

EL DOBLE MENSAJE DE LOS MASTOCITOS PARA LOS TUMORES

EUGENIA SACERDOTE de LUSTIG*, LILIA LAURIA de CIDRE

Departamento de investigación, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

En relación a los tumores, los linfocitos han sido la gran vedette del tratamiento biológico del cáncer en esta última década, mientras que otras células del sistema inmune han sido descuidadas. Más de un siglo ha transcurrido desde que Paul Ehrlich, en 1877, descubrió las células cebadas que denominó *mastzellen* (del alemán *mast*: alimento) al suponer que los gránulos característicos de su citoplasma almacenaban sustancias nutritivas. Todavía hoy, se está discutiendo sobre el origen de estas células que, por sus múltiples reacciones, podrían llamarse "pequeñas bombas de tiempo". Ahora sabemos que los mastocitos constituyen una población heterogénea que se encuentra principalmente en el tejido conectivo de órganos que constituyen una puerta de entrada potencial para los antígenos (dermis, y mucosas de órganos respiratorios y digestivos), con una ubicación predominantemente perivascular. Potentes mediadores biológicos, como heparina, histamina, y serotonina, se encuentran localizados en sus gránulos, mientras que otros, como los mediadores del ácido araquidónico, son liberados bajo la acción de distintos estímulos antigénicos.

La superficie celular de los mastocitos presenta receptores específicos para la IgE, lo que les permite participar en muchos procesos patológicos, tales como reacciones inmunes¹⁸, psoriasis¹² urticaria pigmentosa¹⁶, hemangioma⁴ y una amplia variedad de tumores^{1, 17, 21, 23}. Intervienen así en todos los fenómenos de alergia, inflamación y formación de varias citoquinas. Los mastocitos son células de forma irregular, de 20-30 nm de diámetro, fácilmente visualizables en preparaciones histológicas dado que sus abundantes gránulos citoplasmáticos se tiñen con colorantes básicos metacromáticos;

este fenómeno se debe a que los gránulos poseen proteoglicanos sulfatados como principal constituyente. El análisis histoquímico de los proteoglicanos permitió separar, en primera instancia, dos subpoblaciones de mastocitos: aquellos de la dermis y de la cavidad peritoneal (CTMC en inglés) y los mastocitos de la mucosa gastrointestinal (MMC). Mediante la coloración de alcian blue y safranina, los primeros son predominantemente safranina positivos, mientras que los segundos son alcian blue positivos. Estudios posteriores de tipo morfológico, bioquímico, inmunológico y funcional permitieron caracterizar en forma más acabada dichas subpoblaciones. A partir de la última década, cuando ya se conocían las características de los diferentes fenotipos de los mastocitos, experiencias *in vitro*, e *in vivo*, con ratones deficientes en mastocitos, demostraron que las diferencias entre estas dos poblaciones podían ser modificadas en función de su microambiente específico.

Estudiando, en el ratón, la transformación de linfocitos del timo en linfocitos leucémicos, Ginsburg⁵, en 1963, los cultivó *in vitro* en presencia de MLV (el virus de la leucemia murina) sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios irradiados, y observó, al cabo de 48 horas, la degeneración de los linfocitos y la aparición de células, las cuales por sus características, definió como mastocitos. En la década del 80, varios investigadores, cultivando células hematopoyéticas en presencia de sobrenadantes de linfocitos T activados, obtuvieron cultivos de mastocitos semejantes a los MMC, en lo que se refiere al proteoglicano presente en sus gránulos (condroitinsulfato) y al bajo contenido de histamina. Estos cultivos de mastocitos brindaron un modelo accesible para responder la siguiente pregunta: son las dos poblaciones de mastocitos fenotípicamente diferentes o se trata de una sola población capaz de intercambiar su morfología?. En 1988, Hammel⁷ dio una respuesta categórica: cultivando mastocitos de ganglios linfáticos sobre fibroblastos embrionarios obtuvo células de

Recibido: 19: 19-XII-1990.

Aceptado: 20-III-1991

* Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Dirección postal: Departamento de Investigación, Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Avda. San Martín 5481, 1417 Buenos Aires, Argentina.

tipo conectivo con muchos gránulos de pequeño tamaño que contenían heparina. Si se cultivaban mastocitos de médula ósea en un medio condicionado por linfocitos T activados que contienen IL-3, se obtenían mastocitos del tipo MMC, alcian blue positivos y safranina negativos, con gránulos más grandes, mediadores difusibles y vida media más corta *in vitro*; además, dependiendo del medio condicionado, se observaban estadios intermedios²⁰. Estos experimentos permitieron deducir que los MMC son LT (linfocitos T) dependientes y, que es la IL-3 la responsable de su fenotipo, mientras que los fibroblastos serían los responsables de la aparición de los mastocitos del tipo CTMC, que sintetizan un 40% de heparina.

