



Expressão de Sirtuína 2 em Displasia Epitelial Bucal e Carcinoma de Células Escamosas de Boca: Associações Clinicopatológicas

Valéria Couto Quintão, Lucas Oliveira Barros, Carlos Rafael Affonso, Ludmilla Regina de Souza, Marcos Vinícius Macedo de Oliveira, Sérgio Henrique Sousa Santos, Alfredo Maurício Batista de Paula

Introdução

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento, sendo considerada a neoplasia maligna mais comum nesta região. A localização anatômica é considerada um fator de influência no prognóstico, considerando-se que os tumores apresentam comportamento clínico diferente, conforme a sua localização [1].

A displasia epitelial bucal (DEB) esta ocorre mais frequentemente na mucosa jugal e comissuras labiais, seguidas por mucosa alveolar, língua, lábio, palato duro, palato mole, assoalho de boca e gengiva [2]. Em diversos estudos, a taxa de transformação da displasia epitelial bucal em lesão maligna varia entre 0,6 a 18% [3]. Estudos têm indicado que se a lesão tiver maior grau de displasia, há 36% de chance de transformação maligna [4].

As sirtuínas são consideradas genes reguladores, ou seja, capazes de influenciar outros genes, além de responder a uma variedade de fatores epigenéticos [5]. Sabe-se que a SIRT2 pode se localizar no núcleo durante a transição G2/M do ciclo celular e desacetilar a lisina 16 da histona H4 [6], facilitando assim a condensação dos cromossomos durante a fase mitótica [7]. A diminuição dos níveis de SIRT2 ou sua inibição podem promover o crescimento descontrolado de células, enquanto uma atividade aumentada pode apresentar efeitos benéficos em certos tipos de câncer. A SIRT2 está localizada principalmente no citoplasma [5] podendo enfatizar que o papel dos SIRT2 como um supressor de tumor devido à sua capacidade para restringir ciclo celular.

O objetivo deste estudo foi caracterizar, quantificar e analisar a expressão imunohistoquímica da sirtuína 2 em amostras de displasia epitelial oral e carcinoma de células escamosas de boca.

Material e métodos

A. Pacientes e amostras histopatológicas

Este estudo analítico retrospectivo foi realizado utilizando blocos de tecido arquivados de 33 pacientes com DEB e 27 lesões primárias ressecadas cirurgicamente de pacientes com CCEB, confirmados por análise morfológica. Os dados clínicos e resultados dos pacientes DEB e CCEB foram obtidos dos registros de saúde em centros de referência para o diagnóstico e tratamento oncológico entre 1988 e 2009, em Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

Análise morfológica de DEB e CCEB

Os tecidos foram embebidos em parafinas e foram cortados em seções espessas de 5 µm, desparafinizados e corados com HE. O grau de displasia epitelial em lesão oral foi classificado de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) [8]. A análise do risco de transformação maligna das amostras foi com base nos critérios de Kujan et al [9]

B. Análise imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada a partir da confecção de cortes histológicos de 3µm, desparafinizadas em xilol e reidratadas em uma série de descendentes concentrações de etanol. Depois disso, as lâminas foram levadas para uma panela de pressão com EDTA (pH = 8,0) durante 10 min a 121 ° C. As seções foram submetidas a cinco minutos de bloqueio da peroxidase endógena e com 0,03% de peróxido de hidrogénio em etanol a 100%. Após a lavagem com solução salina tamponada com 10 mM de fosfato (PBS) (pH = 7,6) durante 5 min, as seções foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho SIRT2 primário (diluição 1: 500; Abcam, Cambridge, EUA) durante a noite a 4 ° C. Em seguida, foram incubadas com estreptavidina-biotina anticorpo marcado (LSAB-Kit Além Peroxidase, Dako, Califórnia, EUA) durante 30 min. Para a revelação da marcação os tecidos foram coradas durante 2 min com 3,3'-diaminobenzidina recentemente preparado em 10 mM PBS contendo 0,1% de peróxido de hidrogénio e, em seguida, contrastadas com hematoxilina de Mayer e montadas em Permount. O controle positivo foi aplicado de acordo com as



FÓRUM ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras



24 a 27
setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

Aprovado pelo Comitê de Ética Local (Unimontes/CEP-1564/08)

instruções do fabricante, e os controles negativos foram utilizados, substituindo o anticorpo primário com a Universal Controlo Negativo (Dako, Califórnia, EUA).

