
ASPECTOS INMUNOLOGICOS DE LOS CARCINOMAS BRONCOPULMONARES: CORRELACION CON EL ESTADIO TUMORAL, RESPUESTA A LA TERAPEUTICA Y SUPERVIVENCIA

E. Simó-Camps*, F. Manresa**, A. Anguera*, J.M.^a Vich*, E. Batlló***
G. Vidal**, J.M.^a Puigdollers*** y G. Manresa-Formosa**

Introducción

La alteración de la inmunidad celular manifestada por la falta de respuesta a los antígenos cutáneos (D.N.C.B., P.P.D., Candidina, etc.) y a la transformación blástica de los linfocitos *in vitro* en presencia de fitohemaglutinina, en pacientes con cáncer linfoide^{1, 2, 3} y no linfoide^{4, 5} ha sido bien documentada. Sin embargo, pocas publicaciones existen en la literatura acerca de la alteración de la reacción inmune en pacientes con cáncer de pulmón.

Uno de los primeros trabajos aparecidos en la literatura fue el de Krant⁶, en 1968, el cual utilizando test *in vivo* (D.N.C.B. y P.P.D.) e *in vitro* (número absoluto de linfocitos por mm³ en sangre periférica), establece una correlación entre depresión inmunológica y supervivencia. Israel⁷, en el mismo año, afirma que todo paciente con cáncer de pulmón, sufre una alteración

inmunitaria que no se halla ligada a la difusión de la enfermedad y puede ser detectada en un estadio «precoz». En 1970, Ducos⁸, observa que la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón presentan una alteración de la tasa de transformación blástica de los linfocitos *in vitro* en presencia de fitohemaglutina.

El grupo de Cirugía Torácica del Roswell Park Memorial Institute de Buffalo, son al parecer los que más han profundizado en las alteraciones de la inmunidad en pacientes con cáncer de pulmón. Brugarolas y Takita⁹ en 1971, observan que la falta de respuesta a los antígenos cutáneos conlleva una diseminación de la enfermedad. Han y Takita¹⁰ en 1972, indican que la negativización del test blastogénico conlleva irresecabilidad tumoral y menor supervivencia. Brugarolas y Takita¹¹ en 1973, mediante métodos *in vivo* (Candidina, P.P.D., Varidasa) e *in vitro* (test blastogénico y test de las rosetas) estudian la relación existente entre respuesta inmune, tipo histológico tumoral, localización de la enfermedad, respuesta a la terapéutica y supervivencia. Indican que existe una concordancia entre los test *in vivo* e *in vitro*.

Wells¹², del National Cancer Institute, en octubre de 1973, introduce a las técnicas de exploración ya conocidas, el M.A.E. (Membrana, Antigen, Extracto).

Material y métodos

Pacientes

De octubre de 1973 a septiembre de 1974, hemos estudiado inmunológicamente a 79 enfermos de carcinoma de pulmón mediante un protocolo común, 47 pacientes procedían del Instituto de Neumología Clínica Ntra. Sra. de la Merced y 32 del Departamento de Respiratorio del Hospital del Sagrado Corazón de Barcelona.

En la distribución de los pacientes según el tipo histológico, destaca el elevado número de carcinomas epidermoides. La mayoría de nuestros pacientes fueron diagnosticados por el hallazgo de células neoplásicas como muestra la tabla I. Todos los pacientes eran mayores de 20 años y menores de 75. Existía un claro predominio de los hombres sobre las mujeres (74/5). Ninguno de los enfermos estudiados tomaba corticoides, citostáticos o había sido irradiado previamente.

Exploración inmunológica

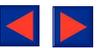
Sensibilización cuantitativa al Dinitroclorobenceno (D.N.C.B.)

Para la sensibilización al D.N.C.B., hemos seguido la técnica descrita por Catalana¹³. Nuestros enfermos han sido sensibilizados con

* Departamento de Inmunología y Quimioterapia Antitumoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Hospital Sagrado Corazón.