Pero había que corroborar *in vivo* los resultados obtenidos *in vitro*; una cepa de ratones, la W/W deficiente en mastocitos, le dio la oportunidad a Kitamura¹⁰ de demostrar que los distintos fenotipos de mastocitos no se podían catalogar como estirpes permanentes. Trasplantando células de médula ósea de ratones normales (cuyos mastocitos son reconocibles por sus gránulos grandes) obtuvo el fenotipo MMC inyectándolos en órganos digestivos, y el tipo CTMC, inyectándolos en dermis o cavidad peritoneal. El tamaño de los gránulos permitió deducir que los mastocitos formados provenían de las células hematopoyéticas del dador. Nakano et al¹⁴ y Sonoda et al¹⁹ observaron que transfiriendo cultivos de médula ósea activados con IL-3 y IL-4 en cavidad peritoneal y en mucosa del estómago de ratones W/W se originaban mastocitos Alcian blue negativos y Safranina positivos y viceversa, respectivamente.

La estabilidad del fenotipo de los mastocitos estaría determinado por el microambiente tisular donde factores fibroblásticos o linfoquinas serían los responsables de su diferenciación; conociendo la inestabilidad fenotípica de los mastocitos en condiciones normales, nos preguntamos qué pasaría con estas células en un ambiente tumoral y cuáles serían las relaciones recíprocas.

Ya sabemos de los muchos y potentes mediadores como la heparina, la histamina, y la serotonina que liberan los mastocitos, pero, aquí nos vamos a referir solamente a los efectos del principal componente de los mismos, la heparina y, por ende, a los mastocitos de tipo conectivos (CTMC), que contactan fácilmente con la matriz extracelular de los tumores.

La heparina es un glicosaminoglicano sulfatado compuesto por moléculas de distinto tamaño que actúan cada una en forma distinta. Está constituida por cadenas repetidas de dos ácidos urónicos y un azúcar aminado, la α -D-glucosamina. Sin duda, la propiedad más conocida de la heparina es su acti-

vidad anticoagulante a través de su unión al inhibidor natural de la trombina: la antitrombina ATIII. Esta, al ser activada, modifica su conformación estructural e inhibe los factores de la coagulación, particularmente la trombina. Estas sin embargo, no son las propiedades que nos interesan particularmente. Nos vamos a referir ahora a otras propiedades como su actividad moduladora del crecimiento de las células normales (por ej. de los vasos) y de las células tumorales.

El hecho que la heparina se una a receptores específicos de membrana en una gran variedad de células y que muchos de los factores de crecimiento tengan afinidad por la heparina, explica, en parte, como esta molécula puede actuar, en algunos casos como inhibidor del crecimiento tumoral y en otros, estimulándolo. Mientras las células endoteliales necesitan de la heparina para su crecimiento, las musculares lisas de la pared de los vasos son, por el contrario, inhibidas en su crecimiento por la heparina que actúa disminuyendo el número de receptores para el factor de crecimiento epidermal (EGF) de la membrana celular ¿Qué rol juegan entonces los mastocitos en los tumores?. Los resultados son contradictorios. Ya se conoce el papel de la heparina en el proceso de la angiogénesis tumoral cuando el tumor pasa de una fase avascular a una fase vascular, fenómeno que facilita su crecimiento. La guía dejada por la heparina permite la migración de las células endoteliales hacia el tumor, como parte de la cascada angiogénica tumoral.

En nuestra experiencia, la sola presencia del tumor estimula la afluencia de mastocitos en el área peritumoral y, finalmente en aquella intratumoral. Se trata en estos casos de mastocitos del tipo conectivo¹¹. ¿Qué papel juegan estos mastocitos? En experimentos *in vivo*, inoculando células de un adenocarcinoma mamario de ratón con mastocitos peritoneales en una relación 10:1, hemos comprobado una reducción en la incidencia tumoral del 70%, cuando los mastocitos provenían de animales sanos. Cuando estos provenían de ratones portadores de tumor, no ejercían acción alguna sobre la incidencia tumoral. Con técnicas histoquímicas, hemos observado que los mastocitos de cavidad peritoneal de un portador de tumor, se encuentran en un estado fisiológico distinto a los de animales normales, en su contenido de mediadores químicos lo que explicaría los resultados obtenidos. Esta observación hace pensar una vez más en la influencia generalizada del tumor sobre las células del huésped. Nuestras observaciones coinciden con recientes trabajos de Myers y col.¹³ y De Lap³, quienes, utilizando análogos de la heparina, la suramina o el pentosan polisulfato, observaron actividad

