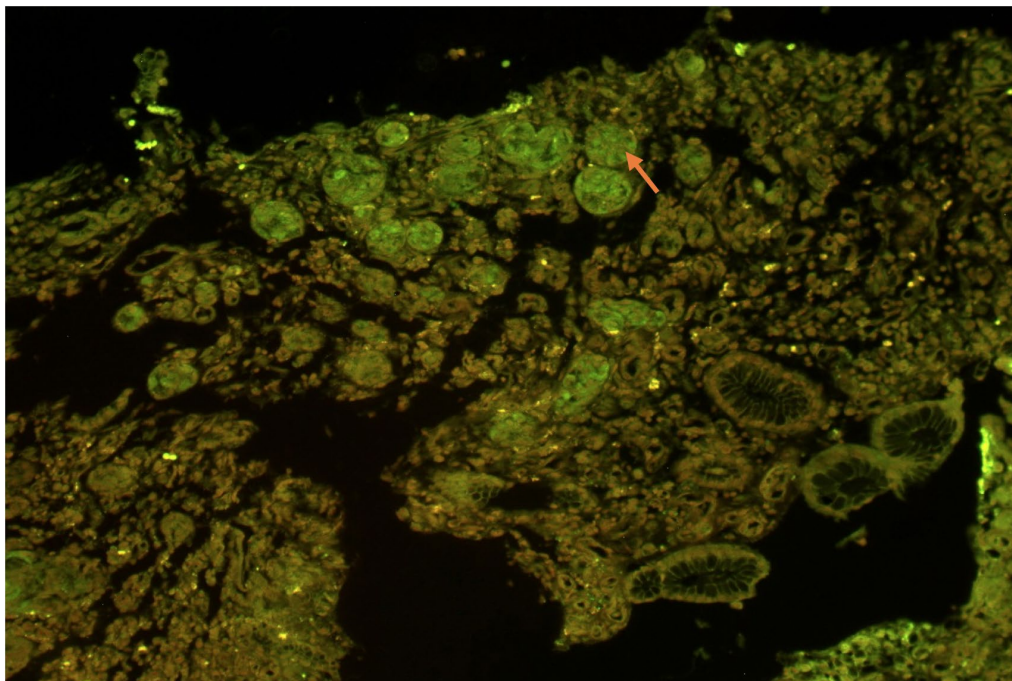


Figura 3. Microfotografía de biopsia de paciente con cáncer gástrico difuso, estadio IV, se observa células NK positivas a CD16 por IFI (flecha)

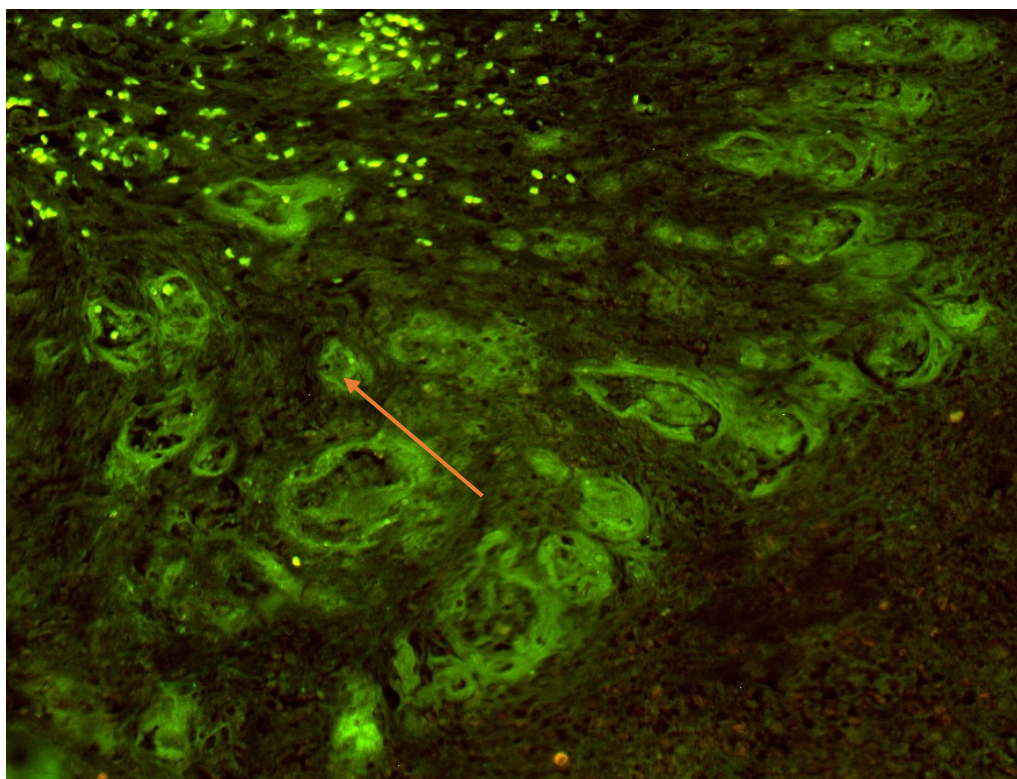


Figura 4. Microfotografía de biopsia de paciente con cáncer gástrico intestinal, estadio III, se observa células NK positivas a CD16 por IFI (flecha)