** Instituto de Neumología Clínica Ntra. Sra. de la Merced. Barcelona.

*** Hospital del Sagrado Corazón. Barcelona.



dosis de 2.000 y 50 microgramos por 3 cm² en el brazo. Los lugares expuestos al contacto al D.N.C.B. han sido examinados a las 24 y 48 horas para observar la existencia de reacción irritativa y a los 7 y 14 días eritema e induración. En ausencia de respuesta (eritema e induración) a los 14 días, una dosis de recuerdo de 50 microgramos ha sido aplicada en el antebrazo y su lectura realizada a las 24 y 48 horas. La positividad de esta reacción mide la hipersensibilidad retardada (C.D.C.H.). La respuesta al D.N.C.B. se mide en gramos. La existencia de eritema más induración a las dosis de 2.000 y 50 microgramos a los 14 días se califica de grado 4; si solamente la positividad se produce a la dosis de 2.000 la respuesta es calificada de grado 3; si la respuesta tiene lugar en la dosis de recuerdo en el antebrazo, el resultado es calificado de grado 2. En ningún caso hemos practicado biopsia por falta de reacción a la dosis de recuerdo. La infiltración linfocitaria cutánea medida en el examen histológico expresa el grado 1 de D.N.C.B.

Candidina

Como antígeno cutáneo hemos utilizado la candidina del Instituto Pasteur, a la concentración de 1/1.000 y a la dosis de 0,1 ml. intradérmica. Su lectura fue realizada a las 24 y 48 horas. Su positividad (eritema e induración) mayor de 5 mm.

Tasa de transformación blástica de los linfocitos «in vitro» en presencia de fitohemaglutinina

Para su realización se ha seguido el método descrito por Moragas¹⁴. El cultivo se realiza en tubos Falcón estériles, usando 18 linfocitos por cultivo en 2 ml. de medio Tc 199 y añadiendo 0,5 ml. de suero AB descomplementado. Se cultivan dos tubos por prueba: uno usado como control y el otro estimulado con 0,2 ml. de fitohemaglutinina Wellcome. La duración del cultivo es de 72 horas para el que fue estimulado con fitohemaglutinina y de 96 horas en el empleado como control. El recuento de inmunoblastos se realiza citológicamente tiñendo los portas mediante el método de Verde-metilpironina y dando como positivos los que presentan pironinofilia en núcleo o citoplasma.

Número absoluto de linfocitos por mm³ en sangre periférica

Para la separación de los linfocitos se usa el método descrito por Soborg¹⁵, utilizando un gradiente de densidad pielograf-Ficol. Las cifras de normalidad oscilan entre 1.500-3.000 linfocitos por mm³.

Tasa cuantitativa de inmunoglobulinas

Para la determinación cuantitativa de las inmunoglobulinas se ha empleado la técnica procedimiento y equipo Behringwerke¹⁶. Para la medición hemos esperado que la difusión fuera total. Los valores normales para las tres inmunoglobulinas son: IgA= 90-450 mg/%, IgG= 800-1.800 mg/%, IgM= 60-370 mg/%.

Resultados

En la fig.1 se relaciona la respuesta al estímulo inmunitario con el tipo histológico de tumor.

Todos los controles sanos y el 85 % de los pacientes clasificados en los estadios I y II¹⁷, fueron sensibilizados al D.N.C.B.. Solamente el 38 y el 32 % de los enfermos clasificados en los estadios III y IV, mostraron respuesta al D.N.C.B.

