

MARCADORES BIOLÓGICOS NO CÂNCER DE BOCA**BIOLOGIC MARKERS IN ORAL CANCER**

Sérgio Adriane Bezerra de Moura¹
Maria Helena Catão²
Marleny Gerbi³
Ricardo Villar Beltrão⁴
Marcelo Augusto Oliveira de Sales⁵
Lino João da Costa⁶

⁶ Doutor em Patologia Bucal (USP), Vice Coordenador do Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia (UFPB/UFBA)

RESUMO

Os estudos acerca dos fenômenos moleculares que acompanham a carcinogênese e os eventos que caracterizam o comportamento de malignidade de uma neoplasia têm colaborado para os avanços no diagnóstico e prognóstico das lesões. O entendimento de tais fenômenos são esclarecedores dos mecanismos etiológicos e biológicos do câncer e permitem avanços importantes no diagnóstico e na terapêutica. São utilizados vários critérios morfológicos para descrever a agressividade de um tumor, dentre estes, o tipo histológico, o grau do pleomorfismo celular, a resposta inflamatória, o número de mitoses e o comprometimento de vasos sanguíneos e linfáticos. Esta revista da literatura aborda o uso de marcadores biológicos no diagnóstico e prognóstico do câncer, particularmente o câncer de boca, enfatizando aqueles relacionados ao índice de proliferação celular, como o PCNA e o Ki-67, e outros que são relacionados à inativação de genes supressores tumorais (p53 e c-erbB-2), enfatizando a interpretação dada a marcação positiva destas proteínas em lesões neoplásicas da boca. Critérios para elucidação diagnóstica e prognóstica, dentre estes, estadiamento clínico, tamanho e localização da lesão, análise de margens, aliados ao uso de marcadores biológicos, oferecem possibilidades importantes de se avaliar o comportamento da doença, em última instância, são de grande valor prognóstico.

ABSTRACT

The studies concerning the molecular phenomena involved with the cancer study and the events that characterize the malignity neoplasia behavior have collaborated for the advances in the diagnosis and prognostic of the diseases. The agreement of such phenomena is enlightening of the etiologies and biological mechanisms of the cancer and allows important advances in the diagnosis and the treatment. Some morphologic criteria are used to describe the tumor behavior, among these, the histological type, cellular pleomorphism grade, inflammatory response, mitosis number and the lymphatic and blood vessels involvement. This literature review approaches the use of biological markers in the diagnosis and prognostic of the cancer, particularly the mouth cancer, emphasizing those related to the cellular proliferation index (PCNA and Ki-67), and others that are related to genes inactivation (p53 and c-erbB-2), emphasizing the

Endereço para correspondência:
Avenida Miguel Castro, 1550, apto 303, Lagoa Nova,
Natal RN CEP 59062-000
sergioabm@walla.com

¹ Doutor em Estomatologia (UFPB/UFBA)

² Doutora em Laser (UFPB/UFBA), Coordenadora do curso de Odontologia (UEPB)

³ Doutora em Laser (UFPB/UFBA), Professora Substituta do curso de Odontologia (UFPE)

⁴ Doutor em Radiologia (UFPB/UFBA), Professor do curso de Odontologia (UEPB)

⁵ Doutorando em Estomatologia (UFPB/UFBA)

given interpretation the positive marking of these proteins in the neoplasms injuries of the mouth. Criteria for diagnostic and prognostic briefing, among these, clinical boasting, lesion size and location, edge analysis, allies to the use of biological markers, offer important possibilities to evaluate to illness behavior, in last instance, with a great prognostic value.

DESCRITORES:

Marcadores biológicos, Câncer de boca, Diagnóstico

DESCRIPTORS:

Biologic marker, Oral cancer, Diagnostic

INTRODUÇÃO

A mensuração da proliferação celular pode prover informações úteis acerca do prognóstico dos tumores e diagnóstico das doenças. Métodos direcionados para diferentes fases do ciclo celular são avaliados, cada um destes apresentando suas vantagens e suas desvantagens.

