

L. Martínez\*,  
M. L. Hortas\*\*,  
J. A. Castilla\*\*,  
I. Trigo\*\*,  
F. Samaniego\*\*,  
A. J. Herruzo\*

# Inmunorregulación local en la enfermedad fibroquística de la mama

## Local immunoregulation in fibrocystic breast disease

### SUMMARY

*This study was conducted to evaluate the role of the immune systems in the physiology of fibrocystic breast disease. We investigated the mononuclear cell subsets in breast cyst fluid and peripheral blood from premenopausal women, aged 28-40 years, which were previously diagnosed of gross cystic disease. We have studied 7 breast cyst fluids. Mononuclear cells were analyzed by monoclonal antibodies, direct immunofluorescence and automated flow cytometry.*

*Mononuclear cells were present in breast cyst fluid at a mean concentration of  $3,542 \pm 450$  cel/ml. A marked increase in the proportion of monocytes (CD14+) was observed in breast cyst fluid as compared with peripheral blood ( $79.1 \pm 6.2\%$  versus  $6.8 \pm 2.1\%$ ;  $p < 0.001$ ). We found no alterations in the proportions of T lymphocytes (CD3+), helper/inducer T cell (CD4+), suppressor/cytotoxic T cell (CD8+) and B cell. However, the percentage of natural killer cells (CD16+) was significantly increased in breast cyst fluid compared to peripheral blood ( $25.1 \pm 6.7\%$  versus  $11.3 \pm 7.9\%$ ;  $p < 0,01$ ). The data presented here suggested immunoregulation in gross cystic disease. The main cells involved were monocytes and natural killer cells.*

\* Departamento de Obstetricia y Ginecología.  
\*\* Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Virgen de las Nieves. Granada.

Correspondencia:  
A. Herruzo Nalda.  
Departamento de Obstetricia y Ginecología.  
Hospital Virgen de las Nieves.  
Avda. Fuerzas Armadas, 2.  
18014 Granada.

### Palabras clave

*Mastopatía fibroquística, Quiste mamario, Subpoblaciones leucocitarias.*

### Key words

*Fibrocystic breast disease, Breast cyst, Lymphocyte subpopulations.*

## INTRODUCCION

La mastopatía fibroquística (MFQ) es la patología mamaria más frecuente. Se ha definido como un estado patológico crónico caracterizado por una proliferación disarmónica de los componentes del estroma y del parénquima que puede resultar en el desarrollo de tumores sólidos o quistes palpables.<sup>1</sup> La relación entre MFQ y cáncer de mama aún permanece en discusión.<sup>2</sup>

El tejido mamario normal está sometido a un ambiente hormonal que interviene en el control de la proliferación y de la diferenciación de las células ma-

marias. La unión de hormonas esteroideas a sus receptores específicos provoca la secreción paracrina de factores de crecimiento que actuarán favoreciendo o inhibiendo el crecimiento celular. Receptores para estos factores han sido descritos en células ductales.<sup>3</sup> No existen evidencias claras de que las alteraciones hormonales séricas sean las responsables de la proliferación o los cambios metaplásicos existentes en los quistes mamarios de la MFQ, lo que induce a buscar una causa local de la enfermedad.<sup>4</sup>

Si entre las funciones fundamentales del sistema inmune se encuentra el de controlar el crecimiento

celular (tumoraes, deciduales, etc.), sería lógico pensar que el sistema inmune puede desempeñar un papel fisiológico clave en situaciones que conllevan un desarrollo celular importante, como ocurre en la mastopatía fibroquística. El ambiente hormonal intraquístico parece un factor condicionante en la fisiopatología de esta enfermedad, habiéndose descrito una relación entre hormonas esteroideas e inmunidad local.<sup>5</sup> Por otra parte, han sido detectadas concentraciones efectivas de factores de crecimiento en líquidos quísticos mamarios (EGF, PDGF, b-TGF) acordes con un ambiente permisivo para la proliferación celular.<sup>6</sup>

En este trabajo nos proponemos estudiar las diferentes subpoblaciones de células leucocitarias en líquido de macroquistes de mama con el objeto de profundizar en la inmunorregulación de la mastopatía fibroquística.

