

# EXPRESIÓN DE HLA-G EN EL CARCINOMA TRANSICIONAL DE VEJIGA

---

*Moavro, Damián Ezequiel<sup>1</sup>*

## **Introducción**

El cáncer de vejiga es una de las neoplasias urológicas más frecuentes, representando la quinta causa de muerte en orden de frecuencia en los países occidentales, después de las neoplasias de pulmón, próstata, mama, colon y recto (Kumar, Abbas y Aster, 2015). En Argentina afectan a casi el 3% de la población, predominantemente en el sexo masculino (Instituto Nacional del Cáncer, 2020). Cerca del 95% de los tumores de este órgano tienen un origen epitelial, siendo el más frecuente el denominado carcinoma urotelial o transicional (CT) (aproximadamente el 80% de los casos), seguido del adenocarcinoma y, en tercer lugar, el carcinoma epidermoide (Kumar, Abbas y Aster, 2015). Aunque el tamaño del tumor (T, según el Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC) y la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC)) no es el único determinante de pronós-

---

<sup>1</sup> Médico, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Especialista Jerarquizado en Anatomía Patológica, Colegio de Médicos de la Provincia de Buenos Aires. Profesor de Citología, Histología y Embriología en la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP). Médico de Planta y Coordinador Docente de la Residencia de Anatomía Patológica, Hospital Interzonal General de Agudos “General San Martín”, La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

tico y tratamiento, actualmente, aquellas lesiones que no invaden la capa muscular de la vejiga, clasificados como T1, reciben tratamientos más conservadores mediante resección tumoral únicamente, con quimioterapia posterior o inmunoterapia intravesical con BCG (*bacillus Calmette-Guérin*). La invasión del músculo detrusor se clasifica como estadio T2 e implica, en la mayoría de los casos, una cistectomía radical (Consenso Nacional Inter-Sociedades para el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Vejiga, 2013).

Un punto de control inmunitario (CI) recientemente descrito es la molécula no clásica de clase I del antígeno leucocitario humano G (HLA-G) (Carosella *et al.*, 2015). En un comienzo se identificó su implicancia en la tolerancia feto-materna y en el trasplante de tejidos (Rouas-Freiss *et al.*, 1997). Actualmente, la expresión del CI HLA-G se ha observado en la mayoría de los diferentes tumores analizados. Por ejemplo, se ha notificado una alta incidencia de expresión de HLA-G en el carcinoma renal de células claras (RCC) (Bukur *et al.*, 2003; Rouas-Freiss *et al.*, 2017; Tronik-Le Roux *et al.*, 2017). El papel del HLA-G como un CI, permitiría que el tumor escape al control del sistema inmunitario del huésped, lo que se ha demostrado en modelos murinos (Loumagne *et al.*, 2014). Además, el HLA-G tiene un efecto inhibitor más amplio que cualquier otro CI, ya que puede bloquear todos los pasos de las respuestas antitumorales al actuar sobre las células asesinas naturales (NK), los linfocitos B, los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos a través de la interacción directa con sus principales receptores ILT2 e ILT4 (Carosella *et al.*, 2015). Asimismo, se evidenció la transcripción del receptor ILT4 en células RCC (Rouas-Freiss *et al.*, 2017) y en cáncer de pulmón de células no pequeñas. En ambos casos, se demostró que el HLA-G promueve la progresión tumoral y la metástasis al aumentar los niveles del Factor de crecimiento endotelial vascular-C (VEGF-C) (Zhang *et al.*, 2015), el mejor caracterizado y el más eficientemente implicado en la linfangiogénesis y la metástasis linfática (Zheng, 2014; Raica, Jitariu y Cimpean, 2016; Cueni y Detmar, 2008). Se observaron resultados si-

milares cuando se analizaron las líneas celulares de RCC primarias, que también mostraron que la expresión del HLA-G se correlaciona con una mayor expresión de VEGF-C (García *et al.*, 2020). En cuanto al CT, Desgrandchamps *et al.* han demostrado una fuerte asociación entre la proporción de linfocitos T CD8+ILT2+ circulantes y el riesgo de recurrencia del carcinoma que no invade el músculo detrusor (Desgrandchamps *et al.*, 2018).

