



Diminuição da expressão imuno-histoquímica de moléculas de adesão em carcinomas escamosos de mucosa oral

Reduction of immunohistochemical expression of adhesion molecules in squamous carcinoma of oral mucosa

Marina Luise Viola de Azevedo^[a], Ana Carolina Curitiba Antunes^[b],
Ana Paula Camargo Martins^[c], Lúcia de Noronha^[d], Cleber Machado de Souza^[e]

^[a] Mestranda em Ciências da Saúde do Programa de Pós-Graduação, bióloga do Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil.

^[b] Bióloga pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil.

^[c] Mestre em Ciências da Saúde, bióloga do Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil.

^[d] Mestre e Doutora em Patologia, professora adjunta da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil.

^[e] Doutor em Ciências da Saúde, professor assistente da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: cleberius@gmail.com

Resumo

Objetivos: Comparar a expressão imuno-histoquímica da E-caderina e da Beta-catenina de lesões escamosas pré-neoplásicas e neoplásicas de mucosa oral de amostras emblocadas em parafina. **Materiais e métodos:** Foram selecionadas 15 amostras de mucosa oral de pacientes apresentando hiperplasia com ou sem displasia leve (grupo 1); 5 amostras apresentando displasia moderada, acentuada ou carcinoma *in situ* (grupo 2); e 12 amostras apresentando carcinoma de células escamosas invasor (grupo 3). Essas amostras foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica com anticorpos primários monoclonais anti-E-caderina e anti-Beta-catenina. A leitura em microscopia óptica compreendeu a expressão tecidual desses marcadores no epitélio escamoso das amostras de mucosa oral – lesadas ou não. A expressão imuno-histoquímica dessas moléculas de adesão foi classificada, segundo a sua intensidade de marcação tecidual, em negativa, positiva fraca e positiva forte. **Resultados:** A expressão de E-caderina foi forte em 93,3% dos casos do grupo 1 (hiperplasia/dislplasia leve), e 100% dos casos demonstraram forte expressão para a Beta-catenina nesse mesmo grupo.

Contudo, no grupo 3 (carcinoma de célula escamosa), somente 42% dos casos foram fortemente positivos para E-caderina e 25% deles para Beta-catenina. **Conclusões:** A E-caderina e a Beta-catenina diminuíram a sua expressão segundo a progressão tumoral do carcinoma de mucosa oral, reforçando um dos mecanismos relacionados com a sua carcinogênese.

Palavras-chave: E-caderina. Beta-catenina. Carcinoma oral.

Abstract

Objectives: To compare the immunohistochemical expression of E-cadherin and Beta-catenin in squamous pre-malignant and malignant lesions of formalin fixed paraffin embedded buccal mucosa samples. **Materials e methods:** Selected 15 samples of buccal mucosa of patients with hyperplasia with or without mild dysplasia (group 1), 5 samples showing moderate dysplasia, severe or carcinoma in situ (group 2) and 12 samples presenting invasive squamous cell carcinoma (group 3). These samples were subjected to immunohistochemistry with anti-E-cadherin and anti-Beta-catenin monoclonal antibodies. The expression of these markers in tissue samples injured or not were analyzed in accordance of positivity that was observed in epithelium stratum. The immunohistochemical expression of these adhesion molecules was classified according to their intensity in negative, weak positive and strong positive. **Results:** The expression of E-cadherin was strong at 93.3% of patients in group 1, and 100% of the cases showed strong expression of Beta-catenin in the same group. However, in group 3, only 42% of cases were strongly positive for E-cadherin and 25% of them to Beta-catenin. **Conclusions:** The E-cadherin and Beta-catenin decreased their expression according to tumor progression, from hiperplasia/mild dysplasia lesion to buccal invasive carcinoma and this fact may be related of the carcinogenesis mechanisms.

Keywords: E-cadherin. Beta-catenin. Buccal carcinoma.

