

Avaliação da molécula de *checkpoint* imunológico HLA-G em lesões melanocíticas

Evaluation of HLA-G immune checkpoint molecule in melanocytic lesions

Raylane P. Gomes; Gabriela Tayrine Caetano; Lucas Henrique F. Sampaio; Camila R. Silva; Maurício B. Costa; Maria Auxiliadora Cysneiro; Isabela Jubé Wastowski

Universidade Estadual de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

RESUMO

O antígeno leucocitário humano G (HLA-G) é uma molécula não clássica do complexo principal de histocompatibilidade que tem sido associada ao processo de tumorigênese e escape tumoral. Neste estudo, objetivamos avaliar a expressão de HLA-G em lesões melanocíticas e no melanoma para determinar quando as lesões melanocíticas iniciam sua expressão. Vinte e duas amostras de biópsias de pele foram submetidas à imuno-histoquímica; a expressão de HLA-G foi observada em 63,6% das amostras. Essa expressão nas células melanocíticas foi significativamente maior no melanoma do que em lesões melanocíticas benignas ($p < 0,002$). Nossos resultados sugerem que a expressão de HLA-G se inicia tardiamente no processo da tumorigênese.

Unitermos: melanoma; antígenos HLA-G; imuno-histoquímica.

ABSTRACT

The human leukocyte antigen-G (HLA-G) is a non-classical molecule of the major histocompatibility complex. HLA-G has been associated with the process of tumorigenesis and tumor escape. In this study, we aim to evaluate the HLA-G expression in melanocytic lesions and in melanoma for determining when melanocytic lesions start its expression. Twenty-two skin biopsies samples were submitted to immunohistochemistry; HLA-G expression was detected in 63.6% of the samples. This expression in melanocytic cells was significantly higher in melanoma than in benign melanocytic lesions ($p < 0.002$). Our results suggest that HLA-G expression starts late in the process of tumorigenesis.

Key words: melanoma; HLA-G antigens; immunohistochemistry.

RESUMEN

El antígeno leucocitario humano G (HLA-G) es una molécula no clásica del complejo principal de histocompatibilidad que ha sido asociada al proceso de tumorigénesis y escape tumoral. En este estudio, nuestro objetivo es evaluar la expresión de HLA-G en lesiones melanocíticas y en el melanoma para determinar cuando las lesiones melanocíticas comienzan su expresión. Veintidós muestras de biopsias de piel se estudiaron mediante inmunohistoquímica; se detectó la expresión de HLA-G en el 63,6% de las muestras. Esa expresión en las células melanocíticas fue significativamente mayor en el melanoma que en lesiones melanocíticas benignas ($p < 0,002$). Nuestros resultados sugieren que la expresión de HLA-G empieza tardíamente en el proceso de tumorigénesis.

Palabras clave: melanoma; antígenos HLA-G; inmunohistoquímica.

INTRODUÇÃO

O melanoma é um tumor agressivo, responsável pela maioria das mortes causadas por câncer de pele. Embora a excisão cirúrgica seja eficaz no tratamento do melanoma cutâneo primário, o melanoma metastático apresenta alta taxa de mortalidade. A quimioterapia padrão tem um efeito limitado nesses casos⁽¹⁾.

No entanto, nas últimas décadas, houve uma revolução no tratamento do melanoma. Isso aconteceu por meio de estudos sobre os mecanismos moleculares dessa doença e sobre a imunologia do câncer. Atualmente, duas novas classes de tratamentos sistêmicos estão disponíveis: imunoterapia e terapia direcionada⁽²⁻⁴⁾.

Os imunoterapêuticos têm como alvo os pontos de verificação das moléculas imunes. Porém, a resposta ao tratamento não é uniforme e é diretamente influenciada pelo microambiente do tumor. É fundamental conhecer o infiltrado de células imunocompetentes no tumor, bem como os fatores e as moléculas produzidos por elas⁽⁵⁾.

A maioria dos cânceres produz vários fatores imunossupressores que impedem a resposta imune. Entre os mecanismos de escape imune das células tumorais, podemos citar a expressão da molécula do antígeno leucocitário humano G (HLA-G). O HLA-G se distingue de outras moléculas de classe I do HLA, principalmente porque possui um polimorfismo genético limitado; sofre recombinação alternativa sistemática do transcrito primário; apresenta expressão de proteína tecidual restrita à placenta (citotrofoblasto invasivo e células epiteliais amnióticas) e a certos tecidos adultos (timo, pâncreas, matriz proximal das unhas e córnea) e eritroblastos; e apresenta funções de tolerância imunológica⁽⁶⁾.