## **Objetivos**

Con el objetivo de determinar la importancia de la expresión de este importante CI, nos propusimos explorar, por primera vez en Argentina, la expresión de HLA-G en la progresión del CT vesical, relacionando su grado de malignidad con la sobrevida del paciente.

## **Objetivo General**

Explorar la expresión de HLA-G en el Carcinoma Transicional de vejiga en pacientes de un hospital público de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

## **Objetivos Específicos**

- Recibir la aprobación del trabajo de investigación por un comité de bioética e investigación.
- Obtener muestras de carcinomas de vejiga, de un Hospital Público.
- Establecer el diagnóstico de CT en cada uno de los casos obtenidos.
- Determinar el grado histológico y el estadio tumoral en cada una de las muestras.
- Inmunomarcarse HLA-G en la totalidad de las muestras.
- Agrupar las muestras de CT según la expresión de HLA-G observada en la inmunomarcación.

- Correlacionar el estadio tumoral y los grados histológicos con la inmunomarcación obtenida.

## **Hipótesis**

La expresión de HLA-G en el Carcinoma Transicional está relacionada con el grado histológico y el estadio tumoral, por lo que la expresión de este marcador podría ser utilizada como indicador pronóstico de severidad clínica.

## **Materiales y Métodos**

### *Pacientes*

Se estudiaron 30 muestras de CT de vejiga obtenidas de resecciones transuretrales o cistectomías, correspondientes a pacientes atendidos en un hospital público de la ciudad de La Plata. El rango de edad de los pacientes fue de 49 a 71 años (media 58), en su mayoría hombres (21 casos). Además, se accedió a la historia clínica de cada paciente para determinar la presencia de factores de riesgo conocidos y la supervivencia de cada uno.

El protocolo de actuación para el manejo de las muestras, junto con el proyecto de investigación, fue aprobado por el Comité de Bioética y Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP (COBIMED).

### *Procesamiento de muestras y diagnóstico*

Las muestras se fijaron en formol al 10 % y se procesaron de forma rutinaria para el análisis histológico. De cada caso se realizaron dos cortes histológicos: uno para efectuar la caracterización histológica del CT y otro para realizar las técnicas de inmunohistoquímicas. El primer corte obtenido de cada una de las muestras se tiñó con hematoxilina-eosina y se realizó el diagnóstico neoplásico para cada una de ellas según la Clasificación de Tumores de la Organización Mundial de la Salud 2016 (Eble *et al.*, 2016). Finalmente, se estableció el nivel

de invasión tumoral en cada muestra según la estadificación AJCC/ UICC 2018 (TNM Classification of Malignant Tumours, 2018).

### ***Inmunohistoquímica***

Las secciones de cada una de las muestras utilizadas se incubaron con el anticuerpo monoclonal específico de ratón, HLA-G Antibody (4H84) de Santa Cruz Biotechnology, a una dilución de 1:50 (Incubación 4°C durante la noche). A continuación, se utilizó el sistema Envision de Dako como sistema de detección y la 3'3'-diaminobencidina (DAB) de Sigma para la detección. Finalmente, se realizó una ligera tinción de contraste con Hematoxilina.

## **Resultados**

### ***Diagnóstico y estadificación de los casos***

De los 30 casos analizados, 23 muestras (77%) corresponden a CT de alto grado (Figura 1), de las cuales 19 (83%) comprometen la capa muscular propia de la vejiga (pT2, según el estadio patológico). Siete de las muestras (el 23% restante del total) presentaron CT de bajo grado. En solo uno de estos últimos casos, el músculo detrusor de la vejiga estaba comprometido. En la tabla 1 se muestra la caracterización de cada uno de los casos estudiados.

En cuanto a la presencia de factores de riesgo, de las historias clínicas consultadas, solo 11 casos (37%) tenían antecedentes de tabaquismo: 9 de estos correspondían a CT de alto grado y 2 a CT de bajo grado (Figura 2). No se encontraron exposiciones ambientales o infecciones.