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cuanto al género, se encontró 9 (50%) mujeres y 9 (50%) hombres. La media de edad fue de 56.94 años. Tabla 1

Tabla 1: Edad de los pacientes incluidos

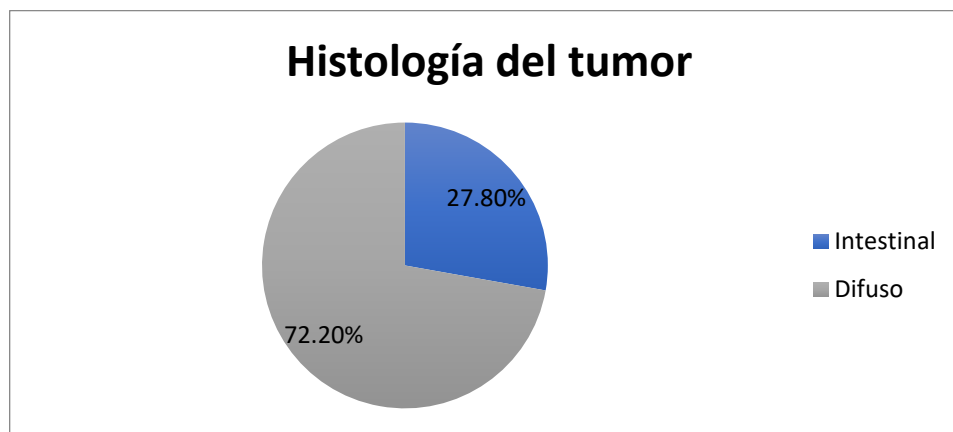
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Edad	18	28	73	56.94	12.177

Respecto al grado de diferenciación tumoral, se reportaron 6 (33.3%) moderadamente diferenciados y 12 (66.7%) poco diferenciados. Tabla 2

Tabla 2 Grado de diferenciación del cáncer gástrico en los pacientes incluidos
Abreviaturas: n=muestra, %=porcentaje

Grado de diferenciación tumoral	n=	%
Moderadamente diferenciado	6	33.3
Poco diferenciado/indiferenciado	12	66.7
Total	18	100.0

La histología de los tumores estudiados en nuestro grupo de pacientes con cáncer gástrico 5 (27.8%) fueron fenotípicamente intestinales y 13 (72.2%) fueron fenotípicamente difusos. Se identifico presencia de células en anillo de sello en 9 (50%) de los pacientes con cáncer gástrico y fueron ausentes en 9 (50%). Gráfica 1



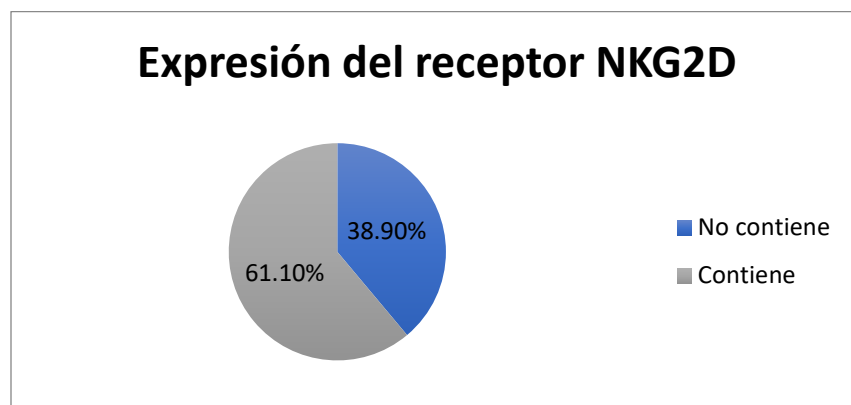
Gráfica 1. Histología del tumor en pacientes con cáncer gástrico de los pacientes en los que se realizó inmunohistoquímica para evaluar la expresión del receptor NKG2D y CD16

Respecto a la categoría T, encontramos 2(11.1%) en categoría T2, 6(33.3%) en categoría T3 y 10(55.6%) en categoría T4. En la evaluación de la categoría N, encontramos 1(5.6%) categoría N0, 3(16.7%) categoría N1, 9(50%) categoría N2 y 5(27.8%) categoría N3. En la categoría M correspondiente a la clasificación TNM, encontramos 8(44%) categoría M0 y

10(55.6%) M1. Se identificó invasión linfovascular y/o perineural en 12 (66.7%) pacientes y ausente en 6(33.3%).