Introdução

A adesão entre as células, que ocorre por meio de junções celulares, está diretamente relacionada às funções de moléculas especializadas presentes nas membranas de células adjacentes. Existem duas grandes classes que abrangem essas moléculas de adesão: as dependentes de cálcio (selectinas, integrinas e caderinas) e as não dependentes de cálcio, que são as imunoglobulinas (1).

Caderinas são glicoproteínas expressas na superfície de várias células, especialmente nas epiteliais. Elas medeiam a adesão celular e são importantes na manutenção e integridade das células (2). A função de adesão é dependente de uma interação indireta entre o domínio citoplasmático da molécula de caderina com as moléculas de cateninas (alfa, beta e gama).

A Beta-catenina é uma proteína multifuncional, da família das cateninas, que participa da adesão celular e da sinalização nuclear. Essa proteína liga-se às caderinas, auxiliando na união dos seus domínios citoplasmáticos ao citoesqueleto de actina (3). Além do

seu papel crucial na adesão celular, a Beta-catenina tem funções na cascata de sinalização Wnt (4).

As moléculas de adesão, em tecidos normais, promovem a coesão das células entre si e com a matriz celular, além de estarem envolvidas com o movimento e a proliferação celular. Quando essas células sofrem algum tipo de mutação que comprometa direta ou indiretamente o funcionamento normal da adesão celular e os processos de proliferação celular, as células alteradas podem passar a utilizar esses efeitos como meios para a progressão tumoral (5).

O carcinoma de células escamosas (CCE) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade bucal (6) e origina-se como um processo em que focos pré-malignos de células anormais expandem-se seletivamente dentro de um epitélio escamoso estratificado para dominar toda a espessura do epitélio (processo conhecido como carcinoma *in situ*) antes da sua invasão ao tecido conjuntivo pelo rompimento da membrana basal epitelial (processo conhecido como carcinoma invasor).

O processo de gênese do carcinoma escamoso de mucosa oral segue um curso já definido na

literatura, o qual se inicia com as lesões pré-malignas, conhecidas como hiperplasia sem displasia, displasia discreta, displasia moderada e displasia acentuada. O processo de progressão tumoral continua com o comprometimento de toda a espessura do epitélio escamoso observada no carcinoma *in situ* e com a ruptura da membrana basal e invasão do tecido conjuntivo subepitelial no carcinoma escamoso invasor da mucosa oral (4).

A alteração do complexo caderina-catenina tem sido demonstrada em diversos cânceres, incluindo o oral, e tem sido correlacionada com a invasão, metástase e, conseqüentemente, com o pior prognóstico dos pacientes (7). Assim, este estudo pretendeu investigar a expressão imuno-histoquímica das moléculas de adesão E-caderina e Beta-catenina, em tecidos parafinados de mucosa oral apresentando hiperplasia, displasia e neoplasia da mucosa bucal.

Materiais e métodos

Coleta das amostras

Para este estudo, as amostras foram selecionadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Erasto Gaertner, no ano de 2008, prospectivamente. Foram utilizadas amostras de lesões da mucosa bucal fixadas em formalina a 10% e emblocadas em parafina. As lesões foram agrupadas em três classes distintas:

- a) grupo 1 – com 15 amostras de pacientes apresentando hiperplasia/displasia leve;
- b) grupo 2 – com 5 amostras de pacientes apresentando displasia moderada/ acentuada/ carcinoma *in situ*;
- c) grupo 3 – com 12 amostras de pacientes apresentando carcinoma de célula escamosa (padrão invasor).

Essa classificação vem sendo utilizada nos diagnósticos das leucoplasias orais em geral. Alguns diagnósticos foram agrupados em função das características histopatológicas muito similares de cada etapa de evolução da doença (5).

Os blocos de parafina dessas amostras de lesões bucais foram utilizados para realização da técnica de imuno-histoquímica. Foram respeitadas as normas éticas de utilização desse material, evitando-se

o desgaste completo do bloco parafinado para que as referidas amostras possam ser novamente estocadas para estudos futuros, conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (PUCPR), Parecer n. 000217/08.