O procedimento de contagem foi realizado a partir da análise de fotomicrografias utilizando um microscópio óptico (Olympus® CX31) (0.092 mm²) no aumento de 400X.

A expressão SIRT2 foi semiquantitativamente avaliada de acordo com a intensidade da coloração e a percentagem de células coradas. A intensidade da coloração celular foi classificada de acordo com a seguinte escala: 0, sem coloração; 1, coloração leve; 2, coloração moderada; 3, de coloração forte.

A área de coloração foi avaliada utilizando a seguinte escala: <10%, 0; 10-29% de células coradas positivas, 1; 30-69% das células coradas positivo, 2; e ≥70% de células coradas positivo, 3. O índice foi obtido somando os escores de intensidade de coloração e percentuais. Se o placar final foi igual ou maior que 4, o tumor foi considerado positivo; caso contrário, o tumor foi considerado negativo com base nas conclusões de relatos anteriores [8, 49]. Casos positivos de SIRT2 foram classificados em duas categorias de acordo com a intensidade da coloração citoplasmática; positivo nuclear quando as células positivas nucleares mostraram nenhuma ou fraca imunorreatividade citoplasmática (SIRT2⁺ nuclear) e citoplasmática positiva quando houve > 30% das células positivas nucleares também mostraram moderada a forte imunorreatividade citoplasmática (SIRT2⁺ citoplasmática).

C. Análise estatística

Testes exato de Fisher e qui-quadrado foram aplicados para a análise estatística dos resultados. Todas as análises estatísticas foram realizadas com SPSS® v13.0 para Windows®. Valores de p < 0.05 foram considerados significativos.

Resultados e Discussão

A fim de determinar o papel da SIRT2 na cancerização oral, examinamos a imunexpressão SIRT2 em DEB e CCEB. Foram observados 25 casos de DEB e 22 casos de CCEB com imunexpressão SIRT2 positivo. A coloração com anticorpo anti-SIRT2 foi detectado no núcleo de DEB, mas em CCEB a coloração foi observada principalmente no citoplasma. Não houve associação significativa entre a coloração SIRT2 e gradações morfológicas (Tabela 1).

Foi avaliada a associação entre a imunomarcagem de SIRT2 e características clinicopatológicas do CCEB. Nenhuma associação significativa de imunomarcagem da SIRT2 foi observada com os parâmetros clínicos: SIRT2 foi detectada em quatro casos T1-T2, e em 18 amostras T3-T4 (p = 0.289); Tumores metastáticos locoregionalmente tiveram 10 casos de SIRT2⁺ e 12 amostras sem focos metastáticos foram negativos para imunomarcagem de SIRT2 (p = 0.163). Também não houve associação estatisticamente significativa entre a imunolocalização de SIRT2 (núcleo / citoplasma) e tamanhos de tumor e a presença de metástases loco-regional (p = 0.221 e p = 0.176, respectivamente).

Comparamos imunexpressão de SIRT2 entre DEB e CCEB. A análise mostrou associação significativa quando comparada a localização da imunexpressão SIRT2⁺. As DEB mostraram aumento dos níveis de proteína nuclear, enquanto a CCEB apresentou aumento dos níveis de proteína no citoplasma (p = 0.002).