Os marcadores biológicos são componentes celulares, estruturais e bioquímicos que são úteis para definir alterações celulares e moleculares tanto em células normais quanto aquelas associadas à transformação maligna. Eles podem se apresentar em dois tipos: os marcadores intermediários, que mensuram alterações celulares e moleculares antes do surgimento da neoplasia maligna e os marcadores diagnósticos, úteis na confirmação da lesão maligna já estabelecida. Para que um marcador seja identificado e validado para o uso clínico é necessário que cumpra algumas etapas, partindo de uma identificação inicial feita em linhagens celulares do tumor em questão, utilizando-se de biópsias de tecidos normais e com processo inflamatório, entre outros⁵.

Os marcadores biológicos utilizados para elucidação diagnóstica através de sorologia e métodos histológicos são componentes celulares, estruturais e bioquímicos, que podem ser medidos quantitativamente pelos métodos bioquímicos, imunológicos e moleculares nos fluidos e tecidos corporais, associados a neoplasias e possivelmente ao órgão de origem da neoplasia⁵.

Com o avanço dos estudos, várias proteínas e peptídeos foram identificados como produtos de secreção de uma variedade de neoplasias sólidas. Em 1848, Bence Jones descreveu a proteína do mieloma múltiplo, primeira substância empregada clinicamente como marcador tumoral².

Os marcadores biológicos com fins de diagnóstico têm utilidade no manejo clínico dos indivíduos portadores de neoplasias malignas, auxiliando nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação da resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico. Muitas substâncias têm sido descobertas e algumas, amplamente aplicadas na prática clínica

diária, apesar de escassas evidências científicas que autorizem a sua aplicação^{1,18}. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvendo o controle do crescimento das células neoplásicas pode identificar os fatores do processo regulatório, contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão do tumor²⁰.

As categorias de estadiamento são conhecidas desde 1977 quando o Comitê Americano sobre Câncer (AJCC), publicou a primeira edição do Manual de Estadiamento do Câncer, utilizando a partir de então a nomenclatura T (extensão tumoral), N (status dos linfonodos regionais) e M (presença ou ausência de metástase à distância). Diversos critérios morfológicos são utilizados para descrever ou nomear a agressividade de um tumor, dentre estes critérios inclui-se o tipo histológico, o grau de polimorfismo nuclear, a presença ou ausência de resposta inflamatória, o número de mitoses e o comprometimento de vasos sanguíneos e linfáticos, dentre outros²⁰.

A utilização das técnicas moleculares tem propiciado aos oncologistas o entendimento dos eventos envolvidos no processo de carcinogênese, resultando na geração de uma série de novas informações que influenciam nas condutas e tomadas de decisões^{14,20}.

Além das características clínicas e histopatológicas, aspectos relacionados à biologia dos tumores são considerados no sentido de se prever o comportamento das lesões, independentes de qualquer tipo de procedimento adjuvante, bem como sua resposta a um determinado tipo de terapia, determinando os chamados fatores prognósticos e preditivos, respectivamente^{1,20}.

MARCADORES RELACIONADOS COM A ATIVIDADE PROLIFERATIVA CELULAR

A atividade proliferativa de um tecido ou de uma neoplasia é medida determinando-se a fração média de crescimento e o tempo médio do ciclo celular. Quanto mais alta for a atividade proliferativa de um tumor, é coerente esperar-se que maior seja o potencial de malignidade e pior o prognóstico. A simples contagem do número de mitoses fornece algumas evidências genéricas desta atividade²⁰.

No emprego da técnica imuno-histoquímica uma série de anticorpos tem sido produzida, entre eles para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) ou ciclina, e para Ki-67. Os resultados obtidos pelo Ki-67 e PCNA permitem fazer correlação entre o aspecto morfológico da proliferação celular e o grau de diferenciação tumoral. Sua expressão é inversamente proporcional aos receptores de estrogênio e de progesterona, e também se observa relação entre a expressão destes antígenos e a frequência de metástases²⁰.

MARCADORES RELACIONADOS COM INATIVAÇÃO DE GENES SUPRESSORES TUMORAIS

Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

A literatura tem sugerido a aplicação de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), uma vez que este marcador de proliferação celular funciona como indicador do comportamento biológico de certos tumores.

O PCNA, também chamado ciclina, é uma proteína de 36 kD de DNA polimerase delta. Está presente nas fases G1, S e G2 do ciclo celular e o gen que o codifica tem sido clonado em diversas espécies inclusive havendo semelhança com o PCNA humano. O padrão de positividade é nuclear, podendo ocorrer diferenças na intensidade de marcação em decorrência da expressão distinta as diferentes fases do ciclo celular, portanto, maior positividade nuclear para as células que encontram na fase S do ciclo celular¹².