### ***Inmunomarcación y sobrevida***

En función del nivel de intensidad de la inmunomarcación obtenida para la expresión de HLA-G en células tumorales, todos los casos analizados se clasificaron en: leve, moderado e intenso.

Tabla 1. Caracterización de los casos.

Caso	Sexo	Edad	Carcinoma Uterofalal	Nivel de Invasión	HLA-G	Supervivida
1	M	55	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
2	M	60	Alto grado	Muscular	++	> 5 años
3	M	63	Alto grado	Muscular	+++	> 5 años
4	M	67	Alto grado	Muscular	+++	< 5 años
5	F	56	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
6	M	70	Alto grado	Muscular	+++	< 5 años
7	M	45	Bajo grado	Lamina Propia	+	> 5 años
8	F	66	Alto grado	Lamina Propia	+	> 5 años
9	F	90	Alto grado	Muscular	++	> 5 años
10	F	32	Alto grado	Lamina Propia	+	> 5 años
11	M	65	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
12	M	66	Bajo grado	Lamina Propia	++	> 5 años
13	M	69	Alto grado	Muscular	++	< 5 años
14	M	56	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
15	M	54	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
16	M	51	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
17	M	49	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
18	M	57	Alto grado	Muscular	++	> 5 años
19	M	59	Alto grado	Muscular	++	> 5 años
20	F	39	Alto grado	Muscular	+++	< 5 años
21	M	51	Alto grado	Muscular	+++	> 5 años
22	M	49	Alto grado	Muscular	+	> 5 años
23	F	58	Alto grado	Lamina Propia	-	> 5 años
24	F	55	Bajo grado	Lamina Propia	-	> 5 años
25	F	62	Bajo grado	Lamina Propia	+	> 5 años
26	M	68	Bajo grado	Lamina Propia	-	> 5 años
27	M	71	Bajo grado	Lamina Propia	-	> 5 años
28	F	55	Bajo grado	Muscular	+	> 5 años
29	M	50	Alto grado	Lamina Propia	+	> 5 años
30	M	49	Alto grado	Muscular	-	> 5 años

Referencias: Masculino, M; Femenino, F; expresión de HLA-G: negativa ; leve +; moderada ++; intensa +++.

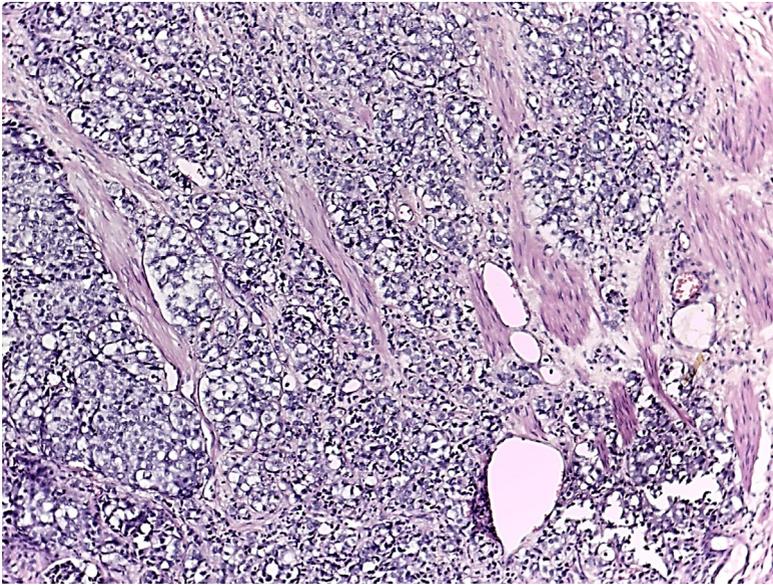


Figura 1. Carcinoma de células transicionales de alto grado con invasión de músculo detrusor. H-E, 10 X.

