



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

BÁRBARA MAYORAL PEDROSO WEYLL

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS β -CATENINA E Wnt-5a EM CARCINOMA
ESCAMOCELULAR DE BOCA**

Salvador
2008

BÁRBARA MAYORAL PEDROSO WEYLL

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS β -CATENINA E Wnt-5a EM CARCINOMA
ESCAMOCELULAR DE BOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Maria Pedreira Ramalho

Salvador
2008

W548 Weyll, Bárbara Mayoral Pedroso.
Avaliação da expressão imunoistoquímica das proteínas
 β -Catenina e Wnt-5a em carcinoma escamocelular de boca /
Bárbara Mayoral Pedroso Weyll. Salvador, 2008.
96 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Odontologia, 2008.

1. Neoplasias bucais. 2. Imunoistoquímica. 3. beta Catenina.
4. Wnt-5a. I. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de
Odontologia. II. Ramalho, Luciana Maria Pedreira. III. Título.
CDU 616.31-006.6

DEDICATÓRIA

Essa dissertação resume o fim de mais uma etapa dos meus estudos.

Agradeço a Deus por essa oportunidade, por gozar de boa saúde, inteligência e pessoas ao meu redor que me ajudam a crescer como ser humano e profissional.

Agradeço especialmente aos meus familiares:

À meus pais, Neide e Cosme, pelo exemplo de vida. Vocês me ensinaram que praticamente tudo que conseguimos na vida ocorre através do esforço, da dedicação, do companheirismo. Obrigada por acreditarem e apostarem no meu potencial, pelo carinho, conforto, consolo... Vocês são tudo para mim!

À minhas irmãs Mônica e Paloma, meus cunhados, Elmo e Marcelo. Obrigada pela confiança, pelo apoio, incentivo e carinho ao longo do curso, inclusive nos momentos mais difíceis, quando achava que nada daria certo e vivia de mau humor. Nessas horas, pude dividir o peso que sentia nos meus ombros.

Aos meus avós que tanto amo (Altino e Maria José) por todo carinho durante esses anos. Segundo meu avô o maior bem do homem é a educação. O dinheiro e as outras coisas materiais podem ser roubados ao longo da vida, já o conhecimento é intocável.

À Miguel pelo companheirismo, conselhos e por se mostrar além de companheiro, um amigo. Obrigada meu amor por todo carinho.

Espero dar a todos vocês motivos para sempre se orgulharem de mim!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da UFBA, minha escola desde o tempo da graduação. Guardo enorme carinho por todos os funcionários e professores. Vocês provam diariamente que ainda é possível formar bons cirurgiões-dentistas. Fico feliz pelas boas mudanças que ocorrem, diante das faltas de verbas. Vocês fazem verdadeiros milagres, principalmente na pesquisa.

Agradeço também àqueles que foram fundamentais para a construção do meu aprendizado e da minha dissertação nesses dois anos.

Agradeço a minha orientadora Luciana por toda confiança depositada em mim e por acreditar na minha capacidade. Parte do meu conhecimento e do que sou como profissional sofre influência dela. Gostaria de um dia alcançar um pouco dessa competência. Ela me ensinou muito, inclusive que ainda existe muito mais para se aprender. Lu, obrigada pelos conselhos, pela atenção e paciência. Admito que inúmeras vezes, fui inconveniente, mas tudo que fiz foi para tentar uma boa produção neste curso;

À Prof^a. Dr^a. Viviane Sarmento pelo acolhimento na clínica de Estomatologia e, principalmente, pelos conhecimentos transmitidos;

À Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Cangussu, não sei o que seria de mim sem sua ajuda na estatística;

Às amigas Adna Barros, Maria da Conceição e Flávia Aquino. Sem a ajuda delas seria, praticamente impossível finalizar esta dissertação;

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, por permitir meu acesso ao Laboratório de Imunoistoquímica da USP e por permitir a ajuda de Flávia nesta etapa;

Ao Prof. Dr. Jean Nunes e à técnica Lurdes, por liberar meu acesso aos arquivos de anatomia patológica e por confeccionar meus cortes histológicos, respectivamente;

Aos Professores do mestrado em Clínica Odontológica, por todo conhecimento a mim transmitido;

Aos Colegas do mestrado, Gleicy, Adna, Caliandra, Lúcio, Cristiano, Larissa, Manoela, Letícia, Maíra, Leonardo, Jorge, Rosângela, Cátia, Margarete, Danilo, Tiago e Flávio. Obrigada pelo companheirismo. Descobrir que sempre temos muito a aprender com as experiências dos outros;

À Caroline Góes pelos conselhos, amizade que foram fundamentais para meu crescimento;

À minha amiga Carol, se não fosse o seu “puxão de orelha”, não teria prestado concurso para o mestrado. Obrigada amiga pelo estímulo e pelos conselhos nas horas mais difíceis;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de estudo que foi fundamental para o meu rendimento e permanência no curso;

Enfim, muito obrigada a todos vocês!