Martínez-Lara et al¹¹ (1996) analisaram a expressão do PCNA em 10 amostras de mucosa normal, 23 lesões orais benignas (18 hiperplasias e 5 casos de líquen plano oral), 10 lesões orais com displasia epitelial e 10 áreas de epitélio displásico adjacente a tumores. Analisaram-se secções com marcação imunocitoquímica e o escore foi a presença ou ausência de positividade para PCNA na camada supra basal. Concluíram que a expressão de PCNA supra basal pode ser um marcador de displasia em mucosa oral, indicando um estágio de proliferação celular especial nestas lesões.

Cardoso et al⁶ (2000), realizaram um estudo comparativo da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares e observaram que os achados histológicos e análise imunohistoquímica demonstraram diferença significativa quando comparados os tumores de baixo, intermediário e alto grau, concluindo que a expressão do PCNA aumentou com o grau de agressividade nesta lesão.

Ki - 67

Em 1983, a Universidade de Kiel na Alemanha, Gerdes et al⁸ produziram o Ki-67, obtido através da 67^a placa de cultura em tecido, e sendo definido como anticorpo monoclonal de camundongo. Trata-se de uma IgG1 de camundongo produzida contra uma fração nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin.

A estrutura química do antígeno reconhecido e reagente com o Ki-67 é desconhecida. O peso molecular especulado é de 345 a 395 kDa e o

cromossomo 10 parece estar envolvido na expressão da proteína que apresenta íntima associação com o ciclo celular⁹.

O anticorpo monoclonal reage com o antígeno nuclear em todas as fases do ciclo celular com exceção da fase G0, contudo encontra-se ausente em células quiescentes. A expressão antigênica é negativa nas fases G0 e G1 precoce do ciclo celular e positiva durante todo o restante do ciclo, atingindo níveis máximos nas fases G2 e M⁷.

Uma das limitações no emprego do Ki-67 monoclonal na rotina laboratorial é a necessidade de tecidos frescos ou congelados, já que o epítipo reconhecido por ele é destruído pela fixação, impossibilitando assim a sua utilização em material embocado em parafina. Outros fatores limitantes para a imuno-identificação do Ki-67 são: os espécimes submetidos à quimioterapia prévia e neoplasias com crescimento rápido, levando a carência nutricional celular, com conseqüente alteração do número de receptores. A viabilização de seu emprego em cortes embebidos em parafina aliado ao emprego do método de PCNA, permite a avaliação da atividade proliferativa das células neoplasias com conseqüente avaliação prognóstica de diferentes cânceres humanos¹⁷.

A aplicação do Ki-67 no estudo da fração de crescimento nas neoplasias humanas constitui um método fácil e de grande utilidade porque pode fornecer informações úteis sobre prognóstico das lesões. Há correlação prognóstica entre a identificação da atividade proliferativa pela imune detecção do antígeno correspondente ao Ki-67 em diferentes neoplasias humanas, como nos linfomas de Hodgkin, adenocarcinomas, colônico-retais, carcinomas de próstata e mama, melanomas, entre outros²⁰.

ONCOGEN C-ERBB-2

O c-erbB-2 ou neu-oncogene foi identificado em 1981 por Shih em neuroblastomas de rato. Este pertence à família dos oncogenes relacionados à tirosina quinase, codificando a glicoproteína transmembranosa que apresenta estrutura semelhante, mas composição química distinta do receptor do fator de crescimento epidérmico³.

A oncoproteína c-erbB-2 funcional é um dímero, sendo classificada como glicoproteína transmembranosa, contendo um domínio extracelular de ligação e um domínio de atividade intracelular de tirosina cinase. Esta oncoproteína apresenta uma homologia com o receptor para o fator de crescimento epidérmico e tem 185 kD de peso molecular e sua amplificação genética nos tecidos foi bem correlacionada com a recorrência precoce e curta sobrevida em indivíduos com câncer de mama, ovários e estômago. Dentre os protooncogenes mais estudados, merece destaque o c-erbB-2/HER2/NEU/neu que é um protooncogen e tem a função de examinar o nível de amplificação e transcrição gênica ou a expressão do produto gênico⁴.