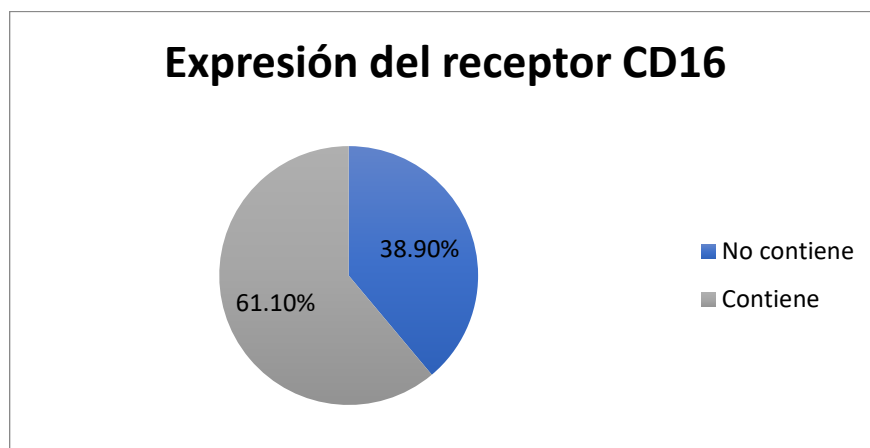
Se realizó clasificación de Borrmann a los pacientes de acuerdo a los hallazgos endoscópicos encontrando, Borrmann I 1(5.6%), Borrmann II 6(33.3%), Borrmann III 9(50%), Borrmann IV 2(11.1%). Se identificó hábito tabáquico en 9(50%) y fue negativo en 9(50%) pacientes. Identificamos ingesta de alcohol en 11(61.1%) de nuestros pacientes y 7(38.9%) negaron ingesta de alcohol. De la población estudiada, se identificaron comorbilidades: Hipertensión arterial sistémica 4(22.2%), dislipidemia 2(11.1%) y ninguna comorbilidad en 12(66.7%).

Se identificó presente el receptor NKG2D en 11(61.1%) y ausente en 7(38.9%) de la población estudiada. Gráfica 2.



Gráfica 2. Expresión del receptor NKG2D en biopsias de los pacientes con cáncer gástrico en los que se realizó inmunohistoquímica para evaluar la expresión del receptor NKG2D y CD16

Se identificó la expresión del receptor CD16 en nuestra población estudiada, encontrándolo presente en 11(61.1%) y ausente en 7(38.9%). Gráfica 3.



Gráfica 3. Expresión del receptor CD16 en biopsias de los pacientes con cáncer gástrico en los que se realizó inmunohistoquímica para evaluar la expresión del receptor NKG2D y CD16.

5. CONCLUSIONES

- El cáncer gástrico es una enfermedad que se sigue diagnosticando en estadios avanzados.
- El sistema inmunológico es determinante en la evolución y pronóstico de esta patología, los receptores NKG2D y CD16 se han identificado como piezas clave en la citotoxicidad de las células tumorales.
- La pobre expresión del receptor NKG2D y CD16 en las células NK se asoció a un mal pronóstico, con aumento de carga tumoral, diseminación local y metástasis.

6. REFERENCIAS

- [1] “Estadísticas A Propósito Del... Día Mundial Contra El Cáncer (4 De febrero)” (9 May 2019).
www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf
- [2] GLOBOCAN (2018). World Health Organization. (31 de Marzo de 2019)
<https://gco.iarc.fr>
- [3] Ferri F, Kass S, Ford G. “Gastric Cancer”. Ferri’s Clinical Advisor, 2019, Elsevier.
- [4] Jens Pahl Adelheid Cerwenka. “Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity”, 2018, Elsevier.
- [5] Jelenčić V, Lenartić M, Wensveen FM, Polić B. “NKG2D: A versatile player in the immune system”. *Immunol Lett.* 2017 Sep; 189:48-53.
- [6] Lewis L. Lanier. “NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. Masters of Immunology”. *Cáncer Immunology Research.* 2015.
- [7] Jinyu Zhang, Fahmin Basher, Jennifer D. Wu1. “NKG2D Ligands in Tumor Immunity: Two Sides of a Coin”. *Front Immunol* 2015; 6: 97.
- [8] Lowry LE, Zehring WA. “Potentiation of Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy: A Review of Literature”. *Front Immunol.* 2017 Sep 1;8:1061.