El 85, 92, 85 y 92 % de los pacientes clasificados en los estadios I y II

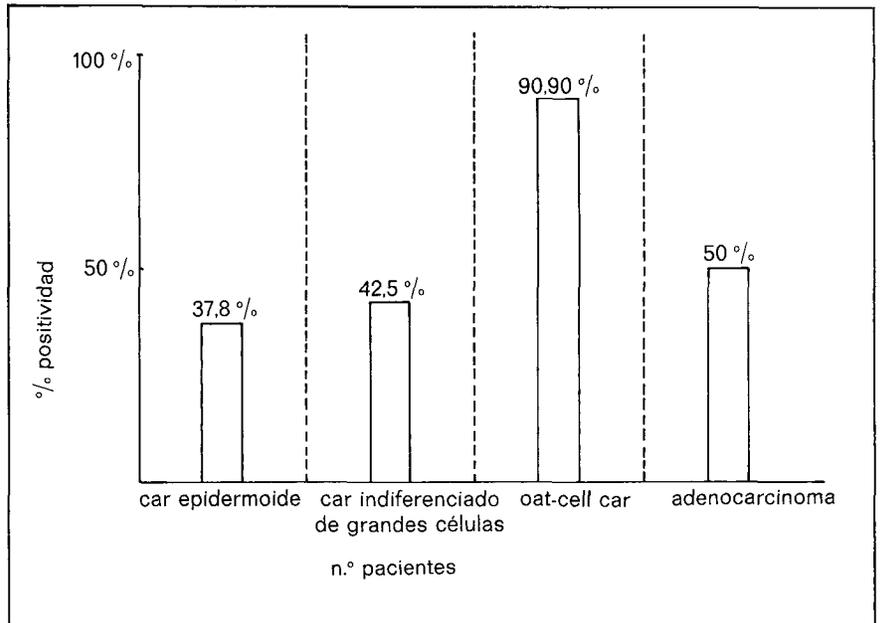


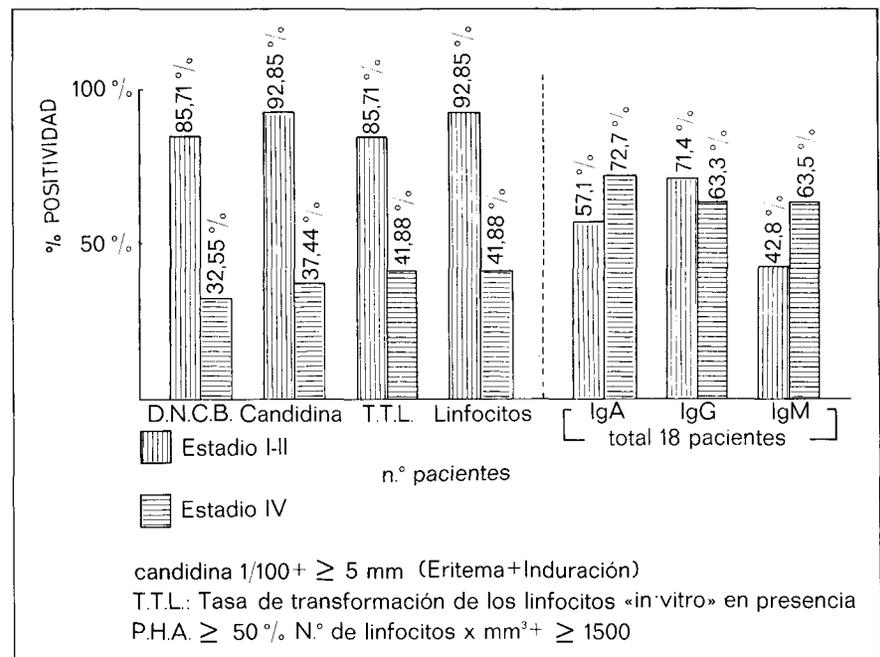
Fig. 1. Respuestas inmunitarias según el tipo histológico tumoral.

respondieron al D.N.C.B., Candidina, test blastogénico y número absoluto de linfocitos por mm³ en sangre periférica, respectivamente. Los pacientes clasificados en el estadio IV solamente el 35 % respondieron a los cuatro test de exploración. En 18 pacientes ha sido posible estudiar la tasa cuantitativa de inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM no hallando variación

significativa de ninguna de ellas en los estadios exploradores, como muestra la fig. 2.

En nuestra casuística no hemos hallado valores significativamente diferentes en cuanto a respuesta inmunológica, entre los estadios III y IV. El 41 % de respuestas las hemos hallado en el estadio III y 35 % de respuestas en el estadio IV.

Fig. 2. Correlación entre la respuesta inmunológica y estado tumoral.



Como muestra la fig.3, 24 pacientes en los que clínicamente el tumor era resecable, fueron estudiados inmunológicamente antes de ser sometidos a cirugía. 89,6 % de los 13 pacientes que fueron resecados presentaron positivos los cuatro test de respuesta, mientras que solamente el 27,7 % de los enfermos irresecables mostraron positividad.

Fueron sometidos a tratamiento quimioterápico 46 enfermos, 20 lograron la remisión y 26 fracasaron. El estudio inmunológico, previo al tratamiento, puso de manifiesto que el 90 % de los 20 pacientes que lograron la remisión, fue correcto. Los pacientes que no mostraron respuesta, el estudio inmunológico se hallaba profundamente deprimido.