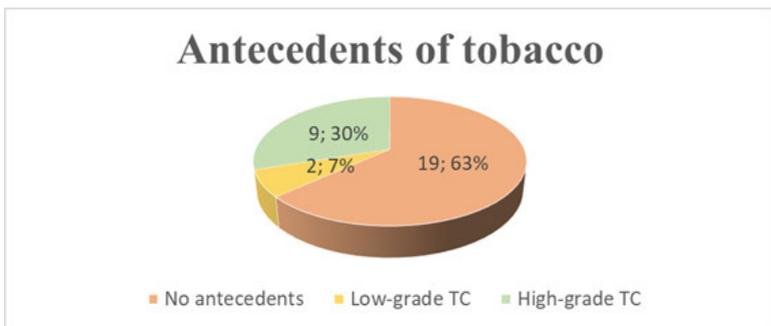
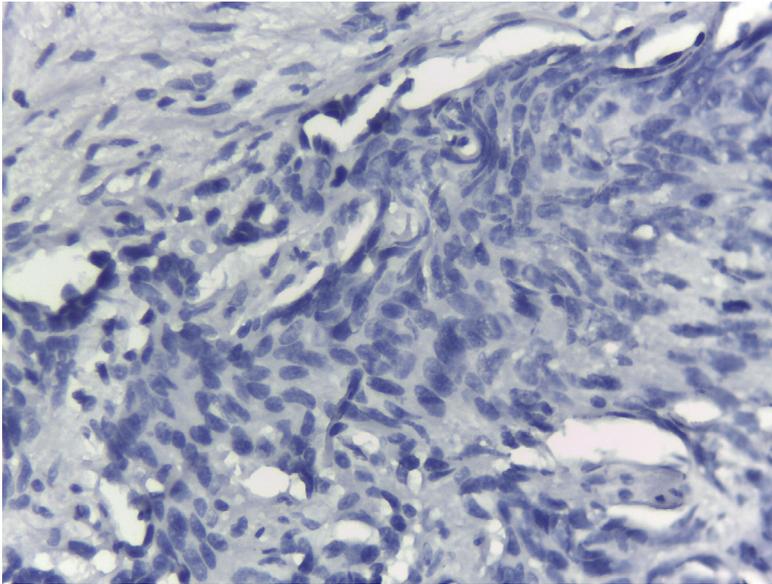
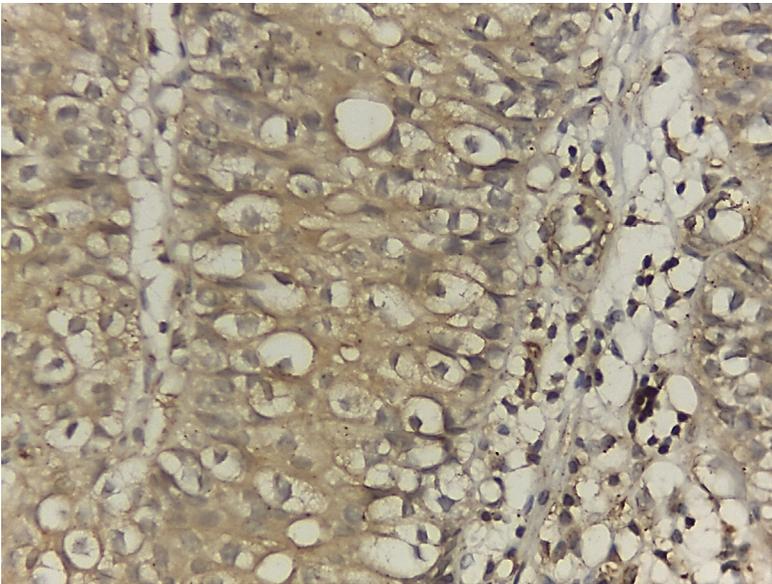