## MATERIAL Y METODOS

Se estudian 7 quistes mamarios procedentes de 6 mujeres afectas de MFQ. Todas ellas fueron sometidas a exploración física, mamografía, ecografía, punción-aspiración con aguja fina (PAAF) del quiste, neumoquistografía y citología del material aspirado. La punción mamaria se realizó en fase lútea del ciclo menstrual, obteniendo el mismo día una muestra de sangre periférica de cada una de las pacientes. La edad de todas las mujeres oscilaba entre 29 y 37 años y ninguna de ellas presentaba signos o síntomas de otras patologías asociadas.

Tras aislamiento de las células en gradientes de Ficoll-Hypaque, se procedió al análisis fenotípico de las células mononucleadas de líquido de quiste de mama mediante inmunofluorescencia de doble marcaje, incubando simultáneamente las células con 2 anticuerpos monoclonales de especificidades distintas frente a antígenos de membrana, marcados con isocianato de fluoresceína (FITC) y con ficoeritina (PE). Para ello las células se suspendieron en 1 ml de RPMI 1640 (GIBCO, Gran Island; NY) y de esta suspensión celular se tomaron 50 ml, incubándose durante 30 minutos en hielo con 5 ml de un AcMo marcado con FITC y con 5 ml de AcMo marcado con PE. En la tabla I se describen las características de los anticuerpos monoclonales (AcMo; Becton Dickinson, Mountain View, California) utiliza-

TABLA I  
CARACTERISTICAS DE LOS ANTIGENOS DE DIFERENCIACION (CD) IDENTIFICADOS MEDIANTE AcMo EN ESTE ESTUDIO

CD	AcMo	Población	Comentario
CD3	Leu4	Linfocitos T	Asociado al TCR
CD4	Leu3	Linfocitos T helper/inductores	Interacción con Ag MHC-II
CD8	Leu2a	Linfocitos T supresores citotóxicos, subgrupo de NK	Interacción con Ag MHC-I
CD19	Leu12	Linfocitos B	
CD16	Leu11c	Natural killer	Receptor Fc gamma
CD14	Leu M3	Monocitos	
CD45	Panleucocyte	Leucocitos	

dos en este estudio. Tras 2 lavados con solución salina tamponada (PBS), la suspensión fue fijada con 1% p-formaldehído/0,15 M PBS (pH 7,2) para su posterior estudio.

El análisis de las distintas subpoblaciones de células mononucleadas se realizó mediante citometría de flujo (FACscan IV, Becton Dickinson Monoclonal Center, Mountain View, California). El método estadístico utilizado fue de Wilcoxon para 2 muestras de variables cualesquiera y con muestras apareadas.

## RESULTADOS

Se observó una concentración intraquística media de células mononucleadas de  $3.542 \pm 450$  cél/ml, con un rango de 0 a 7.800 cél/ml. El porcentaje de monocitos (células CD14+) fue significativamente superior en líquido quístico que en sangre periférica ( $79,1 \pm 6,2\%$  versus  $6,8 \pm 2,1\%$ ;  $p < 0,001$ ).

Al estudiar los distintos tipos de linfocitos T no encontramos diferencias significativas en la proporción de linfocitos T (CD3+), T helper/inducer (CD4+) y T supresores/citotóxicos (CD8+) entre el líquido de quiste de mama y sangre periférica (tabla II). Tampoco hallamos diferencias en los porcentajes de células mononucleadas CD19+ (linfocitos B) del líquido de quiste de mama y de la sangre periférica de las mismas mujeres. Sin embargo, sí observamos una proporción más elevada de células natural killer (NK) en líquido quístico que la existente en sangre periférica ( $25,1 \pm 6,7\%$  versus  $11,3 \pm 7,9\%$ ;  $p < 0,01$ ).

TABLA II  
DISTRIBUCION DE LINFOCITOS T Y B  
EN LIQUIDO DE QUISTE DE MAMA

Células	Sangre periférica	L quístico	p
CD3 (linfocitos T)* .....	74,2 ± 6,5	70,1 ± 8,2	NS
CD4+ (T helper/inductores).....	47,9 ± 10,8	43,3 ± 7,3	NS
CD8+ (T supresores/citotóxicos).	25,1 ± 7,3	29,1 ± 7,9	NS
CD4+/CD8+ .....	1,5 ± 1,4	1,1 ± 0,9	NS
CD19+ (linfocitos B) .....	6,7 ± 3,7	9,2 ± 4,9	NS
CD16+ (NK) .....	11,3 ± 7,9	25,1 ± 6,7	< 0,01

\* Porcentaje medio ± desviación estándar referido al total de linfocitos.