En los pacientes en los que la enfermedad ha regresado bajo el influjo de la terapia, se observó que la exploración inmunológica practicada a los 21 días de finalizado el tratamiento, era correcta en todos ellos.

La tabla II muestra los resultados obtenidos en 26 pacientes muertos a los 40 días de la exploración en relación a los resultados obtenidos en los estadios I y II, observándose una gran depresión de la inmunidad en los enfermos con escasa supervivencia.

Todos los pacientes con tumoraciones benignas, el estudio inmunológico fue correcto.

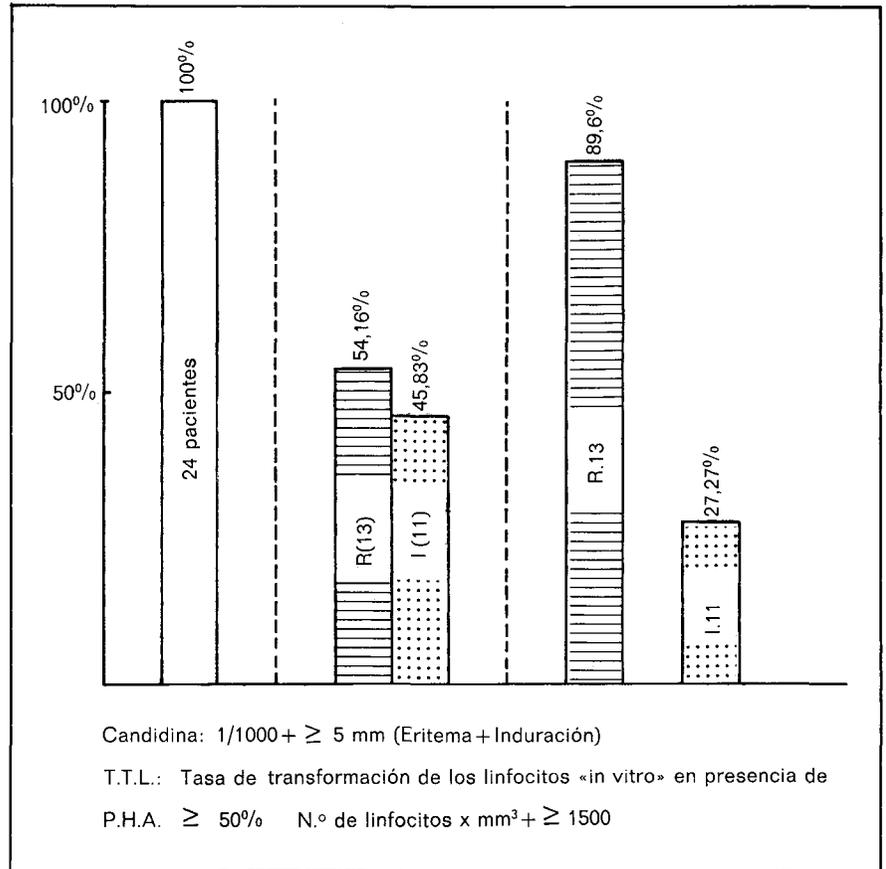


Fig. 3. Correlación entre la exploración inmunológica antes de la cirugía y la resecabilidad tumoral en 24 pacientes.

Discusión

Krant y cols.⁶ en 1968, afirman que la reactividad al D.N.C.B. se halla asociada al tipo histológico tumoral. Tumores muy diferenciados, como el carcinoma epidermoide presentaban mayor respuesta inmune (66 %) que los menos diferenciados, como el anaplásico (38 %) y adenocarcinoma (33 %). Estos hallazgos también han sido publicados por Brugarolas¹¹ y Takita. En nuestro estudio el hallazgo de altos porcentajes de respuesta en el oat-cell carcinoma (tumor muy indiferenciado) contrastan con los datos ofrecidos por estos autores. Sin embargo, los resultados de Wells¹², coinciden con los nuestros al hallar porcentajes de respuesta mayores en los tumores muy indiferenciados que en los más diferenciados como el epidermoide (49 %) y adenocarcinoma (25 %).