Imuno-histoquímica

Após a seleção das amostras, estas foram estudadas pela técnica de imuno-histoquímica, usando anticorpos primários monoclonais para a expressão das moléculas de adesão E-caderina e Beta-catenina.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Olympus BX40. O estudo foi cego para a metodologia proposta, pois os casos foram avaliados sem o conhecimento do grupo diagnóstico ao qual a amostra pertencia. Foram então classificados segundo a intensidade de marcação, sendo: negativo, positivo fraco e positivo forte.

Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando os testes Qui-quadrado e exato de Fisher. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

A Tabela 1 mostra os dados clínicos relativos à idade, ao sexo e à localização anatômica dos 33 casos estudados. A amostra apresentou média de idade de 59,1 anos, sendo a maioria homens (75%). As localizações mais comuns das lesões foram: a mucosa jugal (54%), seguida da língua (15%). Os resultados para as marcações das moléculas de adesão E-caderina e Beta-catenina encontram-se na Tabela 2. Os casos selecionados no grupo 1, que compreendem as hiperplasias e displasias leves, apresentaram 93,3% de marcação forte para E-caderina e 100% de marcação forte para Beta-catenina de membrana (Figuras 1 e 2).

Nos casos do grupo 2 (Figura 3), que reúne as displasias severas e o carcinoma *in situ*, houve 60% de marcação forte para a E-caderina, sendo essa mesma intensidade observada em apenas 20% dos casos para a Beta-catenina (membranosa).

Tabela 1 - Dados clínicos relativos à idade, ao sexo e à localização anatômica dos 33 casos estudados

Casos	Idade	Sexo	Localização
08-2008 (2)	76 anos	Masculino	Mucosa jugal
08-2008 (3)	76 anos	Masculino	Mucosa jugal
08-2243	73 anos	Masculino	Mucosa jugal
08-2303	53 anos	Masculino	Língua
08-2304	53 anos	Masculino	Mucosa jugal
08-2392	52 anos	Masculino	Orofaringe
08-2703 (1)	69 anos	Feminino	Palato duro
08-2703 (2)	69 anos	Feminino	Mucosa jugal
08-4967	51 anos	Masculino	Língua
08-5063 (5)	59 anos	Feminino	Mucosa jugal
08-5063 (7)	59 anos	Feminino	Mucosa jugal
08-6661	61 anos	Masculino	Língua
2007-015	37 anos	Feminino	Região retromolar
2007-082	60 anos	Feminino	Palato duro
2007-095	63 anos	Masculino	Palato duro
08-2840 (5)	47 anos	Masculino	Mucosa jugal
08-2923 (2)	64 anos	Masculino	Mucosa jugal
08-2923 (3)	64 anos	Masculino	Mucosa jugal
08-5101	53 anos	Masculino	Mucosa jugal
08-8027	53 anos	Masculino	Palato mole
08-2008 (5)	76 anos	Masculino	Mucosa jugal
08-5123	59 anos	Masculino	Língua
08-5587	59 anos	Masculino	Mucosa jugal
08-6518	55 anos	Masculino	Mucosa jugal
2006-085	51 anos	Feminino	Mucosa jugal
2006-109	63 anos	Masculino	Língua
2007-001	80 anos	Feminino	Mucosa jugal
2007-007	53 anos	Masculino	Lábio inferior
2007-091	63 anos	Masculino	Assoalho de boca
2008-003 (1)	59 anos	Masculino	Mucosa jugal
2008-006	49 anos	Masculino	Região retromolar
2008-061 (2)	Não informado	Masculino	Assoalho da boca
08-2008 (4)*	76 anos	Masculino	Mucosa jugal

Legenda: * = paciente controle.