Estudos tem demonstrado que a proteína SIRT2 se localiza principalmente no núcleo durante a fase mitótica do ciclo celular em células normais, ela está localizada principalmente no citoplasma, durante todas as outras fases do ciclo celular. Tipicamente, os genes SIRT têm sido implicados na manutenção da estabilidade genômico, do reparo de DNA e no metabolismo, e o prolongamento do tempo de vida, embora muitas das suas interações permanecem desconhecidas [10]. A observação de um aumento significativo dos níveis de proteína em SIRT2 nuclear de células epiteliais de DEB e no citoplasma das células invasivas do CCEB sugere que SIRT2 pode ter um importante papel nas fases iniciais de câncer bucal. Sugerimos que SIRT2 é translocada do núcleo para o citoplasma durante a transformação celular na carcinogênese bucal e atua sobre diversos genes alvo, alterando assim o microambiente e colaborando para o desenvolvimento da displasia epitelial e carcinomas da cavidade bucal.

Conclusão

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que os níveis de proteína SIRT2 tinham diferentes padrões topográficos em lesões pré-cancerosas e carcinoma da cavidade bucal, onde imunomarcagem citoplasmática de SIRT2 é maior em CCEB em relação à DEB.



Referência

- [1] ALVES, L.R. *et al.* High HIF-1alpha expression genotypes increase odds ratio of oral cancer. *Head & neck oncology* 4 (2012) 87.
- [2] GARZINO-DEMO, P. Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 34 (2006) 344-350.
- [3] GUARENTE, L.; Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* 132 (2008) 171-176.
- [4] MARGOLIS, R.L.; Lohez, O.D.; Andreassen, P.R. G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J.Cell Biochem.* 88 (2003) 673-683
- [5] PERROD, S. A cytosolic NAD-dependent deacetylase, Hst2p, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast. *EMBO J.* 20 (2001) 197-209.
- [6] STUNKEL, W. *et al.* Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol.J* 2 (2007) 1360-1368.
- [7] SZKUDELSKA, K.; Szkudelski, T. Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur.J Pharmacol.* 635 (2010) 1-8.
- [8] THOMPSON, L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear, nose, & throat journal* 85 (2006) 74.
- [9] KUJAN, O. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 42 (2006) 987-993.
- [10] LODI G, P.S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2008 Feb;37(2):63-9. PubMed PMID: 18197849

Tabela1. Análise de SIRT2 expressões imuno-histoquímica de acordo com sistemas de classificação morfológica de DEB e CCEB

Doenças bucais e sistemas de gradação morfológica	Expressão de SIRT2 (%)			Expressão e localização da SIRT2 (%)		
	Negativo	Positivo	p	Nuclear	Citoplasmática	p
<u>DEB</u>						
<u>Classificação da displasia Epitelial</u>						
Ausente/Leve	6 (75.0)	18(72.0)	0.868	9 (69.2)	9 (75.0)	0.748
Moderada/Grave	2 (25.0)	7(28.0)		4 (30.8)	3 (25.0)	
<u>RMT</u>						
Baixo Risco	7 (87.5)	20 (80.0)	0.632	10 (76.9)	10 (83.3)	0.689
Alto Risco	1 (12.5)	5 (20.0)		3 (23.1)	2 (16.7)	
<u>CCEB</u>						
<u>Classificação WHO</u>						
I	2 (40.0)	05 (22.7)	0.378	0 (0.0)	5 (25.0)	0.400
II	2 (40.0)	05 (22.7)		0 (0.0)	5 (25.0)	
III	1 (20.0)	12 (54.5)		2 (100.0)	10 (50.0)	
<u>IFG</u>						
F1	2 (40.0)	03 (13.6)	0.270	0 (0.0)	3 (15.0)	0.765
F2	2 (40.0)	07 (31.8)		1(50.0)	6 (30.0)	
F3	1 (20.0)	12 (54.5)		1(50.0)	11 (55.0)	



FÓRUM ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO
FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras

REALIZAÇÃO:



APOIO:



FAPEMIG



FADENOR

**24 a 27
setembro**

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

As análises foram realizadas pelo teste do qui-quadrado e teste exato de Fisher. ED = displasia epitelial. RMT = risco de transformação maligna. OMS = Organização Mundial da Saúde. IFG = Invasiva Frente classificação.