

## **EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA) NÃO CLÁSSICOS, HLA-G E HLA-E NA CARCINOGENESE E PROGRESSÃO METASTÁTICA DO CÂNCER DE MAMA.**

Camila Araki<sup>1</sup>, Gisela Bevilacqua Rolfsen<sup>1</sup>, Eduardo Antonio Donadi<sup>2</sup>, Christiane Pienna Soares<sup>1</sup>,  
Imunologia, <sup>1</sup> Farmácia Bioquímica – Departamento de Análises Clínicas (Citologia Clínica e Biologia Celular) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) – Campus Araraquara  
- <sup>2</sup> Divisão de Imunológica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP)

**Introdução:** O câncer de mama é a neoplasia mais comum e a segunda causa de morte entre as mulheres em todo o mundo. Apesar de cirurgias citoredutivas, radioterapia e quimioterapia promoverem um aumento na sobrevivência das pacientes com câncer de mama algumas células tumorais podem provocar uma recorrência metastática e levar a morte das pacientes. A ineficiente resposta imunológica do hospedeiro ao tumor, possibilita a progressão tumoral. O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) representa o conjunto de genes responsável por codificar as moléculas de histocompatibilidade em determinada espécie, sendo chamado, no ser humano, de sistema HLA (*human leukocyte antigen*), localizando-se no braço curto do cromossomo 6. O HLA é constituído por moléculas definidas como clássicas (HLA-A, B, C, DR, DP e DQ) e moléculas não clássicas, HLA-E, F e G (DONADI, 2001). A maior ou menor afinidade de alguns antígenos tumorais com moléculas específicas do complexo HLA, em parte explica a maior ou menor susceptibilidade de pacientes que compartilham as mesmas alterações genéticas ou os mesmos alelos HLA para o desenvolvimento de determinada neoplasia. As moléculas HLA clássicas, HLA-G e HLA-E exercem papel importante na proteção do feto durante o período de gestação e estudos recentes demonstram que essas moléculas possuem aberrante expressão em tumores (HODGKINSON, MILLWARD *et al.*, 2000). A maior expressão de moléculas HLA-G e HLA-E permitiram a evasão das células tumorais a resposta imune celular. O HLA-G localiza-se nos tecidos placentários (trofoblastos, macrófagos placentários e células endoteliais) nos quais não há expressão de moléculas clássicas do HLA de classe I e II. Contudo, transcritos de HLA-G foram encontrados em baixos níveis nos olhos, timo, pulmão, coração e rins de fetos e nas células mononucleares do cordão umbilical. Já o HLA-E é expresso em mais tecidos do que o HLA-G, sendo também expresso em tecidos placentários, contudo, a expressão em tecidos fetais ocorre principalmente em estágios tardios da gestação, estando diretamente relacionada à proteção fetal. Assim como o HLA-G, o HLA-E está envolvido na regulação de células NK, interagindo com o receptor inibitório CD94/NKG2A (CABELLO RIVERO *et al.*, 2003). Entretanto, o antígeno HLA pode ser perdido em alguma etapa necessária para sua síntese, transporte ou expressão na superfície da célula. Diferentes mecanismos podem contribuir para a perda parcial ou total da expressão de HLA. Entre os diferentes mecanismos pelos quais o câncer pode escapar do sistema imune, as alterações na expressão dos antígenos leucocitários humano (HLA - *human leukocyte antigen*) tem papel crucial, impedindo moléculas HLA de interagirem com receptores específicos de células T e *natural killer* (NK). Em carcinomas primários de mama, estudos recentes têm descrito a menor expressões gênicas, sugerindo que esta baixa expressão esteja associada a um mecanismo

de escape de células T citotóxicas e ocasionando a disseminação do tumor e metástase (KASS et, al, 2003). **Objetivo:** Assim o presente estudo teve por objetivo avaliar a expressão das moléculas HLA não clássicas, HLA-G e HLA-E em tumor de mama invasivo, levando-se em consideração o grau de diferenciação da lesão e a presença de metástase em linfonodo axilar.