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 2 - Reação imuno-histoquímica entre os grupos

Casos (n = 33)	Grupo	E-caderina	Beta-catenina		
			Membrana	Citoplasma	Núcleo
08-2008 (2)	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-2008 (3)	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-2243	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-2303	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-2304	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-2392	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-2703 (1)	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-2703 (2)	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-4967	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-5063 (5)	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-5063 (7)	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-6661	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
2007-015	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
2007-082	1	+ fraco	+ forte	Negativo	Negativo
2007-095	1	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-2840 (5)	2	+ fraco	+ fraco	Negativo	Negativo
08-2923 (2)	2	+ forte	+ fraco	Negativo	Negativo
08-2923 (3)	2	+ fraco	+ fraco	Negativo	Negativo
08-5101	2	+ forte	+ fraco	Negativo	Negativo
08-8027	2	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo
08-2008 (5)	3	+ fraco	+ fraco	Negativo	Negativo
08-5123	3	+ forte	+ forte	+ fraco	Negativo
08-5587	3	+ forte	+ fraco	Negativo	Negativo
08-6518	3	+ fraco	+ fraco	Negativo	Negativo
2006-085	3	+ fraco	+ fraco	Negativo	Negativo
2006-109	3	+ fraco	+ fraco	Negativo	Negativo
2007-001	3	+ fraco	+ fraco	Negativo	Negativo
2007-007	3	+ forte	+ forte	+ fraco	Negativo
2007-091	3	+ fraco	+ fraco	Negativo	Negativo
2008-003 (1)	3	+ fraco	Negativo	Negativo	Negativo
2008-006	3	+ forte	+ forte	+ fraco	Negativo
2008-061 (2)	3	+ forte	+ fraco	Negativo	Negativo
08-2008 (4)	Normal	+ forte	+ forte	Negativo	Negativo

Legenda: grupo 1 = hiperplasia/displasia leve; grupo 2 = displasia acentuada/carcinoma in situ; grupo 3 = CEC (carcinoma de célula escamosa padrão invasor).

Fonte: Dados da pesquisa.

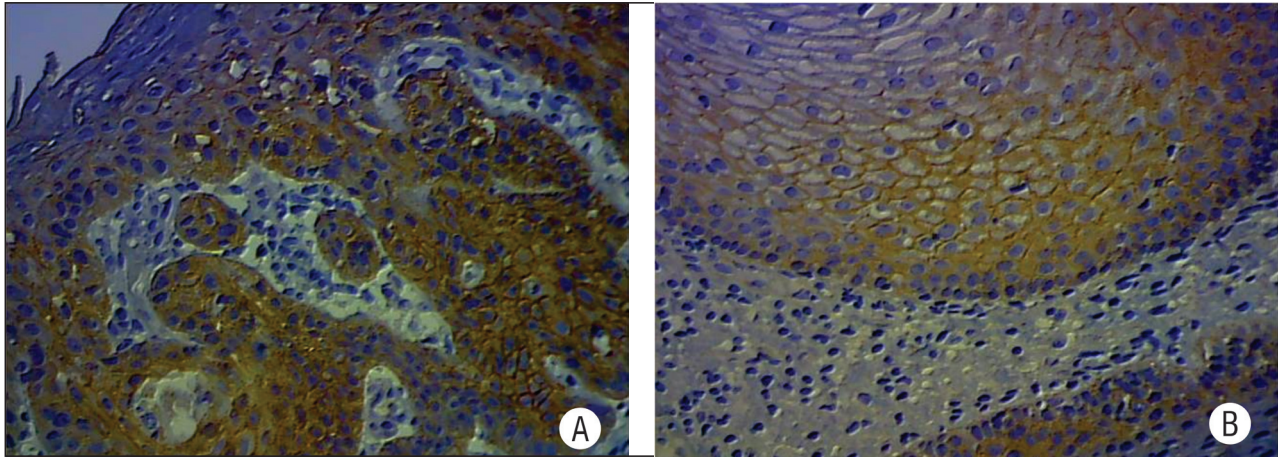


Figura 1 - Fotomicrografia exibindo a reação imuno-histoquímica forte para E-caderina (A) e Beta-catenina (B) nas amostras de hiperplasia e displasia leve (grupo 1) (aumento original 20x)