Notavelmente, a expressão da molécula HLA-G pode ser observada ectopicamente em condições patológicas. A expressão do HLA-G nos tumores protege as células cancerígenas das células natural killer (NK) e dos linfócitos T citotóxicos. Assim, a expressão do HLA-G se torna um mecanismo importante no qual as células cancerígenas são utilizadas para escapar da vigilância imunológica do hospedeiro. Hoje em dia, é amplamente aceito que o HLA-G é um marcador crítico de imunotolerância na evasão imunológica de células cancerígenas e está fortemente associado ao progresso e ao prognóstico da doença em pacientes com câncer⁽⁷⁾. O HLA-G é considerado um ponto de verificação imune e sua heterogeneidade nos cânceres tem sido relacionada com o estágio e os efeitos da doença, o *status* metastático e a resposta a diferentes terapias⁽⁸⁾.

Nesse contexto, nosso objetivo foi avaliar a expressão da molécula HLA-G em lesões melanocíticas e no melanoma para

determinar quando a evolução do nevo melanocítico inicia sua expressão.

METODOLOGIA

Amostras

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional com Seres Humanos (protocolo 419.570). Os prontuários médicos foram revisados para determinar idade e sexo. Esses estudos foram realizados no Sistema de Saúde Preventivo, Goiânia, Goiás, Brasil.

As amostras foram obtidas após ressecção cirúrgica. Para este estudo, 22 lesões melanocíticas de diferentes subtipos histológicos (melanoma acral, melanoma expansivo superficial, melanoma lentigo maligno, melanoma nodular e nevo melanocítico) de 16 pacientes foram avaliadas.

Imuno-histoquímica

Seções de amostras embebidas em parafina foram coradas com anticorpo monoclonal MEM-G/02 (1/100) que reconhece a cadeia pesada livre de todas as isoformas da HLA-G (Exbio, Praha, República Tcheca). O citotrofoblasto invasivo da placenta humana do terceiro trimestre serviu como um controle positivo da proteína HLA-G. O produto da reação foi visualizado utilizando o Sistema de Detecção Universal Ultratech HRP Streptavidin-Biotin (Immunotech-Coulter, Villepinte, França) de acordo com as recomendações do fabricante. Dez biópsias de pele de mulheres saudáveis que foram submetidas à cirurgia de redução de mama foram utilizadas como controles normais.

Avaliação de cortes corados

A imunorreatividade foi classificada pela avaliação da porcentagem de células positivas, utilizando um método de pontuação semiquantitativo. O sistema de pontuação foi realizado conforme descrito anteriormente por Gonçalves *et al.* (2015)⁽⁹⁾. Dois patologistas independentes (E. L. Z. e B. W. K.) interpretaram os resultados da coloração do HLA-G.

Análise estatística

Os escores de imunocoloração foram comparados com o teste *U* de Mann-Whitney. A significância foi definida como $p < 0,05$ em um intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* RStudio front-end 0.98.507.

RESULTADOS

A coloração imuno-histoquímica revelou que as células HLA-G+ apresentaram um padrão de coloração citoplasmática marrom. Essa coloração também foi observada nas células imunoinflamatórias. Das 22 amostras submetidas à imuno-histoquímica, 14 expressaram a HLA-G, enquanto nenhuma amostra do controle expressou a molécula. A expressão nas lesões melanocíticas e no melanoma é apresentada em detalhes na **Tabela**. A expressão do antígeno HLA-G nas células melanocíticas foi significativamente maior no melanoma do que nos nevos ($p < 0,002$). As amostras femininas apresentaram maior intensidade de coloração do que as masculinas ($p < 0,001$).