**Materiais e Métodos:** Cortes histológicos de carcinoma ductal invasivo de mama (CADI) de 52 pacientes e em 16 linfonodos axilares positivos para a presença de metástase, foram submetidos a reação de imunoperoxidase para a expressão tecidual de HLA-G e HLA-E. As reações foram acompanhadas de um controle positivo (trofoblasto humano) e um controle negativo (omitindo a incubação com o anticorpo primário). A expressão imunohistoquímica do antígeno HLA-G e HLA-E foi observada pela coloração castanha específica ao redor da membrana citoplasmática. A expressão das moléculas HLA-G e HLA-E foi quantificada por análise de imagem, utilizando um equipamento (Image Pro Plus, MD, USA) composto de um microscópio acoplado a uma câmera colorida e a um computador. Para a quantificação dessa expressão 4 a 8 diferentes campos do corte histológico dos tumores de mama foram analisados e os valores expressos pela porcentagem (%) de células marcadas na área percorrida durante a quantificação. A positividade observada tanto no tumor quanto nos linfonodos com metástase foi classificada segundo proposto por PISTILLO et al, 2000: negativo (quando < 25% das células apresentaram marcação específica); heterogêneo (quando a imunocoloração estava presente entre 25 a 75% das células) e positivo (> 75% de células com marcação específica).

**Resultados:** A expressão quantitativa das moléculas HLA-G e HLA-E foi comparada com os parâmetros anatomoclínicos, tamanho tumoral, grau histológico, grau nuclear e presença e ausência de metástase. Na análise comparativa entre a expressão das moléculas HLA-G e HLA-E, 33(59.6%) de 52 biópsias de CDI de mama apresentaram desregulação da expressão de HLA-G, enquanto para HLA-E apenas 14(26.9 %) biópsias apresentaram essa desregulação. Foi observada expressão negativa para HLA-G e HLA-E, respectivamente, em 21(38.9%) e 39(72.2%) de 52 biópsias de CDI de mama. Além disso, o carcinoma ductal invasivo apresentava-se moderadamente diferenciado em 12(50%) lesões com desregulação de HLA-G e 7(63.6%) de HLA-E. Nos tumores pobremente diferenciados 12 (50.0%) apresentaram desregulação de HLA-G e 5(45.5%) de HLA-E. Os resultados da expressão imunohistoquímica quantitativa de moléculas HLA-G e HLA-E, demonstra a associação inversa entre a menor expressão de HLA-I e maior expressão de HLA-G ( $p<0.001$ ), bem como, HLA-G e HLA-E ( $p<0.01$ ), nas 52 pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo. Não foi observada associação entre a expressão quantitativa entre HLA-I e HLA-E ( $p>0.05$ ). Em relação à metástase em linfonodos axilares a expressão do HLA-G apresentou classificada como desregulação, respectivamente alta e baixa, em 20 (38,4%) pacientes sem metástase em linfonodo axilar. Em contrapartida, 15(28.8%) dos pacientes sem metástase apresentaram ausência de desregulação. Nas pacientes que apresentaram metástase em linfonodo axilar, 9(17.3%) também apresentaram desregulação da expressão de HLA-G maior e em 8(15.4%) ausência de desregulação. Portanto, não foi observada associação estatisticamente significativa entre a desregulação de HLA-G e a metástase em linfonodo axilar (Qui Quadrado,  $P=0.9512$ ). Em relação à expressão de HLA-