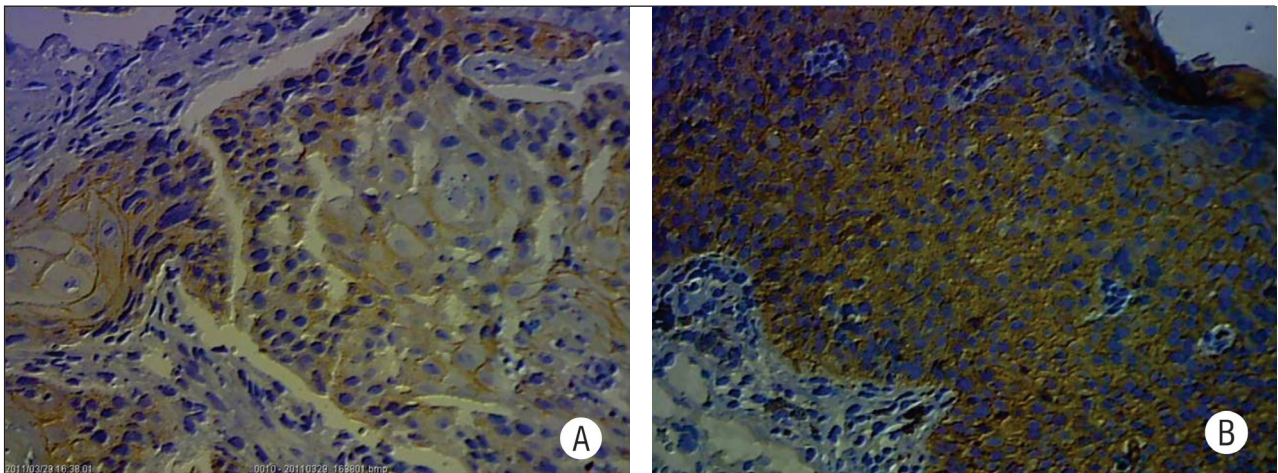


Figura 2 - Fotomicrografia exibindo a reação imuno-histoquímica forte para E-caderina (A) e Beta-catenina (B) nas amostras de displasia moderada/acentuada/carcinoma *in situ* (grupo 2) (aumento original 20x)

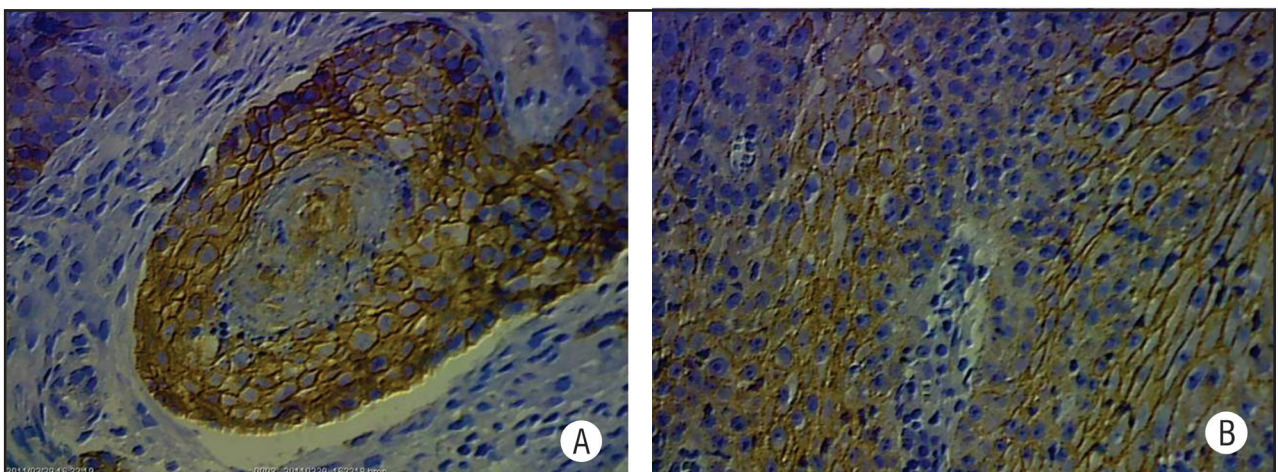


Figura 3 - Fotomicrografia exibindo a reação imuno-histoquímica forte para E-caderina (A) e Beta-catenina (B) nas amostras de carcinoma de célula escamosa (grupo 3) (aumento original 20x)