antitumoral in vivo e in vitro. Actualmente están ensayando el pentosan polisulfato en pacientes con distintos tipos de tumores, dejando de lado la suramina por haberse comprobado su acción inmunosupresora. La acción antitumoral de estos compuestos se debería a la interferencia con la unión del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) al receptor de la célula tumoral. Contrariamente, Roche¹⁵ sostiene que los mastocitos que participan de la respuesta inflamatoria de los tumores estimulan el crecimiento tumoral in vivo, aumentando la masa tumoral en un 50%. Según este autor, modificando la permeabilidad de la membrana con cromoglicatos se impide la liberación de los mediadores de los gránulos de los mastocitos y se inhibe el crecimiento tumoral. Este autor sostiene que la heparina es mitógena no solamente para las células tumorales, sino también para fibroblastos y células endoteliales. Estudios histopatológicos de Harveit y col.⁸ asocian el elevado número de mastocitos presentes en un tumor (cáncer de mama, por ej.) con un mal pronóstico, mientras que Dabbous y col.² presentan evidencias que los mastocitos facilitan la invasión tumoral activando colagenasas latentes y promoviendo la actividad colagenolítica. Sin embargo, Takafuni y col.²² le asignan a los mastocitos un rol de defensa del huésped contra la agresión tumoral y consideran de buen pronóstico la presencia de mastocitos peri e intratumorales en el cáncer de mama, en el sarcoma de partes blandas y en el cáncer de cuello uterino. Apoyan este concepto en el hecho de que los pacientes con metástasis pertenecen a un grupo con un bajo número de mastocitos. A su vez, Halper⁶ ha demostrado la inhibición por heparina del crecimiento in vitro de las células del carcinoma de suprarrenal (línea humana SW13) al igual que de las células de cervix de rata, asociada a la presencia de abundantes receptores de membrana específicos para heparina y dextran sulfato.

¿Cómo se explicaría este doble mensaje de la heparina hacia las células tumorales? Henderson⁹ observó que los mastocitos son tóxicos in vitro, en una línea de linfoma ascítico de ratón; su acción sería simplemente citostática ya que el ciclo celular queda inhibido en G0 o G1, mientras que el simple agregado de factores de crecimiento fibroblástico revierte la inhibición heparínica. Este difícil equilibrio entre heparina y factores de crecimiento se repetiría in vivo en los distintos tiempos de la evolución tumoral. La heparina sería, por lo tanto, una molécula moduladora del crecimiento tumoral regulando la síntesis de los factores autocrinos de crecimiento tumoral que presentan una particular afinidad para este glicosaminoglicano. Una excesi-

va producción de los mismos o una elevada actividad proteásica de los tumores con gran capacidad metastásica, podría sobrepasar la actividad inhibitoria de la heparina que actuaría, además, sobre el crecimiento tumoral en forma indirecta inhibiendo la heparinasa, una de las enzimas que favorece la cascada metastásica.

Si antes se relacionaba la capacidad antimetastásica de la heparina (por ej. en los melanomas experimentales) con la capacidad antiagregante de las células tumorales con las plaquetas, hoy, se interpreta su acción como una barrera de la degradación del heparan-sulfato de la matriz extracelular peritumoral. Para completar el cuadro de la relación entre mastocitos y células tumorales no se debe olvidar que la heparina podría, además, impedir la adhesión de las células metastatizantes en la microcirculación pulmonar uniéndose al dominio heparínico de la fibronectina que, normalmente, facilita la adhesión de las células tumorales a la membrana basal y a los vasos.

Los mastocitos podrían actuar también como moduladores de la función inmune, ya que, al ser activados por los antígenos tumorales liberan una gran variedad de citoquinas.

Volviendo al cultivo de mastocitos, exitosamente obtenido en estos últimos años, nos encontramos con un nuevo factor ya que el cultivo prolongado de estas células ha revelado la presencia de una molécula funcionalmente similar al *Tumor Necrosis Factor* (TNF). La presencia de esta citoquina en los gránulos se demostró con el uso de un antisuero contra el TNF sérico: este antisuero bloqueó la acción citotóxica del medio condicionado de los mastocitos. A su vez, en el citoplasma de los mastocitos se encuentra un RNA mensajero de TNF. Esta citoquina, originariamente aislada de los macrófagos, y con efectos biológicos tan heterogéneos relacionados con la citotoxicidad celular, con los fenómenos de alergia, de inflamación, de remodelación ósea y de respuesta a la toxicidad parasitaria, también se encontraría en los mastocitos. La liberación de TNF induciría la síntesis de una enzima antioxidante mitocondrial, la superóxido dismutasa de tipo manganeso, que, normalmente, está ausente en los tumores. ¿Será ésta otra vía que utilizan los mastocitos en su lucha contra las células tumorales?

