

CÂNCER DE BOCA: EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE *c-erbB-2*, Bcl-2 E EGFR – ESTUDO COMPARATIVO COM LEUCOPLASIA E HIPERPLASIA INFLAMATÓRIA

ORAL CANCER: IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF c-erbB-2, Bcl-2 AND EGFR – STUDY WITH LEUKOPLAKIA AND INFLAMMATORY HYPERPLASIA

Barros, Rosana M. G.*
Magalhães, Albino V.**
Schmit, F. C.***

RESUMO

Anormalidades em genes que regulam a proliferação e morte celular podem provocar inúmeras doenças entre elas o carcinoma epidermóide de boca. Tem sido relatado que alterações genéticas nas células tumorais predizem a agressividade biológica dos tumores. Marcadores genéticos como *c-erbB-2*, Bcl-2 e EGFR são considerados indicadores promissores de prognósticos para as lesões cancerizáveis e as neoplasias. **Objetivo:** Avaliar a expressão imunohistoquímica das proteínas *c-erbB-2*, Bcl-2 e EGFR (oncoproteínas envolvidas na vias de proliferação celular). **Material e Métodos:** cento e cinco blocos de parafina contendo fragmentos de biopsias incisionais, sendo 54 de carcinomas epidermóides, 25 blocos de leucoplasias e 26 blocos de hiperplasias obtidos do Laboratório de Patologia de Boca da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). A expressão das proteínas foi verificada através da técnica imunohistoquímica utilizando a estreptoavidina-biotina-peroxidase no Laboratório de Patologia da Universidade de Brasília (UNB). **Resultados:** Os resultados revelaram diferença estatisticamente significativa da proteína EGFR para os carcinomas epidermóides de boca e para as demais proteínas não houve diferença estatisticamente significativa entre as lesões. **Conclusões:** Os resultados sugerem que o EGFR pode ser utilizado como marcador em carcinoma de boca podendo contribuir para a progressão da neoplasia, porém, sendo insuficiente na predição da carcinogênese.

UNITERMOS: fatores de prognóstico; imuno-histoquímica; carcinoma epidermóide.

SUMMARY

*Abnormalities in genes that regulate the proliferation and cell death can provoke many lesions as oral epidermal carcinoma. It has been related that genetic alterations in tumoral cells predict the biologic aggressivity in the tumors. Genetic markers as *c-erbB-2*, Bcl-2 and EGFR are considered indicators of prognostic to the pre-malignant lesions and neoplasias. **Objective:** to study in the fragments of incisional biopsy the expression of *c-erbB-2*, Bcl-2 and EGFR proteins. **Materials and methods:** 54 cases of epidermal carcinoma, 25 cases of neoplasias and 26 cases of hyperplasias obtained from Oral Pathology's Laboratory of Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS). The used method was streptoavidin-biotin-peroxidase in Patthology's Laboratory of University Brasilia (UNB). **Results:** The results revealed positivity significant of EGFR proteins to the oral epidermal carcinoma and to the other one protein there was no statistical significant difference. **Conclusions:** The results suggest that EGFR can be used as a marking in oral epidermal carcinoma and can contribute to the progression of neoplasia, however, being insufficient to predict the carcinogenesis.*

UNITERMS: factors of prognostic; immunohistochemical, epidermal carcinoma.

* Cirurgiã Dentista, Professora Ms responsável pela Disciplina de Patologia Bucal e pesquisadora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

** Médico, Professor Titular em Patologia e pesquisador da Universidade de Brasília.

*** Associado de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Diretor da Unidade de patologia do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal.

INTRODUÇÃO

A importância do conhecimento do ciclo celular, das alterações dos genes que controlam a proliferação, a diferenciação e morte celular e seus produtos tem sido o interesse de muitos pesquisadores com o objetivo de fornecer informações relevantes tanto sobre o mecanismo celular normal quanto o relacionado com a progressão das neoplasias para prever o comportamento biológico da doença¹. No processo de proliferação celular estão envolvidas proteínas e produtos dos oncogenes e genes supressores de tumor que podem explicar a origem do câncer².