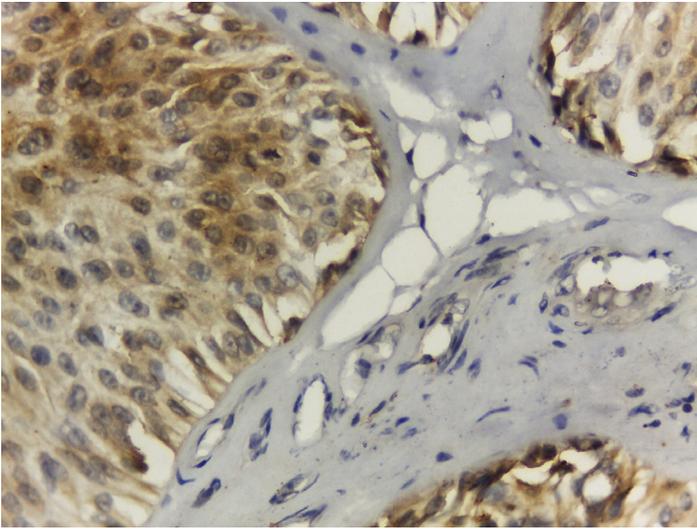
Figura 2. Proporción de pacientes con historial de cigarrillo.



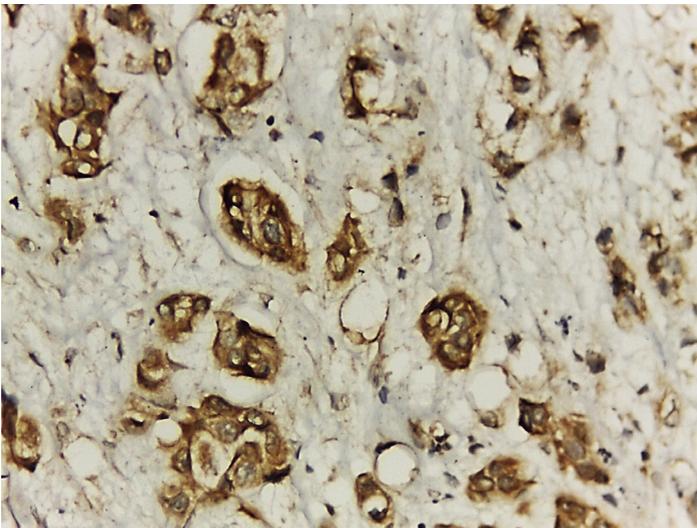
*Figura 3. Carcinoma de células transicionales de alto grado. Inmunomarcación negativa para HLA-G. 40X.*



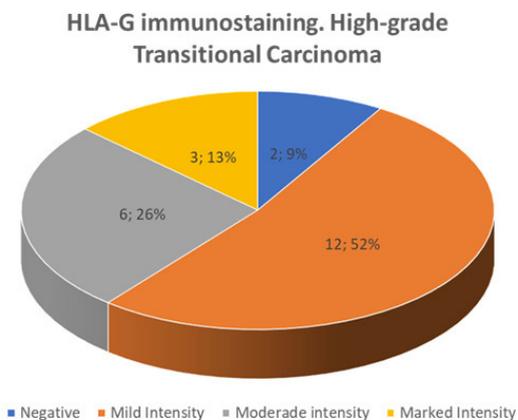
*Figura 4. Carcinoma de células transicionales de alto grado. Inmunomarcación leve para HLA-G. 40X.*



*Figura 5. Carcinoma de células transicionales de alto grado. Inmunomarcación moderada para HLA-G. 40X.*



*Figura 6. Carcinoma de células transicionales de alto grado. Inmunomarcación intensa para HLA-G. 40X.*



*Figura 7. Proporción de muestras con inmunomarcación para HLA-G en Carcinoma de células transicionales de alto grado.*

Del total de casos (23) de CT de alto grado, 21 muestras (91%) presentaron inmunomarcación para la expresión de HLA-G: 12 con intensidad leve, 6 con intensidad moderada y 3 con intensidad marcada, como se muestra en la Figura 7. Cuatro pacientes de este grupo (CT de alto grado) no habían superado los 5 años de supervivencia, de los cuales tres mostraron intensa positividad en la expresión de HLA-G. La intensidad fue moderada en el cuarto caso.

Las muestras con CT de bajo grado (7 casos) han mostrado inmunomarcación nula o leve para la expresión de HLA-G (Figura 8) y solo en uno de estos casos, el músculo detrusor estaba comprometido. Todos estos pacientes tuvieron una supervivencia superior a 5 años.