E relacionado à metástase linfonodal, foi observada desregulação, respectivamente alta e baixa, em 8(15,4%) pacientes sem metástase, enquanto 27(51.9%) apresentaram ausência de desregulação. Por outro lado, nas pacientes com metástase axilar, 5(9.6%) apresentaram desregulação de HLA-E e 12(23%) com ausência de desregulação. Da mesma forma não foi verificada associação (Qui Quadrado,  $P=0.3963$ ) entre a desregulação da expressão de HLA-E e metástase em linfonodo axilar de pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo de mama. Em relação a expressão das moléculas HLA-G e HLA-E e o tamanho tumoral foi possível observar desregulação da expressão de HLA-G em 13(25.0%) de lesões < 2cm e 16(30.7%) em lesões > 2cm. Em contrapartida, ausência de desregulação foi observada em 9(17.3%) pacientes cuja lesão foi < 2cm e 14(26.9%) com lesão > 2cm. Em relação à expressão de HLA-E, a desregulação foi observada em 5(9.6%) das lesões < 2cm e 8(15.4%) das lesões > 2cm. A ausência de desregulação de HLA-E foi observada em 17 (32.7%) das lesões < 2cm e 22(42.3%) nas lesões > 2cm. Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre a desregulação de HLA-G (Qui Quadrado,  $P=0.5801$ ) e HLA-E (Qui Quadrado,  $P=0.1826$ ) e o tamanho tumoral. Em relação ao grau histológico houve desregulação da expressão de HLA-G e a maior desorganização histológica (GH2+GH3) foi observada em 29(55.7%) e o enquanto a desregulação da expressão de HLA-E e a menor diferenciação histológica (GH2+GH3) foi observada em 13(25.0%) das pacientes portadoras de CADI. Em contrapartida, ausência de desregulação de HLA-G e HLA-E foi observada nas lesões menos diferenciadas em respectivamente, 21(40.4%) e 37(71.2%) das pacientes avaliadas. Não foi observada diferença significativa entre a menor diferenciação histológica do CADI e a desregulação da expressão de HLA-G (Qui Quadrado,  $P=0.2695$ ) e HLA-E (Qui Quadrado,  $P=0.7070$ ). Quando comparado com o grau nuclear, a desregulação da expressão de HLA-G e HLA-E foi observada nas lesões com maior atipia nuclear (GN2+GN3) em, respectivamente, 28(53,8%) e 11(21%) das pacientes avaliadas no presente estudo. Por outro lado, a ausência de desregulação de HLA-G e HLA-E foram a respectivamente, 20(38.5%) e 37(71.2%) dos CADI analisados. Da mesma forma, nenhuma diferença foi encontrada entre a menor diferenciação celular e a desregulação das moléculas HLA-G (Qui Quadrado,  $P=0.4086$ ) e HLA-E (Qui Quadrado,  $P=0.0661$ ). Nas figuras 1 a 2 estão demonstradas as marcações imunohistoquímicas de HLA-G e HLA-E. A desregulação de HLA-G, alta (Figura 1A) e baixa (Figura 1B), apresentaram positividade, respectivamente intensa e fraca, na membrana citoplasmática das células tumorais. Na ausência de desregulação (Figura 1C) foi observada ausência de marcação (coloração azul). Em relação a desregulação de HLA-E, o mesmo padrão de imunocoloração foi observado, no qual a alta desregulação (Figura 2A) e a baixa desregulação (Figura 2B) apresentaram, respectivamente, coloração intensa e fraca. Na ausência de desregulação (Figura 2C) foi observada ausência de marcação (coloração azul).

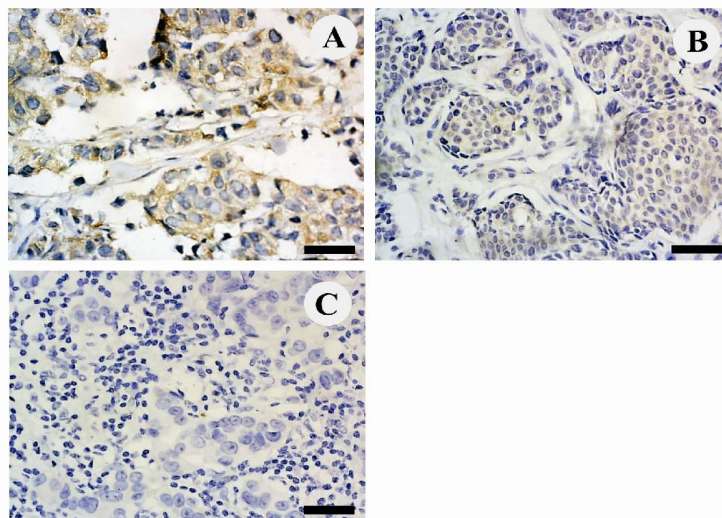


Figura 1 -

Reação de

imunoperoxidase de HLA-G em carcinoma ductal invasivo de mama.. A) Carcinoma ductal invasivo classificado com alta desregulação para a expressão de HLA-G e apresentando intensa imunomarcacão em > 75% das áreas tumorais. B) Carcinoma ductal invasivo classificado como baixa desregulação, apresentando coloração castanha menos intensa em 25 a 75% das áreas tumorais. C) Carcinoma ductal invasivo classificado como ausência de desregulação e apresentando ausência de imunomarcacão (coloração azul) em 0 a 25% das áreas tumorais. Aumento de 400x.