A identificação de proteínas que estão presentes em células proliferativas especialmente pelo método da imuno-histoquímica como o *c-erbB-2*, Bcl-2 e EGFR tem fornecido dados com os quais os clínicos poderão tomar condutas mais efetivas em relação ao paciente³.

O *c-erbB-2* é um protooncogene cujo produto protéico possui atividade de tirosina-quinase e está envolvido na proliferação celular. A superexpressão do seu produto está correlacionada com a progressão das lesões e com o pior prognóstico em alguns cânceres⁴.

Ao protooncogene Bcl-2 é atribuída a função de agir na regulação da apoptose e a sua superexpressão pode ser evidenciada em várias neoplasias⁵. O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um sinalizador na regulação de fosforilação da tirosina e atua na proliferação celular. A expressão do seu produto está correlacionada com a progressão e com o pior prognóstico em alguns cânceres⁶.

Considerando a relação da expressão desses fatores envolvidos na proliferação celular com a promoção na carcinogênese, progressão tumoral e prognósticos em diversas neoplasias inclusive no carcinoma epidermóide de boca, foram eles utilizados neste trabalho, visando a contribuir com um melhor entendimento dessas patologias.

MATERIAL E MÉTODO

As 54 amostras de carcinomas epidermóides, as 25 de leucoplasias e as 26 de hiperplasias inflamatórias foram obtidas dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Todas fixadas em formalina e processadas em parafina, dos anos de 1998 a 2004. Os cortes, corados pela hematoxilina-eosina foram revistos por dois observadores e graduados segundo o sistema

de Broders⁷ (1942) e recomendado pela Organização Mundial de Saúde⁸. As hiperplasias foram introduzidas nesse trabalho como grupo controle.

Análise imuno-histoquímica

Preparos de 5 μ m de espessura foram cortados, montados recobertos com 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Chemical-St. Louis, MO/USA), desparafinados e reidratados em álcoois de acordo com os métodos de rotina. O protocolo utilizado foi o da técnica estreptoavidina-biotina-peroxidase e após a imunomarcção as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer e, posteriormente montadas em resina (entelan). Os anticorpos utilizados e suas especificações e diluições seguem abaixo (Tabela 1).

TABELA 1 – Anticorpos primários suas especificações e diluições

Anticorpo	Clone	Cód. Catálogo	Fornecedor	Diluições
Anti-p53	DO-7	M7001	DAKOCytomation-USA	1/50
Anti- <i>c-erbB-2</i>		A0485	DAKOCytomation-USA	1/400
Anti Ki-67	MIB1	M7240	DAKOCytomation-USA	1/50

Os resultados da avaliação da expressão dos anticorpos para o *c-erbB-2*, Bcl-2 e EGFR foram assegurados semiquantitativamente por dois observadores usando um sistema de escores, baseado nos trabalhos de Jacobstw et al.⁹ (2000). A marcação do *c-erbB-2* e EGFR é identificada por coloração acastanhada na membrana celular. Para o Bcl-2 a identificação da coloração acastanhada é no citoplasma celular

Para a quantificação da oncoproteína *c-erbB-2*, Bcl-2 e EGFR a intensidade da marcação foi: 0 – ausência de imunorreatividade em padrão membrana e citoplasma em mais de 90% das células tumorais. A marcação positiva + foi para a imunorreatividade discreta, em padrão membrana ou quase imperceptível; em mais de 10% das células tumorais. A positividade marcada com ++ foi para a imunorreatividade de discreta a moderada, em padrão membrana, em mais de 10% das células tumorais. Os positivos +++ foram para aqueles em que a imunorreatividade intensa e completa, em padrão membrana, esteve presente em mais de 10% das células tumorais⁹.

Análise estatística

Os dados obtidos a partir da expressão imuno-histoquímica das proteínas *c-erbB-2*, *Bcl-2* e *EGFR* foram submetidas a análise estatística, com a finalidade de verificar a relação da expressão entre as lesões estudadas pelo teste qui-quadrado. Para tal foi usado o programa SPSS for Windows, versão 10,0.