El cuento no ha terminado porque injertando tumores en una cepa de ratones carente de mastocitos (la W/W) el número de metástasis no se eleva respecto del control. ¿Habrá tumores resistentes y otros sensibles a los factores liberados por los mastocitos como se observa con el TNF? ¿Cuáles de los mastocitos de diferente origen serán los product-

res de TNF?. Un largo camino todavía nos espera para asignar al mastocito su verdadero rol en el campo de la patología tumoral.

Bibliografía

1. Baroni C: On the relationship of mast cells to various soft tissue tumors. *Br J Cancer* 18: 686, 1964.
2. Dabbous MK, Walker R, Haney L et al: Mast cells and matrix degradation at sites of tumor invasion on rat mammary adenocarcinoma. *Br J Cancer* 54: 459, 1986.
3. De Lap R: AIDS drug gets trial as cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 82: 1671, 1990.
4. Glowacki J, Mulliken JB: Mast cells in hemangiomas and vascular malformations. *Pediatrics* 70: 48, 1982.
5. Grisburg H, Sachs L: Formation of pure suspensions of mast cells tissue culture by differentiation of lymphoid cells from mouse thymus. *J Natl Cancer Inst* 31: 1, 1963.
6. Halper J: Specific binding of (3H) heparin to human carcinoma SW-13 and other mammalian cells. *Exp Cell Res* 187: 324, 1990.
7. Hammel I, Shiloh-Rabinovich H, Nir I: Two populations of mast cells on fibroblast monolayers: correlation of quantitative microscopy and functional activity. *J Cell Sci* 91: 13, 1988.
8. Harveit F, Thorensen St et al: Mast cell changes and tumor dissemination in human breast carcinoma. *Invasion and Metastasis* 4: 146, 1984.
9. Henderson W: Mast cell mediated tumor cell cytotoxicity. *J Exp Med* 153: 520, 1981.
10. Kitamura Y, Kanakura Y, Fujita J, et al: Differentiation and transdifferentiation of mast cell: a unique member of the hematopoietic cell family. *Int J Cell Cloning* 5: 108, 1987.
11. Lauria de Cidre L, Sacerdote de Lustig E: Mast cell kinetics during tumor growth. *Tumor Biology* 11: 196, 1990.
12. Mottaz JH, Zelickson AS, Thorne FG et al: Blood vessel changes in psoriatic skin. *Acta Derm Venerol* 53: 195, 1973.
13. Myers E: Heparin analogues: a new family of anticancer drugs. *J Natl Cancer Inst* 81: 1346, 1989.
14. Nakano T, Sonoda T, Hayashi c et al: Fate of bone marrow derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal and intravenous transfer into genetically mast cell-deficient W/W mice. *J Exp Med* 162: 1025, 1985.
15. Roche WR: Mast cells and tumors: the specific enhancement of tumor proliferation in vitro. *Am J Pathol* 119: 57, 1985.
16. ryan TJ: Factors influencing the growth of vascular endothelium in the skin. *Br J Dermatol* 82: 99, 1970.
17. Simu G, Csaba G: Mast cells in tumor bearing patients. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 20: 327, 1972.
18. Smith SS, Basu PK: Mast cells in corneal immune reaction. *Canad J Ophthalmol* 5: 175, 1972.
19. Sonoda S, Sonoda T, Nakano T, et al: Development of mucosal mast cells after injection of a single connective tissue mast cell in the stomach mucosa of genetically mast cell-deficient W/Wc mice. *J Immunol* 137: 1319, 1986.
20. Stevens RL, Austen KK: Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. *Immunol Today* 10: 381, 1989.
21. Svennevig JL: In situ identification of inflammatory cells in malignant, non lymphoid human tumors. *Arch Pathol Microbiol Scand* 88: 387, 1980.
22. Takafuni U et al: Prognostic significance of mast cells in soft tissue sarcoma. *Cancer* 62: 2416, 1988.
23. Thorensen S, Harveit F: Mast cells and the nodal sinoreaction in breast cancer. *Histopathology* 6: 765, 1982.

La succession des chercheurs est comparable a un seul homme que apprend indéfiniment.

La sucesión de investigadores es comparable a un solo hombre que aprende indefinidamente.

Blaise Pascal (1623-1662)

Pensées