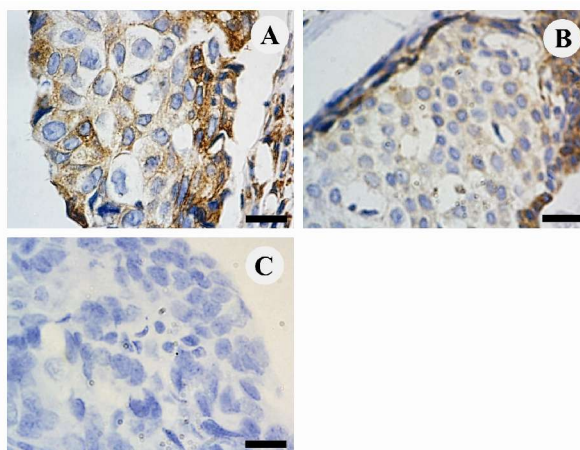


Figura 2 - Reação de imunoperoxidase de HLA-E em carcinoma ductal invasivo de mama. A) Carcinoma ductal invasivo classificado como alta desregulação de HLA-E e apresentando intensa imunomarcacão em > 75% das áreas tumorais. B) Carcinoma ductal invasivo classificado como baixa desregulação e apresentando coloração castanha menos intensa em 25 a 75% das áreas tumorais. C) Carcinoma ductal invasivo classificado como ausência de desregulação e apresentando ausência de imunomarcacão (coloração azul) em 0 a 25% das áreas tumorais. Aumento de 400x.

**Conclusões:** A partir dos resultados foi possível verificar o aumento de expressão imunohistoquímica de HLA-G nas pacientes que apresentaram diagnóstico de carcinoma

ductal invasivo (CADI). Além disso, foi possível observar associação inversa na expressão quantitativa das moléculas HLA, onde HLA-E apresentou menor expressão, enquanto HLA-G uma maior expressão, possivelmente indicando que essas moléculas tenham ação sinérgica na evasão tumoral a resposta imunológica. Entretanto, quando comparado aos parâmetros anatomopatológicos (tamanho do tumor, grau histológico, graus nuclear e metástase em linfonodo axilar), não foi observada associação estatisticamente significativa, sugerindo que o aumento da expressão de HLA-G não está associada a agressividade e potencial metastático do CADI.

### **Referências bibliográficas:**

CABELLO, A., A. RIVERO, *et al.* HAART induces the expression of HLA-G on peripheral monocytes in HIV-1 infected individuals. **Hum Immunol**, v.64, n.11, Nov, p.1045-9. 2003.

DONADI, E. A. Aspectos moleculares do complexo principal de Histocompatibilidade: com entender a associação entre o sistema HLA e as doenças reumáticas. **Rev Bras Reumat**, v.41, n. 2, p.225-236. 2001.

HODGKINSON, A. D., B. A. MILLWARD, *et al.* The HLA-E locus is associated with age at onset and susceptibility to type 1 diabetes mellitus. **Hum Immunol**, v.61, n.3, Mar, p.290-5. 2000.

KASS, R., AGHA, J., BELLONE, S., PALMIERI, M., CANÈ, S., BIGNOTTI, E., TILMAN, R.H., HUTCHINS, L., CANNON, M.J., KLIMBERG, S., SANTIN, A.D. In vitro induction of tumor-specific HLA classI-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes from patients with locally advanced breast cancer by tumor antigen-pulsed autologous dendritic cells. **J.Surg.Res.**v.112: p.189-197, 2003

PISTILLO, M. P.; NICOLÒ, G.; SALVI, S.; CAPANNI, P; PERDELLI, L; PASCIUCCO, G.; FERRARA, G.B. Biochemical Analysis of HLA Class I Subunits Expression in Breast Cancer Tissues. **Human Immunol.**, v.61, p.397-407, 2000.

Bolsa: CNPq