Para todos os testes, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Incidência da expressão dos marcadores

c-erbB-2

Expressão imuno-histoquímica da proteína *c-erbB-2* apresentou-se exclusivamente como marcação de membrana celular, de coloração marrom ou acastanhada. Dentro de um mesmo fragmento a intensidade de marcação foi homogênea, mas variando de uma lesão para outra marcando de fraca a moderada intensidade (Tab. 2 e Fig. 1). Nos carcinomas os escores ++ foram em 64,8%. Nas lesões leucoplásicas e hiperplásicas mostraram similaridades com marcação de intensidade moderada com escore (++) .

Bcl-2

A expressão imuno-histoquímica do *Bcl-2* em carcinoma epidermóide foi heterogênea, observando-se marcação nuclear e citoplasmática. Para a identificação das células coradas foram consideradas as que apresentavam marcação citoplasmática. Dos 54 casos, trinta e dois casos (59,2%) receberam escore +, quinze casos obtiveram escore ++/+++ e sete não marcaram (Tab. 3 e Fig. 2). Nas lesões leucoplásicas e hiperplásicas mostraram similaridades com marcação de intensidade moderada com escore (+).

EGFR

A marcação imuno-histoquímica em membrana celular revelou positividade em dezoito casos (33,3%) com escore ++, dezesseis casos (29,6%) com escore + e em seis casos (11,1%) com escore+++ de moderada a forte intensidade (Tab. 4 e Fig. 3). Nas lesões leucoplásicas e hiperplásicas mostraram similaridades com marcação de intensidade moderada com escore (++) .

TABELA 2 – Distribuição dos casos segundo tipo de lesão e expressão de *c-erbB-2*.

Tipo de lesão	Expressão <i>c-erbB-2</i>			Total	p*
	+	++	+++		
Carcinoma	14 (25,9%)	35 (64,8%)	5 (23,1%)	54 (100,0%)	0,958
Leucoplasia	6 (24,0%)	18 (72,0%)	1 (4,0%)	25 (100,0%)	
Hiperplasia	6 (23,1%)	18 (69,2%)	2 (7,7%)	26 (100,0%)	

* Se $p < 0,05$ – diferença estatisticamente significativa segundo o teste de associação do qui-quadrado.

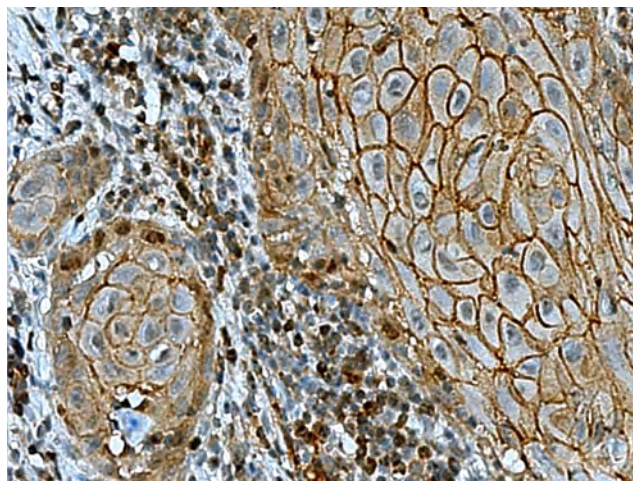


Figura 1 – Expressão imuno-histoquímica da oncoproteína *c-erbB-2* em carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado (escore ++) evidenciada pela coloração acastanha, apresentando-se em todas as camadas da massa tumoral (400×).

TABELA 3 – Distribuição dos casos segundo o tipo de expressão de *Bcl-2*.

Tipo de lesão	Expressão <i>Bcl-2</i>			Total	p*
	Negativo	+	++/+++		
Carcinoma	7 (13,0%)	32 (59,2%)	15 (27,8%)	54 (100,0%)	
Leucoplasia	8 (36,0%)	15 (60,0%)	2 (4,0%)	25 (100,0%)	
Hiperplasia	11 (42,3%)	15 (57,7%)	0 (0,0%)	26 (100,0%)	

* Não foi possível calcular o qui-quadrado, mesmo somando as categorias "negativo e +".