## DISCUSION

La etiología de la MFQ y el origen de los fenómenos proliferativos y metaplásicos que ocurren en esta enfermedad están aún por dilucidar. Tampoco está aclarada la posible relación entre MFQ y cáncer de mama, y aunque se ha descrito la continuidad entre lesiones benignas y cáncer,<sup>7, 8, 9, 10, 11</sup> existen autores que no han podido demostrar esta asociación.<sup>12, 13</sup> Lo que sí parece claro es que en aquellos casos de MFQ en los que aparece hiperplasia epitelial, sobre todo cuando existen atipias celulares, el riesgo de evolucionar a carcinoma se incrementa.<sup>14, 15, 16</sup> Otros autores han descrito que las pacientes con macroquistes mamarios (quistes 3 mm o más) tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama<sup>17</sup> que las que no los tienen, afirmación que no es compartida por todos.<sup>14</sup>

Nuestros resultados demuestran que la población predominante de células mononucleadas en líquido quístico de mama son los monocitos, encontrándose también un elevado porcentaje de células NK. El papel que los monocitos pueden jugar en la fisiología de la enfermedad macroquística es desconocido, pero el hecho de que *in vitro* los monocitos tengan una actividad inmunosupresora,<sup>18</sup> sugiere que su papel podría estar dirigido a crear un ambiente inmunosupresor permisivo del crecimiento desmesurado que ocurre en la enfermedad fibroquística. Las causas del incremento de monocitos en líquido quístico son desconocidas, aunque se han descrito distintas sustancias capaces de estimular la proliferación de monocitos en dicho líquido *in vitro*, tales como el factor de crecimiento insulina-like tipo I<sup>19</sup> o estradiol.<sup>20</sup>

Tanto los linfocitos T como B parecen no tener un papel preponderante en la enfermedad macroquísti-

ca, pues el hecho de que su proporción no difiera significativamente de la encontrada en sangre periférica sugiere un origen sistémico más que local. No ocurre lo mismo con las células natural killer, las cuales se encuentran muy elevadas en líquido quístico con respecto a los valores encontrados en sangre periférica. Se ha descrito que el líquido quístico de mama es capaz de inhibir *in vitro* la actividad NK, atribuyéndose esta acción al cortisol.<sup>21</sup> Sin embargo, estudios *in vivo* con ratones han demostrado que estrógenos a los niveles observados en líquido quístico son capaces de estimular e incrementar la actividad y el número de células NK.<sup>22</sup>

Dada la capacidad de las células natural killer de controlar el crecimiento tumoral,<sup>23</sup> y dado el papel inmunosupresor monocitario, las proporciones relativas de monocitos y células NK en líquidos quísticos mamarios podrían influir conjuntamente con un ambiente hormonal determinado en el control y en el desarrollo de las lesiones proliferativas mamarias que acontecen en la MFQ.

## RESUMEN

Se estudian las diferentes subpoblaciones leucocitarias presentes en líquido de quistes de mama. Se puncionaron 7 quistes mamarios procedentes de 6 mujeres afectas de enfermedad macroquística. Tras aislamiento de la población leucocitaria con gradientes de densidad, las subpoblaciones de células mononucleadas fueron estudiadas mediante citometría de flujo previo marcaje con anticuerpos monoclonales específicos (inmunofluorescencia directa).

Se observó una concentración intraquística media de células mononucleadas de  $3.542 \pm 450$  cél/ml. El porcentaje de monocitos (células CD14+) encontrados en líquido quístico fue significativamente superior al existente en sangre periférica ( $79,1 \pm 6,2\%$  versus  $6,8 \pm 2,1\%$ ;  $p < 0,001$ ). No observamos diferencias significativas en la proporción de linfocitos T (CD3+), T helper/inducer (CD4+) y T supresores/citotóxicos (CD8+). Sin embargo, sí encontramos un mayor porcentaje de células natural killer en líquido quístico que en sangre periférica ( $25,1 \pm 6,7\%$  versus  $11,3 \pm 7,9\%$ ;  $p < 0,001$ ).