RESUMO

O carcinoma escamocelular é o tipo histológico de câncer mais prevalente na região cabeça e pescoço. Devido a evolução surpreendentemente agressiva de

alguns tumores, faz-se necessário o melhor entendimento do seu comportamento biológico dessa lesão, o que é possibilitado dentre outros, por estudos imunohistoquímicos. A proteína Wnt-5a é um dos membros da família Wnt que frequentemente apresenta sua expressão reduzida em vários cânceres humanos, e esta proteína pode regular a expressão gênica através de um mecanismo dependente da β -catenina. O presente estudo analisou a imunoposição das proteínas Wnt-5a e β -catenina em trinta e seis casos de carcinomas escamocelulares de boca. Verificou-se que a graduação predominante do tumor foi a moderadamente diferenciada (75,00%) e que a média de idade dos indivíduos acometidos foi 60 anos sendo a localização preferencial a língua (38,89%). Em relação a imunoposição dos tumores para β -catenina, observou-se que todos os tumores bem diferenciados exibiram maior marcação em membrana plasmática, enquanto os tumores moderadamente e pouco diferenciados apresentaram predomínio pelo padrão de marcação citoplasmático com menos de 20% do núcleo, 77,78% e 83,33%, respectivamente. Com referência a imunoposição da Wnt-5a, constatou-se que a maioria da amostra (86,00%) apresentou mais de 70% das células marcadas, sendo o padrão de marcação predominantemente citoplasmático o mais prevalente (61,11%). Verificou-se ainda, que tumores cujas células expressaram Wnt-5a em baixa intensidade foram os que apresentaram menores médias percentuais de células marcadas (ANOVA, $p=0,000$). Diferença estatística também foi observada quando comparada a média do percentual de células marcadas na localização de palato com as de língua, rebordo alveolar inferior e assoalho bucal (ANOVA, $p=0,004$), sendo que essas duas últimas regiões foram as que obtiveram menores médias de percentuais de células marcadas. A perda de diferenciação tumoral relacionou-se à maior imunoposição da β -catenina em

citoplasma e núcleo celular, sugerindo que durante a carcinogênese ocorra a inibição da degradação desta proteína, resultando em sua migração para o núcleo. Não foi observada relação concreta da possível influência da Wnt-5a na sinalização da β -catenina. Os resultados deste trabalho sugerem que, em carcinomas escamocelulares de boca, estas proteínas atuam de forma independente.

Palavras-chaves: Carcinoma escamocelular de boca; imunoistoquímica; β -catenina; Wnt-5a.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common histological form of head and neck cancer. Because of the highly aggressive evolution of some tumors, more knowledge is needed about its biological behavior, which may be achieved using immunohistochemical markers. Wnt-5a, of the Wnt family, is frequently upregulated in certain human cancers, and it can regulate gene expression through a mechanism dependent on β -catenin. So, the aim of this study was to evaluate immunoexpression of β -catenin and Wnt-5a proteins in OSCC. Thirty six OSCC lesions were graded according to WHO diagnostic criteria for histological typing of cancer. The immunohistochemistry was performed in line with the Streptavidina-biotin method. β -catenin protein expression had a higher membrane expression pattern in well differentiated tumors (66.67%), while moderately and poorly differentiated tumors showed a predominance of cytoplasmic expression pattern with less than 20% in the nuclei. Furthermore, Wnt-5a expression was observed in most of the sample (86%) with more than 70% of their cells marked, usually in a cytoplasmic expression pattern (61.11%). It was also verified that tumors with low intensity Wnt-5a expression had lower mean percentages of marked cells (ANOVA, $p=0.000$). There was also a statistically significant difference between the mean percentage of marked cells in the palate compared with the tongue, mouth floor and lower alveolar ridge (ANOVA, $p=0.004$). The study found no influence of Wnt-5a on the β -catenin signaling. It seems that the studied proteins play an independent role in OSCC.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma; immunohistochemistry; β -catenin; Wnt-5a.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotomicrografia de CEC de boca bem diferenciado. Observa-se queratinização expressiva de células com pequeno grau de pleomorfismo. H/E. Salvador, Bahia, 2008.....59
- Figura 2 - Fotomicrografia de CEC moderadamente diferenciado. Observam-se grupamentos de células tumorais em forma de ilhas e pequenos grupos celulares invadindo o tecido conjuntivo. H/E. Salvador, Bahia, 2008.....59
- Figura 3 - Fotomicrografia de CEC pouco diferenciado. Observam-se ilhas tumorais invadindo o tecido conjuntivo, as quais apresentam células epiteliais pleomórficas. Verifica-se ausência de queratinização e de reação inflamatória no estroma peri-tumoral. H/E. Salvador, Bahia, 2008.....60
- Figura 4 – Fotomicrografia de CEC de boca bem diferenciado. Observa-se a imunoexpressão da β -catenina na membrana plasmática (seta). Em algumas células tumorais é possível verificar ainda a marcação citoplasmática (cabeça de seta) (A,B). Streptavidina-biotina peroxidase. Salvador-Bahia, 2008.....63