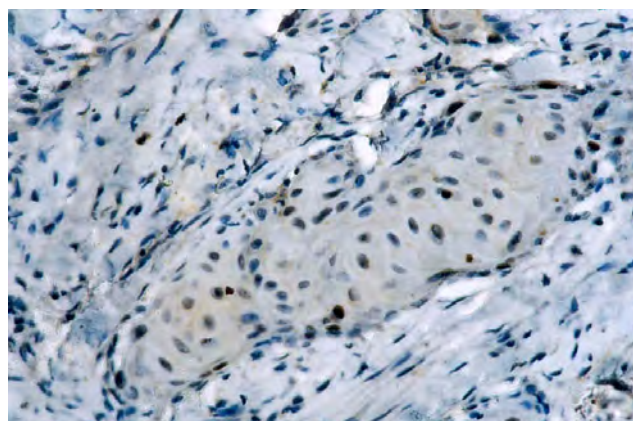


Figura 2 – Expressão imuno-histoquímica da oncoproteína *Bcl-2* discreta em carcinoma epidermóide (escore +) evidenciada pela coloração citoplasmática acastanha, apresentando-se em todas as camadas da massa tumoral com distribuição difusa (400×).

TABELA 4 – Distribuição dos casos segundo o tipo de lesão e expressão de EGFR.

Tipo de lesão	Expressão EGFR				Total	p*
	Negativo	+	++	+++		
Carcinoma	14 (25,9%)	6 (29,6%)	18 (33,3%)	6 (11,1%)	54 (100,0%)	0,00
Leucoplasia	8 (32,0%)	0 (0,0)	12 (48,0%)	5 (20,0%)	25 (100,0%)	
Hiperplasia	3 (11,5%)	2 (7,7%)	12 (41,1%)	9 (34,7)	26 (100,0%)	

* Nível de significância estatística segundo o teste de associação do qui-quadrado. Para realização do teste qui-quadrado foram consideradas as seguintes categorias: "negativo e +" e "+/+/+/++".

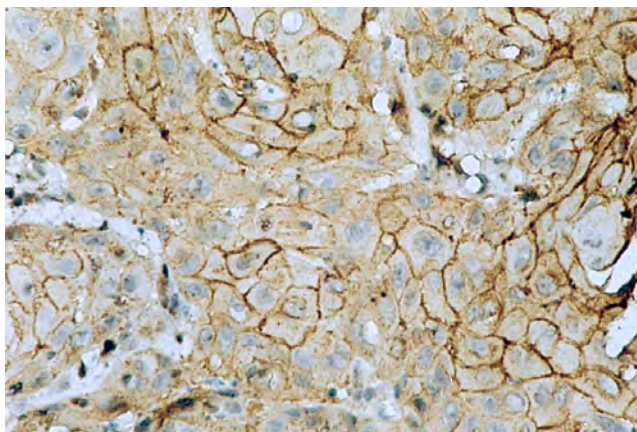


Figura 3 – Expressão imuno-histoquímica da onco-proteína EGFR em carcinoma epidermóide (escore ++) evidenciada pela coloração membrana celular acastanha, apresentando-se em todas as camadas da massa tumoral com distribuição difusa (400×).

DISCUSSÃO

O produto do *c-erbB-2* é uma proteína com atividade de tirosina quinase, que são enzimas capazes de fosforilar resíduos de tirosina em proteína e parece ser um processo de grande importância na ativação das várias proteínas que participam no controle da divisão celular¹⁰.