## **Conclusión**

En Argentina, el cáncer de vejiga corresponde a casi el 3% de las neoplasias que afectan a la población, siendo la más frecuente el denominado carcinoma transicional (CT) (Instituto Nacional del Cáncer,

### HLA-G immunostaining. Low-grade Transitional Carcinoma

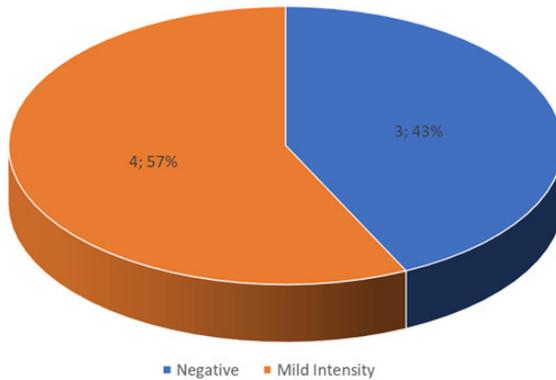


Figura 8. Proporción de muestras con inmunomarcación para HLA-G en Carcinoma de células transicionales de bajo grado.

2020). En la serie de casos analizada en este estudio, la edad media de las muestras obtenidas en el hospital público fue de 58 años, esta media se encuentra por debajo del rango de edad establecido por la Organización Mundial de la Salud en su clasificación de tumores del aparato urinario, de 65 a 71 años (Eble *et al.*, 2016). Una probable explicación para esto es que las muestras fueron obtenidas en un hospital público de alta complejidad que es un instituto de referencia regional, por lo que se atiende a un número importante de pacientes, muchos de los cuales son derivados de instituciones de menor complejidad. Además, estos pacientes suelen presentar estadios patológicos avanzados, lo que explica que la mayoría de los casos (20 de un total de 30) presenten CT de alto grado con compromiso de la capa muscular de la vejiga (estadio patológico T2).

Mecanismos que aún no están del todo claros provocan la expresión anormal de HLA-G en determinadas patologías, como algunas

neoplasias, como mecanismo para evadir el sistema inmunitario. En cuanto a la expresión de HLA-G en los casos de CT vesical analizados, 21 de los 23 casos de CT de alto grado (91%) han mostrado positividad para HLA-G, por encima de lo publicado en otras series (Desgrandchamps *et al.*, 2018). Sin embargo, los casos analizados en ese estudio previamente publicado corresponden exclusivamente a carcinomas que no invaden el músculo detrusor de la vejiga. En el presente trabajo, las muestras analizadas son en su mayoría de CT en estadios avanzados de la enfermedad (estadio T2). En este estudio, de las muestras que no involucran al músculo detrusor (10 en total), 6 presentaron positividad para la expresión de HLA-G y esta fue con intensidad leve. Es por ello, que para establecer una frecuencia de expresión regional de HLA-G, se debe aumentar el número de muestras de CT sin afectación de la muscular propia de la vejiga.

Se ha establecido que los pacientes con CT con afectación del músculo detrusor tienen una supervivencia a los 5 años menor que los que no la tienen, independientemente del grado histológico establecido (Eble *et al.*, 2016). En el presente trabajo, los pacientes con compromiso del detrusor (cuatro) tenían una expresión de HLA-G de moderada a fuerte, por lo que podemos confirmar que la expresión de este CI se correlaciona directamente con un mal pronóstico. Además, tres de los cuatro pacientes presentaban el consumo de tabaco como factor de riesgo añadido.

Todos los datos mencionados permiten afirmar que la expresión de HLA-G en células neoplásicas del CT vesical se asocia a una mayor agresividad de la lesión (considerando el nivel de invasión) y a una peor sobrevida (considerando un punto de corte de 5 años). Por lo tanto, sería de gran utilidad añadir esta inmunomarcación al panel de inmunohistoquímica utilizado en el diagnóstico de rutina de esta neoplasia.