Todos nuestros controles sanos fueron sensibilizados al D.N.C.B., Krant⁶ halla un 84 % de positividad, Wells¹² un 98 %, Morton¹⁸ un 95 % Chakravorky¹⁹ un 72 % y Catalana²⁰ un 96 %.

El 85 % de los pacientes en estadio localizado (I y II) fueron sensibilizados al D.N.C.B.; en los estadios III y IV, la posibilidad oscila entre 38 y 32 %, en nuestros pacientes. Brugarolas¹¹, empleando Candidina, PPD, Mumps y Varidasa, señala que en los estadios localizados, la mayoría de los antígenos muestran positividad y en los estadios metastásicos ninguno

de los 49 pacientes por él estudiados mostraron sensibilización a los antígenos cutáneos.

Hers²¹, Nelson²², Wells¹², Brugarolas¹¹, Ducos⁸ y Krant⁶, señalan la existencia de relación entre la exploración *in vivo* e *in vitro*. En nuestra casuística los resultados obtenidos al D.N.C.B., Candidina, test blastogénico y número absoluto de linfocitos en periferia

TABLA I

Distribución de los pacientes según edad, sexo y tipo histológico

Diagnóstico histológico	20-29		30-39		40-49		50-59		60-69		> 70		Total
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	
Car. epidermoide	-	-	-	-	4	-	7	-	17	1	7	1	37
Car. indiferenciado de grandes células.	-	-	1	-	2	-	3	-	3	3	2	-	14
Oat-cell Car.	-	-	-	-	4	-	4	-	2	-	1	-	11
Adenocarcinoma	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	1	-	4
No clasificados	1	-	-	-	1	-	4	-	5	-	2	-	13
Total	1	-	1	-	11	-	18	-	30	4	13	1	79



por mm³, en los estadios localizados, fueron comparativos (85, 92, 85 y 92 %).

Es de destacar que en nuestra casuística no existe diferencia significativa en los resultados obtenidos, por la exploración inmunológica, en los estadios III y IV, pudiéndose considerar el estadio III como metastásico.

En 18 pacientes en los que ha sido posible estudiar la cifra cuantitativa de inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM, no hemos hallado modificaciones apreciables, en cuanto a los estadios explorados, Krant⁷, señala una elevación de la inmunoglobulina IgA en los estadios generalizados.

Eilber⁵ en 1970, señaló la relación existente entre positividad inmunológica y reseabilidad tumoral. El 89 % de nuestros enfermos reseados, presentaban una positividad inmunológica antes de la intervención. En los 11 pacientes que mostraron ser irreseables la respuesta inmune fue del 27 %. Han¹⁰, señala que 8 de los 18 pacientes que fueron reseados y solamente 4 de 26 pacientes inoperables el test blastogénico fue normal. Wells¹², indica que el 69 % de enfermos que presentaron sensibilidad al D.N.C.B. pudieron ser reseados quirúrgicamente, hallando solamente un 19 % de positividad en los irreseables. Estos resultados son también compartidos por Brugarolas y Takita¹¹.

Solamente el 7,8 % de pacientes anérgicos responden a la quimioterapia mientras que el 66,6 % de enfermos no anérgicos logran la remisión en la estadística de Brugarolas¹¹. En nuestra casuística, todos los pacientes que lograron remisión postquimioterapia presentaban una exploración inmunológica correcta en el 90 % de los casos, los 52 enfermos que no lograron la remisión el porcentaje de respuesta inmune fue del 20 %.

Cheema y cols⁴, observan que tanto la tasa de transformación blástica de los linfocitos como los antígenos cutáneos anteriormente deprimidos se normalizan al lograr la remisión del tumor. En 11 de nuestros casos se observó una total normalización de los cuatro test de respuesta. Estos datos no son, sin embargo, compartidos por Twony y cols.²³.