Vários trabalhos existentes na literatura para avaliar a expressão do *c-erbB-2* mostram diferenças estatisticamente significativas em comparação com comportamento biológico do carcinoma de boca e parâmetros clínicos em que a positividade alta desta proteína está relacionada com pior prognóstico e sobrevida^{11,12}. Entretanto, Nagler et al.⁶ (2002), Ulanovski et al.⁴ (2004) acompanharam pós-cirurgicamente pacientes que apresentaram carcinoma epidermóide de boca e verificaram que os marcadores *c-erbB-2* e Bcl-2 e *c-erbB-2* e EGFR não serviram para prever a sobrevida de pacientes Vora et al.¹³ (2003) procurando correlacionar um painel de imuno-marcadores entre eles o *c-erbB-2* e o Bcl-2 em pacientes com câncer de língua e informações clínicas dos pacientes, não observaram diferenças estatisticamente significativas

entre a expressão destes marcadores e os parâmetros clínicos. Este trabalho não encontrou associação estatisticamente significativa para o *c-erbB-2* e as lesões estudadas ($p = 0,934$), portanto, não servindo no momento para prever a carcinogênese e nem progressão da neoplasia.

A família do gene Bcl-2 exerce papel importante na regulação da apoptose. Esse gene (*B-cell lymphoma/leukemia-2* gene) foi primeiramente observado translocado entre os cromossomos 14 e 18 em grandes proporções de linfomas foliculares de células B humanas¹⁴. O gene translocado causa uma superexpressão de suas proteínas podendo resultar na alteração da morte programada de células e conseqüentemente permanências dessas células que não morreram¹⁵.

A expressão da proteína Bcl-2 é observada no citoplasma das células¹⁶.

No grupo dos carcinomas epidermóides de boca, a expressão aumentada do Bcl-2 tem sido correlacionada com grau de diferenciação da neoplasia, mas não apresentou significativa relação com a taxa de sobrevida e nem com parâmetros clínicos⁶.

Piattelli et al.¹⁵ (2002), Okazaki et al.¹⁷ (2002) mostraram, em suas investigações, que a relação aumentada da expressão do Bcl-2 em lesões consideradas cancerizáveis pode contribuir para a determinação prognóstica da agressividade da doença.

Relatos na literatura mostram controvérsias na expressão da proteína Bcl-2 durante a progressão do carcinoma epidemóide de boca. Enquanto alguns demonstram seu aumento em lesões displásicas e em carcinomas, outros detectam pouca ou ausência da expressão nessas lesões¹⁷. Nesse estudo, a expressão da proteína Bcl-2 apesar de apresentarem marcações não mostraram relação estatisticamente significativa com os tipos de lesões assim como, com o grau de diferenciação e estadiamento dos carcinomas. No grupo das leucoplasias e hiperplasias, as marcações para o Bcl-2 foram de fraca intensidade marcando 15 casos para ambas as lesões.

O receptor para o Fator de Crescimento Epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR) é uma glicoproteína transmembrana, com atividade intrínseca da proteína tirosina quinase, que estimula o crescimento de vários tipos de epitélio e possui forte atividade mitótica. Os receptores de tirosina quinase (RTK) fazem parte de uma classe importante de receptores de superfície celular cujos ligantes são hormônios protéicos, peptídios

que se ligam à membrana. Esses receptores, quando mutados, contribuem para a proliferação descontrolada de certos cânceres em humanos¹⁸.

A sobreexpressão da proteína EGFR está envolvida no desenvolvimento de inúmeras neoplasias como mama, ovário, pâncreas, carcinoma de cabeça e pescoço, incluindo o de boca^{19,20}. Desta forma, as pesquisas dirigidas à identificação destas proteínas poderiam permitir aos clínicos selecionar pacientes que se beneficiariam de uma estratégia de tratamento menos agressiva. Os estudos de Smith et al.²¹ (2001) fornecem informações de relevância clínica para o EGFR, devido ao seu alto nível em 56 carcinomas orofaríngeos. Esse marcador avaliado nos pacientes tratados com cirurgia e posterior radioterapia mostraram ser um favorável preditor de controle de recidiva regional. Observou-se também que quanto mais agressiva a lesão, mais alta a imunorreação para EGFR.