Para os casos do grupo 3 (Figura 3), ou seja, carcinoma invasor, o padrão das marcações variaram. Para a E-caderina, apenas 42% dos casos apresentaram marcação forte; já para a Beta-catenina (membranosa) essa porcentagem foi de 25%. A marcação para a Beta-catenina citoplasmática apareceu em 25% dos casos do grupo 3 e em nenhum caso dos grupos 1 e 2.

A E-caderina e a Beta-catenina diminuíram a sua expressão, segundo a progressão tumoral no carcinoma de boca, na maioria dos casos com significância estatística ($p = 0,05$), principalmente entre os grupos 1 e 3.

Discussão

O objetivo deste estudo foi investigar a expressão imuno-histoquímica das moléculas de adesão – E-caderina e Beta-catenina –, em tecidos hiperplásicos, displásicos e neoplásicos da mucosa escamosa bucal.

O carcinoma de células escamosas de boca é o tumor maligno mais comum da cavidade bucal e tem a sua patogênese relacionada a fatores ambientais, como o tabaco e o álcool, e a distúrbios genéticos (5).

Spara et al. (8) avaliaram os fatores epidemiológicos relacionados ao câncer de boca, em que encontrou-se uma faixa etária predominante, entre 51 e 60 anos, mais frequente no sexo masculino. Em concordância com esses autores, a nossa amostra foi representada em sua maioria por homens (75%), com média de idade de 59,1 anos.

As localizações mais comuns das lesões foram a mucosa jugal (54%), seguida da língua (15%). A grande maioria dos trabalhos apresenta a língua como o local predominante no aparecimento das lesões (8-10).

Várias estruturas proteicas das células, tais como citoqueratinas, caderinas e outras, podem ser utilizadas como marcadores, na tentativa de se correlacionar as suas expressões com o curso clínico do CCE (11, 12).

A imunolocalização esperada, tanto para a E-caderina como para a Beta-catenina, é a membrana plasmática. Contudo, no caso da Beta-catenina, colorações no citoplasma e no núcleo também podem ser observadas. A maioria das amostras pertencentes ao grupo 1 apresentou marcação forte, tanto para a E-caderina como para a Beta-catenina (membranosa). Esse achado é concordante com a

literatura, uma vez que nessa fase a organização do epitélio nas hiperplasias e nas displasias leves se mantém ainda muito próxima da organização do epitélio normal, bem como da expressão de suas moléculas de adesão em suas junções celulares (6, 13).

Nas amostras do grupo 2, as reações imuno-histoquímicas para as marcações da E-caderina e da Beta-catenina (membranosa) apresentaram-se fracas em 40% e 80% das amostras respectivamente. A menor expressão imuno-histoquímica dessas moléculas, em displasias severas e em carcinomas *in situ*, pode estar refletindo a diminuição da aderência intercelular, o que facilitaria a motilidade das células neoplásicas e, conseqüentemente, a invasão (6). Esse fato estaria influenciando o avanço do processo de progressão tumoral para o padrão de carcinoma invasor (13). Esse grupo apresentou o menor número amostral (5) em relação aos outros grupos: 1 (14) e 3 (12 casos), o que provavelmente interferiu no seu resultado estatístico.

Nas amostras compreendidas para o grupo 3, ou seja, carcinoma invasor, essa marcação variou um pouco mais. Na imunomarcação com E-caderina, 58% das amostras apresentaram diminuição da proteína na membrana e 75% delas apresentaram diminuição da Beta-catenina. A diminuição da expressão da E-caderina durante a progressão da doença pode ser explicada pela hipermetilação do gene da E-caderina, proporcionando esse aspecto uma grande vantagem para a progressão do tumor (14, 15). A perda de E-caderina causa distúrbios na polaridade e adesão celular, facilitando a presença e posterior translocação da Beta-catenina para o interior do núcleo, onde ela induzirá a expressão de genes que promovem a proliferação celular (7). A predominante ausência da Beta-catenina de membrana também pode estar relacionada com a diminuição da adesão celular (4).