O oncogene c-erbB-2 pode ser detectado por amplificação gênica, utilizando-se a técnica de PCR, sequenciamento de DNA, ensaios de dot/Southern Blot e hibridização fluorescente *in situ* (FISH). A expressão da oncoproteína c-erbB-2 pode ser verificada por ensaios de análise protéica como ELISA e imunohistoquímica. Esta última técnica é um método simples, rápido e adequado de se verificar a proteína transmembranosa c-erbB-2 em células tumorais, através da utilização de anticorpos anti-c-erbB-2. A determinação da expressão desta oncoproteína em indivíduos com câncer de mama é importante porque prediz o comportamento biológico do tumor, a resposta à quimioterapia adjuvante e determina se o indivíduo com câncer de mama é um candidato ao tratamento com o anticorpo monoclonal humanizado, o herceptin¹³.

ONCOPROTEÍNA P53

A oncoproteína p53 é uma fosfoproteína nuclear codificada por um gene mapeado no braço curto do cromossomo 17 (na banda 17p13.1), possui 393 aminoácidos e um peso molecular de 53 kD e desempenha uma atividade regulatória durante o ciclo celular. O gene TP53 possui 20 kb, é composto de 11 exons, sendo que o primeiro não é codificante. Esse gene codifica um RNAm de 2,8 kb. Atua na transcrição gênica, regulação do ciclo celular, duplicação centrossômica, reparo do DNA, senescência, apoptose, diferenciação e desenvolvimento celular¹⁹.

A oncoproteína p53 funciona como uma guardião do genoma, um verdadeiro policial molecular, atuando quando o DNA é danificado; ocorrendo este evento, uma grande quantidade da proteína se acumula na célula e promove a parada do ciclo celular em G1 dando tempo para que o reparo do DNA se processe, ou então dispara o mecanismo de apoptose. O gene p53 inibe a proliferação de células com lesão no DNA de duas formas: parando o ciclo celular e induzindo a apoptose. Ao parar o crescimento celular em G1, ele permite à célula restaurar a integridade do seu genoma. Todavia, danos irreversíveis exigem a eliminação das células acometidas¹⁰.

DISCUSSÃO

A identificação de proteínas celulares cuja expressão é regulada durante o ciclo celular em células normais é essencial para o entendimento de mecanismos que envolvem o controle da proliferação celular.

Os estudos sobre proliferação celular estão em evidência devido às informações que podem oferecer no tangente à biologia, diagnóstico e prognóstico de vários tumores. O entendimento do ciclo celular e dos seus mecanismos reguladores

reveste-se de importância uma vez que na maioria das neoplasias existe uma grande quantidade de células ciclantes¹⁵.

Os mecanismos que regulam o ciclo celular, a relação com os fatores de crescimento, oncogenes, genes supressores de tumor e as proteínas envolvidas com a progressão das diversas fases do ciclo celular são estudados no campo da biologia tumoral com o objetivo de detectar e quantificar células em proliferação, dessa forma, traça perspectivas diagnósticas e prognósticas das lesões¹⁶.

Com o intuito de se detectarem células em proliferação, estudam-se determinadas proteínas envolvidas com a fase replicativa do DNA de forma a serem utilizadas como marcadores de proliferação celular, onde se destacam a polimerase alfa, o PCNA e o antígeno Ki-67. O uso destes anticorpos possibilita a investigação de tumores humanos com simplicidade, rapidez e baixo custo^{16,18}.

Queiroz¹⁵ (1997) avaliou a expressão dos antígenos PCNA, Ki-67, do oncogene c-erbB-2 e da proteína p53 em lesões de glândulas salivares e observou que o C-erbB-2 e a proteína p53 não são úteis como indicadores de prognóstico do carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimórfico de baixo grau de malignidade, que a expressão do Ki-67 no carcinoma adenóide cístico sólido parece refletir o comportamento biológico mais agressivo desta entidade e que a avaliação da proliferação celular pelo PCNA não permite diferenciar o carcinoma adenóide cístico do adenocarcinoma polimórfico de baixo grau de malignidade nem do adenoma pleomórfico.

O uso de marcadores biológicos para avaliar o comportamento clínico dos tumores de glândulas salivares é de fundamental importância, uma vez que as alterações presentes em qualquer destes tumores nada mais são do que o resultado de numerosos eventos celulares que ocorrem a nível genético e bioquímico, e dessa forma a detecção precoce destas alterações é de grande valor^{6,15}.