TABELA – Expressão do HLA-G em lesões melanocíticas e de melanoma

Imuno-histoquímica	HLA-G positivo n (%)	HLA-G negativo n (%)	Total n (%)
Pacientes	11 (68,75)	5 (31,25)	16 (100)
Feminino	5 (71,43)	2 (28,57)	7 (43,75)
Masculino	6 (66,67)	3 (33,33)	9 (56,25)
Lesões	14 (63,64)	8 (36,36)	22 (100)
Melanoma acral	1 (100)	0	1 (4,54)
Melanoma expansivo superficial	4 (80)	1 (20)	5 (100)
Melanoma lentigo maligno	2 (50)	2 (50)	4 (100)
Melanoma nodular	2 (100)	0	2 (100)
Nevo melanocítico	5 (50)	5 (50)	10 (100)

HLA-G: antígeno leucocitário humano G.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliadas lesões que caracterizam a evolução das alterações das lesões melanocíticas durante o

REFERÊNCIAS

- Fink C, Haenssle HA. Non-invasive tools for the diagnosis of cutaneous melanoma. *Skin Res Technol*. 2017 Aug; 23(3): 261-71. PubMed PMID: 27878858.
- Longvert C, Saiag P. Melanoma update. *Rev Med Interne*. 2019 Mar; 40(3): 178-83. PubMed PMID: 30527396.
- Amaral T, Tampouri I, Eigentler T, et al. Immunotherapy plus surgery/radiosurgery is associated with favorable survival in patients with melanoma brain metastasis. *Immunotherapy*. 2019 Jan 4; 11(4): 297-309. PubMed PMID: 30606066.
- Indini A, Tondini CA, Mandalá M. Cobimetinib in malignant melanoma: how to MEK an impact on long-term survival. *Future Oncol*. 2019 Jan 14; 15(9): 967-77. PubMed PMID: 30638071.
- Blando J, Sharma A, Higa MG, et al. Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer highlights VISTA as a potential

desenvolvimento do melanoma. Observamos a expressão do HLA-G em taxas mais diferenciadas de lesões melanocíticas, o que corrobora estudos anteriores que demonstram a expressão do HLA-G no melanoma.

A positividade para o HLA-G em lesões benignas sugere vigilância sobre os nevos melanocíticos. Cerca de 30% dos melanomas são derivados de lesões melanocíticas benignas. Em um estudo retrospectivo envolvendo 850 pacientes cutâneos, Lin *et al.* (2015)⁽¹⁰⁾ demonstraram que 235 pacientes apresentavam melanoma associado a um nevo melanocítico.

Os tipos histológicos de melanoma expansivo superficial e melanoma acral lentiginoso expressaram HLA-G, sugerindo que a elevação dessa molécula associa-se à transformação maligna nesse tipo de célula, uma vez que o HLA-G é frequentemente expresso em células tumorais e sua expressão relaciona-se com o prognóstico desfavorável em várias neoplasias⁽¹¹⁾.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a expressão do HLA-G começa em um estágio posterior do processo de tumorigênese. O HLA-G permite prever o potencial de malignidade e fornece novas ideias sobre como melhorar o direcionamento das imunoterapias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás.

- target in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019 Jan 29; 116(5): 1692-7. PubMed PMID: 30635425.
- Boegel S, Löwer M, Bukur T, Sorn P, Castle JC, Sahin U. HLA and proteasome expression body map. *BMC Med Genomics*. 2018 Dec 1; 11(36): 1-12. PubMed PMID: 29587858.
- Zhang Y, Yu S, Han Y, Wang Y, Sun Y. Human leukocyte antigen-G expression and polymorphisms promote cancer development and guide cancer diagnosis/treatment. *Oncol Lett*. 2018 Jan 1; 15(1): 699-709. PubMed PMID: 29399142.
- Lin A, Yan WH. Heterogeneity of HLA-G expression in cancers: facing the challenges. *Front Immunol*. 2018 Sep; 9(2164): 1-12. PubMed PMID: 30319626.
- Gonçalves AS, Oliveira JP, Oliveira CF, Silva TA, Mendonça EF, Wastowski IJ, Batista AC. Relevance of HLA-G, HLA-E and IL-10 expression in lip carcinogenesis. *Hum Immunol*. 2016 Sep 1; 77(9): 785-90. PubMed PMID: 26723902.

10. Lin WM, Luo S, Muzikansky A, et al. Outcome of patients with de novo versus nevus-associated melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2015 Jan 1; 72(1): 54-8. PubMed PMID: 25440436.

11. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Tronik-Le Roux D, Moreau P, LeMaout J. HLA-G: an immune checkpoint molecule. *Adv Immunol.* 2015 Jan 1; 127: 33-144. PubMed PMID: 26073983.

AUTOR CORRESPONDENTE

Isabela Jubé Wastowski  0000-0001-5441-4186
e-mail: wastowski@yahoo.com.br



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.