Os resultados dessa pesquisa revelaram que o EGFR apresentou uma porcentagem de imunorreatividade variando de fraca à moderada intensidade ocorrendo uma associação estatisticamente significativa entre as lesões ($p = 0,0001$). Diante disso, pode-se assegurar que esse marcador pode ajudar no prognóstico dos carcinomas. Nas leucoplasias e hiperplasias houve uma similaridade em 12 casos com imunomarcações de moderada intensidade.

É importante ressaltar que uma mudança significativa no tempo e qualidade da sobrevivência dos pacientes portadores de câncer de boca só ocorrerá com o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e que estão relacionadas com a padronização de procedimentos técnicos através da utilização dos marcadores tumorais.

CONCLUSÕES

1. O oncogene *c-erbB-2* e o Bcl-2 não mostraram ser um fator de prognóstico para a carcinogênese e o carcinoma de boca nessas amostras.

2. O marcador de proliferação celular EGFR mostrou significância estatística quando relacionado com o comportamento biológico dos carcinomas epidermóides. Revelou ser um marcador de progressão para o carcinoma epidermóide de boca.

Conclui-se que a despeito dos progressos alcançados no diagnóstico e na terapêutica do câncer, a elaboração adequada do prognóstico para os carcinomas epidermóides de boca e lesões cancerizáveis ainda apresentam grandes dificuldades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Tood R, Donoff RB, Wong TW. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55(6):613-23.
- Boudewijan J et al. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol & Med*. 2004;33:317-21.
- Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer: a review. *Oral & Maxillofac Surg*. 2003;32:233-45.
- Ulanovski D et al. Expression of EGFR and *c-erbB-2* as prognostic factors in cancer of the tongue. *Oral Oncol*. 2004;40:532-37.
- Singh BB, Chandler FW, Whitaker SB, Anna E, Nelson F, Augusta GA. Immunohistochemical evaluation of Bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathol*. 1998;85:692-8.
- Nagler RM et al. Squamous cell carcinoma of the tongue: the prevalence and prognostic roles of p53, *c-erbB-2* and apoptotic rate as related to clinical and pathological characteristic in a retrospective study. *Cancer Let*. 2004;186:137-50.
- Brodgers AC. Carcinoma of the mouth: types and degrees of malignancy. *AJR J Amer Roentgen*. 1942;17:90-3.
- Pindborg JJ, Reibel J, Holmstrup P. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. World Health Organization. 2ª ed. Geneva; 1997. cap. 2, p.31-3.
- Jacobstow GA et al. HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement. *Am J Clin Pathol*. 2000;113:251-8.
- Kuropkat C et al. Abnormalities of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Auris Nasus Larynx*. 2002;29:165-74.
- Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, Stambrook PJ. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993;119(10):1118-22.
- Scully C, Burkhardt A. Tissue markers of potentially malignant human oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med*. 1993;22:246-56.
- Vora HH et al. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. *J Surg Oncol*. 2003;82:34-50.
- Reed JC. Mini-review: cellular mechanisms of disease series. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*. 1994;124:1-6.
- Piattelli A et al. Prevalence of p53, Bcl-2, and ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002;60:532-40.
- Pande P, Soni S, Kaur J, Agarwal S, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Prognostic factors in betel and tobacco related oral cancer. *Oral Oncol*. 2002;38:491-9.
- Okazaki Y et al. Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol*. 2002;38:562-73.

18. Xia W et al. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clinical Cancer Res.* 1999;5: 4161-74.
19. Tsutsui S et al. EGFR, *c-erbB-2* and p53 protein in the primary lesions and paired metastatic regional lymph nodes in breast cancer. *EJSO.* 2002;28: 383-7.
20. Lo WH, Xia W, Wei, Seyed MA, Hung MC. Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(1): 338-48.
21. Smith BD et al. Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127:780-5.

Recebido para publicação em: 08/07/2005; aceito em: 05/10/2005.

Endereço para correspondência:

ROSANA M. G. BARROS
Rua Manoel Inácio de Souza, 1304 – Santa Fé
CEP 79012-190, Campo Grande, MS, Brasil