Brugarolas¹¹, señala que la supervivencia media en 23 de sus pacientes anérgicos fué de 1,6 meses; datos así mismo conformados por Krant⁶ Ducos⁸, Han¹⁰, Wells¹² en carcinomas de pulmón y por Chakravorky¹⁹, Eilber⁵, Morton¹⁸ en otros tumores sólidos no linfoides. 20 de nuestros pacientes muertos a los 40 días de su explora-

TABLA II

Respuestas en 26 pacientes muertos a los 40 días de la exploración

Respuestas positivas %	N.º exámenes	D.N.C.B.	Candidina	T.T.L. PHA	Linfocitos × mm ³
estadios I-II	14	85,71 %	92,85 %	85,71 %	92,85 %
Estadios III-IV	44	34,37 %	42,18 %	42,18 %	39,33 %
Globales	79	48,71 %	51,28 %	50 %	47,43 %
Pacientes muertos a los 40 días de la exploración	26	3,70 %	11,11 %	3,70 %	3,70 %
Controles sanos.	50	100 %			

D.N.C.B. = Método de Catalona + 2 - 4
Candidina ≥ 5 mm. (eritema + induración)

T.T.L.: Transformación blástica de los linfocitos «in vitro» en presencia de PHA ≥ 50 %

N.º de Linfocitos por mm³ ≥ 1.500

ción la respuesta inmunológica se hallaba profundamente deprimida 3, 11, 3 y 3% respectivamente en los cuatro test de exploración. En la estadística de Brugarolas¹¹ la supervivencia media de los pacientes con buena respuesta inmunológica se eleva a 9,6 meses.

Conclusiones

El estudio de la inmunidad celular tanto *in vivo* (D.N.C.B., Candidina) como *in vitro* (T.T.L., Número de linfocitos por mm³ en sangre periférica) ha puesto de manifiesto, como ya ha sido demostrado por otros autores, una significativa correlación entre los cuatro test inmuno-específicos de respuesta. El estudio de la inmunidad humoral (tasa cuantitativa de inmunoglobulinas) no ha aportado variaciones significativas tanto en los estadios localizados como en los diseminados.

La exploración inmune no puede ser usada en nuestra casuística, como diagnóstico «precoz», la mayoría de los pacientes con enfermedad limitada presentaban positivos los cuatro test inmunológicos. Sin embargo, puede orientar hacia un pronóstico terapéutico y evolutivo. La falta de respuesta al estímulo inmunitario comporta, en nuestra casuística, diseminación de la enfermedad, menor reseabilidad tumoral, falta de respuesta a la quimioterapia y menor supervivencia.

Resumen

La inmunidad celular fue estudiada en 79 pacientes afectos de carcinoma de pulmón, 50 testigos sanos y 14 tumoraciones benignas, observando si

existía relación entre el estudio inmunológico de los pacientes y el estadio clínico de la enfermedad. La hipersensibilidad retardada fue correlacionada con el tipo histológico tumoral, el estadio de la enfermedad, la respuesta a la quimioterapia, el pronóstico y la supervivencia. Pacientes con anergia presentaban tumores muy diferenciados, falta de respuesta a la terapéutica, avanzada enfermedad y escasa supervivencia. En los pacientes con buena respuesta inmune, la enfermedad se hallaba limitada, respondían más frecuentemente a la terapéutica y presentaban una mayor supervivencia.

Summary

IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF BRONCHOPULMONARY CARCINOMAS. CORRELATION WITH THE TUMOR STAGE, RESPONSE TO THERAPY AND SURVIVAL RATE.

Cellular immunity was studied in 79 patients with carcinoma of the lung, 50 healthy individuals, and 14 cases with benign tumors, to see if there was any relationship between the immunological study of the patients and the clinical stage of the disease. The delayed hypersensitivity was related to the histological tumor type, the stage of the disease, response to chemotherapy, prognosis and survival rate. Anergic patients showed well differentiated tumors, lack of response to therapy, advanced disease, and low survival rate. In patients with good immune response the disease was limited, there was more frequent response to therapy and they displayed a higher survival rate.