A Beta-catenina citoplasmática foi detectada em 25% das amostras do grupo 3 e em nenhuma amostra dos grupos 1 e 2. A localização citoplasmática da Beta-catenina está relacionada com a proliferação celular, pois atua como fator de transcrição de diversas proteínas envolvidas com a proliferação celular (7). O processo da chegada da Beta-catenina até o núcleo envolve uma série de proteínas. Quando a cascata Wnt é ativada, ela impede a ação da proteína GSK-3 β , a qual é responsável pela fosforilação da Beta-catenina e sua conseqüente degradação. Uma vez que essa proteína não age, a Beta-catenina fica acumulada no citoplasma, podendo ser detectada

pela imuno-histoquímica. Após acumular-se no citoplasma, em virtude da ausência das proteínas que fariam a sua degradação, a Beta-catenina é translocada para o núcleo onde age no processo de ativação transcricional (4).

A detecção forte da Beta-catenina no grupo contendo as amostras de carcinoma invasor sugere que, após a invasão tumoral, essa molécula volta a ser necessária e nessa fase ela não age como molécula de adesão, mas principalmente como proteína envolvida com proliferação das células tumorais (7).

A utilização da imuno-histoquímica tem se mostrado fundamental para o entendimento da biologia dos tumores humanos e o nosso estudo buscou evidenciar a importância do papel de duas importantes moléculas de adesão na progressão de lesões escamosas pré-neoplásicas e neoplásicas de mucosa oral.

Conclusão

A Beta-catenina e a E-caderina mudaram o seu padrão de expressão segundo a progressão tumoral no carcinoma de boca com diminuição da sua expressão na maioria dos casos deste estudo.

Referências

- Rubin E, Gorstein F, Rubin R. Patologia: bases clinicopatológicas da medicina. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
- Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991;251(5000):1451-5.
- Lopes, F. Imunohistochemistry expression of the E-caderin and the B-catenin in verbal epidermoidis carcinoma with and without metastasis nodal. *Natal*. 2006; 119.
- Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous β -catenin. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(16):5455-63.
- Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran: patologia – bases patológicas das doenças. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- Margulis A, Zhang W, Alt-Holland A, Crawford HC, Fusenig NE, Garlick JA. E-cadherin suppression accelerates squamous cell carcinoma progression in three-dimensional, human tissue constructs. *Cancer Res*. 2005;65(5):1783-91.
- Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Zeév A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest*. 2002;109(8):987-91.
- Spara L, Spara P, Costa AG. Achados epidemiológicos de câncer da cavidade oral em hospital de referência avaliados no período de 1980-2003. *Odontol Clin Cient*. 2005;4(3):177-83.
- Dedivites RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004;70(1):35-40.
- Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucolo S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(5):385-92.
- Vigneswaran N, Peters KP, Hornstein OP, Haneke E. Comparison of cytokeratin, filagrin and involucrin profiles in oral leukoplakias and carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 1989;18(7):377-90.
- Toto PD, Nadimi H, Maywood MS. Coexpression of cytokeratins, involucrin and blood group antigens in oral squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990;70(1):75-80.
- Perez-Moreno M, Fuchs E. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell*. 2006;11(5):601-12.
- Graziano F, Arduini F, Ruzzo A, Mandolesi A, Bearzi I, Silva R, et al. Combined analysis of E-cadherin gene (CDH1) promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in patients with gastric cancer: implications for treatment with demethylating drugs. *Ann Oncol*. 2004;15(3):489-92.
- Chang HW, Chow V, Lam KY, Wei WI, Yuen A. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Câncer*. 2002;94(2):386-92.

Recebido: 02/10/2011

Received: 10/02/2011

Aprovado: 03/21/2011

Approved: 21/03/2011