Estos resultados sugieren que monocitos y células natural killer son las principales poblaciones leucocitarias implicadas en la regulación celular intraquística.

## REFERENCIAS

1. Weil C. Introducción. Principales categorías diagnósticas de la enfermedad benigna de la mama. Mastopatía fibroquística. En: Sandoz SA, ed. Patología benigna de la mama y trastornos relacionados. Barcelona: Sandoz, S. A., 1988; 1-17.
2. Martínez L, Esquivias J, Marcos C, Herruzo AJ. Mastopatía fibroquística: Concepto, histología y relación con el cáncer de mama. Rev Senología y Patol Mam 1994; 7 (2): 73-79.
3. Gompel A, Malet C et al. Hormonodépendance des cellules mammaires humaines normales. En: Scali P, Villet R, editores. Hormones et sein. París: Masson, 1990: 38-47.
4. Martínez L, Herruzo AJ. Bases endocrinas de la mastopatía fibroquística. Rev Senología Patol Mam 1993; 6 (6): 174-182.
5. Grossmam CJ. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. Science 1985; 227: 257-261.
6. Ness JC, Sedghinasab M, Moe RE, Tapper D. Identification of multiple proliferative growth factors in breast cyst fluid. Am J Sur 1993; 166: 237-243.
7. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG. A atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. J Natl Cancer Inst 1975; 55: 231-273.
8. Cuzick J, Wang DY, Bullbrook RD. The prevention of breast cancer. Lancet 1986; 1: 83-86.
9. Vorherr H. Fibrocystic breast disease: Pathophysiology, pathomorphology, clinical picture, and management. Am J Obstet Gynecol 1986; 154: 161-179.
10. Kelsey JL, Berkowitz GS. Breast cancer epidemiology. Cancer Res 1988; 48: 5615-5623.
11. Krieger N, Hiatt RA. Risk of breast cancer after benign breast diseases. Variation by histologic type, degree of atypia, age at biopsy, and length of follow-up. Am J Epidemiol 1992; 135: 619-631.
12. Devitt JE. Fibrocystic disease of the breast is not premalignant. Surg Gynecol Obstet 1972; 134: 803-806.
13. Winder EL, MacCornack FA, Stellman SD. The epidemiology of breast cancer in 785 United States Caucasian women. Cancer 1978; 41: 2341-2354.
14. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. N Engl J Med 1985; 312: 146-151.
15. Carter CI, Corle DK, Micozzi MS, Schatzkin A, Taylor PR. A prospective study of the development of breast cancer in 16.692 women with benign breast disease. Am J Epidemiol 1988; 128: 467-477.
16. Gorins A, Kottler ML. Qu'est-ce qu'une mastopathie a risque? Bases epidemiologiques et cliniques. Rev Fr Gynecol Obstet 1991; 86: 4-8.
17. Haagensen CD. Enfermedad quística macroscópica. En: Haagensen CD, editor. Enfermedades de la mama. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, S. A., 1987: 274-291.
18. Davies P, Bonney RJ et al. Secretion of arachidonic acid oxygenation products by mononuclear phagocytes: Their possible significance as modulators of lymphocyte function. En: Unanue EP, Rosenthal AS, editores. Macrophage regulation of immunity. New York: Academic Press, 1980: 347-359.
19. Sinclair J, McClain D, Taetle R. Effects of insulin and insulin-like growth factor I on growth of human leukemia cells in serum free and protein free medium. Blood 1988; 72: 66-72.
20. Paavonen T, Anderson LC, Aldercreutz H. Sex hormone regulation of *in vitro* immune response. J Exp Med 1981; 154: 1935-1965.
21. Gatti G, Orlandi F et al. Effect *in vitro* of breast cyst fluid on the spontaneous and lymphokine-inducible natural killer cell activity of patients with gross cystic disease of the breast. Ann N Y Acad Sci 1991; 20: 213-217.
22. Screpanti I, Santoni A et al. Estrogen and antiestrogen modulation of the levels of mouse natural killer activity and large granular lymphocytes. Cell Immunol 1987; 106: 191-202.
23. Pross HF, Sterns D, Mac Gillis R. Natural killer cell activity in women at high risk for breast cancer with and without benign breast syndrome. Int J Cancer 1984; 34: 303-308.