Com base em dados observados na literatura, pode-se concluir que os critérios para elucidação diagnóstica das lesões, bem como os critérios de prognóstico tais como: estadiamento clínico, tamanho da lesão, localização topográfica, comprometimento de margens, são importantes na condução clínica das diversas situações, e que, o uso de marcadores biológicos só vêm enriquecer essas possibilidades de melhor estabelecer o diagnóstico e prover o prognóstico das alterações patológicas.

REFERÊNCIAS

01. Akrish S, Buchner A, Dayan D. Oral cancer: diagnostic options as an aid to histology in order to predict patients at high risk for malignant transformation. Refuat Happen Vehashinayin, Oct. 2004; 21(4):6-15, 93.

02. Bagashawek D, Rustin GJS. Circulation tumor markers. In: Perkhani M, Pinedo H, Veronesi U, eds. Oxford textbook of oncology. 4. Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1993. p.531-542.
03. Bartkova J, Barnes DM, Millis RR, Gullick KJ. Immunohistochemical demonstration of c-erbB-2 protein in mammary ductal carcinoma in situ. Hum Pathol, 1990; 21:1164-1166.
04. Batsakis JG. Staging of salivary gland neoplasms: Role of histopathological and molecular factors. Am J Surg, Nov. 1994; 168:386-390.
05. Capelozzi VL. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. J Pneumologia, nov./dez 2001; 27(6):321-328.
06. Cardoso WP, Denardin OVP, Rapoport A, Araújo, VC, Carvalho, MB. Proliferating cell nuclear antigen expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. São Paulo Med J, 2000; 118(3):69-74.
07. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes G. Monoclonal antibody against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave – processed formalin – fixed paraffin sections. J Pathol, 1992; 168:357-363.
08. Gerdes J, Becker MHG, Key G. Immunohistological detection of tumor grown fraction (Ki-67 antigen) in formalin fixed and routinely processed tissues. J Pathol, Sept. 1992; 168(1):85-87. [carta]
09. Key G, Pettersen JL, Becker MHG, Duchrow M, Schlüter C, Askaa J, Gerdes J. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin sections. J Clin Pathol, Dec. 1993; 46(12):1080-1084.
10. Lane DP. P53 guardian of the genome. Nature, July. 1992; 358(6381):15-16.
11. Martínez-Lara I, Gonzáles-Moles MA, Ruiz-Avila I, Bravo M, Ramos MC, Fernández-Martínez JA. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. Acta Stomatologica Belgica, 1996; 1:29-32.
12. McCormick D, HALL PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. Histopathology, Dec. 1992; 21(6):591-594.
13. Nadji M, Fernandez-Gomez C. Immunohistochemistry of HER2 in breast cancer. Dako Clinical Connection, 1999; 1:6-7.
14. Philips KA, Andrulis IL, Goodwin PJ. Breast carcinoma arising in carriers of mutations in BRCA1 or BRCA2: are they prognostically different? Journal of Clinical Oncology, 1999; 17:3653-3663.
15. Queiroz LMG. Expressão do PCNA, Ki-67, c-erbB-2 e p53 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimórfico de baixo grau de malignidade de glândula salivar menor. São Paulo, 1997 (Tese de Doutorado). São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1997.
16. Rabenhorst SH, Burrini RC, Schmitt FCL. Marcadores de proliferação celular. Rev Bras Patol Clin, jan./mar. 1993; 29(1):24-28.
17. Rose DSC, Maddox PH, Browne DC. Wch proliferation markers routine immunohistology? A comparison of five antibodies. J Clin Pathol, Nov. 1994; 47(11):1010-1014.
18. Sdubo J, Samuelsson R, Risberg B et al. Risk markers of oral cancer in clinically normal mucosa as an aid in smoking cessation counseling. J Clin Oncol, Mar. 2005; 20;23(9):1927-1933.
19. Slooten VHJ, et al. Mutations in exons 5-8 of the p53 gene, independent of their type and location, are associated with increased apoptosis and mitosis in invasive breast carcinoma. Journal of Pathology, 1999; 189:504-513.
20. Wakamatsu A, Simões AB, Kanamura CT, et al. Manual de Imuno-Histoquímica com menções à técnica de hibridização molecular. Sociedade Brasileira de Patologia, 1995, 99 p.