## Referencias bibliográficas

- Bukur, J.; Rebmann, V.; Grosse-Wilde, H.; Luboldt, H.; Ruebben, H.; Drexler, I.; Sutter, G.; Huber, C.; Seliger, B.(2003). Functional role of human leukocyte antigen-G up-regulation in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 4107-4111.
- Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N.; Tronik-Le Roux, D.; Moreau, P.; LeMaoult, J. (2015). HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. *Adv Immunol*, 33-144.
- Consenso Nacional Inter-Sociedades para el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Vejiga. (2013). Argentina. Disponible en: [https://www.sau-net.org/publicaciones/lineamientos-diagnostico-tratamiento/lineamientostumores/consenso\\_ca\\_vejiga\\_2013.pdf](https://www.sau-net.org/publicaciones/lineamientos-diagnostico-tratamiento/lineamientostumores/consenso_ca_vejiga_2013.pdf)
- Cueni, L.N.; Detmar M. (2008). The Lymphatic System in Health and Disease. *Lymphat Res Biol*, 109–122.
- Desgrandchamps, F; LeMaoult, J; Goujon, A; Riviere, A; Rivero-Juarez, A; Djouadou, M; de Gouvello, A; Dumont, C; Wu, C-L; Culline, S; Verine, J; Rouas-Freiss, N; Hennequin, C; Masson-Lecomte, A; Carosella, E.D. (2018). Prediction of non-muscle-invasive bladder cancer recurrence by measurement of checkpoint HLAG's receptor ILT2 on peripheral CD8+ T cells. *Oncotarget*, 33160-33169.
- Eble J., Epstein J., Sauter G.; Sesterhenn, I. (2016 [2004]). *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, IARC Press, Lyon, Capítulo 2, 81-106.
- García, M.; Palma, M.B.; Verine, J.; Miriuka, S.; Inda, A.M.; Errecalde, A.L.; Desgrandchamps, F; Carosella, E.D.; Tronik-Le Roux, D. (2020). The immune-checkpoint HLA-G/ILT4 is involved in the regulation of VEGF expression in clear cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, 1-11.
- Instituto Nacional del Cáncer (2020), Argentina. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>

- Kumar, V., Abbas, A.; Aster, J. (2015). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Capítulo 20, 961 – 969.
- Loumagne, L.; Baudhuin, J.; Favier, B.; Montespan, F.; Carosella, E.D.; Rouas-Freiss, N. (2014). In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance. *Int J Cancer*, 2107-2117.
- Raica, M.; Jitariu, A.A.; Cimpean Anca, M. (2016). Lymphangiogenesis and Anti-lymphangiogenesis in Cutaneous Melanoma. *Anti-cancer Res*, 4427-4436.
- Rouas-Freiss N., LeMaoult J., Verine J.; Tronik Le-Roux, D.; Culine, S.; Hennequin, C.; Desgrandchamps, F.; Carosella, E.D. (2017). Intratumor heterogeneity of immune checkpoints in primary renal cell cancer: Focus on HLA-G/ILT2/ILT4. *Oncoimmunology*, 13420-13423.
- Rouas-Freiss, N.; Gonçalves, R.M.; Menier, C.; Dausset, J. Carosella, E.D. (1997). Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci*, 11520-11525.
- Tronik-Le Roux, D.; Renard, J.; Vérine, J.; Renault, V.; Tubacher, E.; LeMaoult, J.; Rouas-Freiss, N.; Deleuze, J-F.; Desgrandchamps, F.; Carosella, E.D. (2017). Novel landscape of HLA-G isoforms expressed in clear cell renal cell carcinoma patients. *Mol Oncol*, 1561-1578.
- Union for International Cancer Control. (2018). TNM Classification of Malignant Tumours - 8th edition.
- Zhang, P.; Guo, X.; Li, J.; Yu, S.; Wang, L.; Jiang, G.; Yang, D.; Wei, Z.; Zhang, N.; Liu, J.; Sun, Y. (2015). Immunoglobulin-like transcript 4 promotes tumor progression and metastasis and up-regulates VEGF-C expression via ERK signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 13550-13563.
- Zheng, W.; Aspelund, A.; Alitalo, K. (2014). Lymphangiogenic factors, mechanisms, and applications. *J Clin Invest*, 878–887.