BIBLIOGRAFIA

1. AISENBERG, A.C.: Manifestations of immunologic unresponsiveness in Hodgkin's disease. *Cancer Res.*, 26: 1.152, 1966.
2. BROWN, R.S., HAYNES, H.A., FOLEY, H.T., GODWIN, H.A. BERNARD C.W. y CARBONE, P.P.: Hodgkin's disease: Immunologic, clinical and histologic features of fifty untreated patients. *Ann. Intern. Med.*, 67: 291, 1967.
3. CONE, L. y UHR, J.W.: Immunologic deficiency disorders associated with chronic lymphocyte leukemia and multiple myeloma. *J. Clin. Invest.*, 43: 2.241, 1964.
4. CHEEMA, A.R. y HERS, E.M.: Patient survival after chemotherapy and its relationship to in vitro lymphocyte blastogenesis. *Cancer*, 28: 851, 1971.
5. EILBER, F.R. MORTON, D.L.: Impaired immunologic reactivity and recurrence following cancer surgery. *Cancer*, 25: 362, 1970.
6. KRANT, M.J., MANSKOPF, G., BRANDDRUP, C.S. y MADOFF, M.A.: Immunologic alterations in bronchogenic cancer. *Cancer*, 21: 623, 1968.
7. ISRAEL, L., BOUVRAIN, A., CROSDÉCAM y J. MUGICA, J.: Contribution a l'étude des phénomènes d'immunité cellulaire chez les cancéreux pulmonaires. Avant traitement palliatif ou chirurgical. *Poumon et Coeur*, 24: 339, 1968.
8. DUCOS, J., MIGUERES, J., COLOMBIES, P., KESSOUS, A. y POUJOLET, N.: Lymphocyte response to PHA in patients with lung cancer. *Lancet*, 1: 1.111, 1970.
9. BRUGAROLAS, A. y TAKITA, H.: Skin test in the staging of carcinoma of the lung. *Clin. Res.*, 19: 737, 1971.
10. HAN, T. y TAKITA, H.: Immunologic impairment in bronchogenic carcinoma: a study of lymphocytes response to phytohemagglutinin. *Cancer*, 30: 616, 1972.
11. BRUGAROLAS, A. y TAKITA, H.: Immunologic status in lung cancer. *Chest*, 64: 427, 1973.
12. WELLS, S.A., BURDICK, J.F., JOSEPH, W.L., CHRISTIANSEN, C.L., WOLFE W.G. y ADKINS, P.C.: Delayed cutaneous hypersensitivity reacts to tumour cell antigens and to nonspecific antigens. Prognostic significance in patients with lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 66: 557, 1973.
13. CATALONA, W.J., TAYLOR, P.T., RABSON, A.S. y CHRETIEN, P.B.: A method for D.N.C.B. contact sensitization: A clinicopathologic study. *New. Engl. J. Med.*, 286: 399, 1972.
14. MORAGAS, J.M. y ANGUERA, A.: Indice de transformación blastica de los linfocitos en las farmacodermias. *Rev. Clin. Esp.*, 124: 3, 1972.
15. SOBORG, M. y BENDIXEN, G.: Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity. *Acta Med. Scand.*, 181: 247, 1967.
16. MANCINI, G., CARBONOVA, A.D. y HEREMANS, J.F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2: 235, 1965.
17. MOUNTAIN, C.: Prognostic implications of presurgical staging in lung cancer. *Cancer Medicine* (Holland), J.F. and Frei, E. III eds. Philadelphia, Lea and Febiger, 1975, p. 1.491-1.492.
18. MORTON, D.L., HOLMES, E.C., EILBER, R.F. y WOOD, W.C.: Immunological aspects of neoplasia: A rational basis for immunotherapy. *Ann. Intern. Med.* 74: 587, 1971.
19. CHAKRAVOTTY, R.C., CURUTCHET, H.P., COPOLLA, F.S., PARK, Ch.M. BLAYLOCK, K. y LAWRENCE, W. Jr.: The delayed hypersensitivity reaction in the cancer patients: Observations on sensitization by D.N.C.B. *Surgery*, 73: 730, 1973.
20. CATALONA, W.J. y CHRETIEN, P.B.: Abnormalities of quantitative Dinitrochlorobenzene sensitization in cancer patients: Correlation with tumor stage and histology. *Cancer* 31: 353, 1973.
21. HERS, E.M. y OPPENHEIM, J.J.: Impaired In Vitro lymphocyte transformation in Hodgkin's disease. *New. Engl. J. Med.* 273: 1.003, 1965.
22. NELSON, H.S.: Delayed hypersensitivity in cancer patients. Cutaneous and in vitro lymphocyte response to specific antigens. *J. Natl. Cancer Inst.*, 42: 765, 1969.
23. TWOMEY, P.L., CATALONA, W.J. y CHRETIEN, P.B.: Cellular immunity in cured cancer patients. *Cancer*, 33: 435, 1974.