Figura 5 - Fotomicrografia de CEC moderadamente diferenciado, onde se verifica, a imunomarcação da β -catenina na membrana plasmática. Observa-se, entretanto a presena de maior número de células exibindo expressão citoplasmática, além da presena de imunomarcao nuclear da proteína em algumas células (setas laranja). Streptavidina-biotina peroxidase. Salvador, Bahia, 2008.....64

Figura 6 - Fotomicrografia de CEC pouco diferenciado, verifica-se, ausência ou mínima imunomarcao da β -catenina na membrana plasmática. A expressão desta proteína é mais observada em região de núcleo e citoplasma da célula. Verifica-se que nesta região a marcao predomina na periferia da ilha tumoral. Streptavidina-biotina peroxidase. Salvador, Bahia, 2008.....64

Figura 7 – Fotomicrografia de CEC bem diferenciado. Observa-se, na área, padrão nuclear/citoplasmático e intensidade de marcao alta da proteína Wnt-5a. Streptavidina-biotina peroxidase. Salvador, Bahia, 2008.....66

Figura 8 – Fotomicrografia de CEC moderadamente diferenciado. Observa-se, na área, padrão predominantemente citoplasmático e intensidade de marcao moderada da proteína Wnt-5a. Streptavidina-biotina peroxidase. Salvador, Bahia, 2008.....66

Figura 9 – Fotomicrografia de CEC pouco diferenciado. Observa-se, na área, padrão de expressão nuclear/citoplasmático e intensidade de marcao alta da proteína Wnt-5a. Streptavidina-biotina peroxidase. Salvador, Bahia, 2008.....67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Sistema de graduação histológica de malignidade segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), 2005. Salvador, Bahia, 2008.....51
- Tabela 2 – Distribuição das concentrações, procedência, clone e tempos de incubação dos anticorpos utilizados. Salvador, Bahia, 2008.....54
- Tabela 3 – Distribuição dos casos de CEC de boca segundo gênero, faixa etária, localização primária e hábitos. Salvador, Bahia, 2008.....58
- Tabela 4 – Distribuição das lesões de acordo com sua localização e graduação histológica de malignidade (GHM). Salvador, Bahia, 2008.....61
- Tabela 5 – Distribuição do tumor segundo a graduação histológica de malignidade e o padrão de coloração da β -catenina. Salvador, Bahia, 2008.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJ	Do inglês <i>Cell-cell Adherens Junction</i> traduzido como Junção Aderente Célula-célula
APC	Do inglês <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CEC	Carcinoma escamocelular
CEC	Do inglês <i>Dishevelled</i>
Dvl	Caderina epitelial
E-caderina	Fator de célula T
FCT	Do inglês <i>Frizzled</i> -receptor de membrana celular
Fz	Graduação Histológica de Malignidade
Fz	Quinase sintetase glicogênio 3 β
GHM	Instituto Nacional de Câncer
GSK – 3β	Do inglês <i>Jun Kinase</i> -receptor de membrana celular
INCA	Kilo dalton – unidade de massa atômica
JNK	Do inglês <i>Lymphoid Enhancer-Binding Factor</i>
Kda	traduzido como Fator de Crescimento Linfóide
LEF	Do inglês <i>Low-density Lipoprotein Receptor</i> traduzido como Receptor de Lipoproteína
LEF	Do inglês <i>World Health Organization</i> traduzido como Organização Mundial de Saúde
LRP	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> traduzido como

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Carcinoma escamocelular.....	18
2.2	Gradação Histológicas de Malignidade.....	22
2.3	β -Catenina.....	25
2.4	As Wnts e a Wnt-5a.....	27
2.5	Sinalização Wnt/ β -Catenina.....	30
2.6	β -Catenina e Wnt-5a na Carcinogênese.....	34
2.7	β -Catenina e Wnt-5a no Câncer de Cabeça e Pescoço.....	42
3	PROPOSIÇÃO	49
3.1	Objetivo geral.....	49
3.2	Objetivos Específicos.....	49
4	METODOLOGIA	50
4.1	Delineamento da pesquisa.....	50

4.2	População e Amostra.....	50
4.3	Aspectos Éticos.....	50
4.4	Graduação histológica de malignidade.....	51
4.5	Técnica Imunoistoquímica.....	52
4.5.1	Procedimentos iniciais.....	52
4.5.2	Recuperação antigênica.....	53
4.5.3	Bloqueio da peroxidase endógena.....	53
4.5.4	Incubação dos anticorpos primários, secundário, do anticorpo terciário e do cromógeno.....	53
4.6	Análise da marcação imunoistoquímica.....	55
4.7	Análise Estatística.....	56
5	RESULTADOS.....	57
5.1	Resultados Epidemiológicos.....	57
5.2	Graduação Histológica de Malignidade.....	58
5.3	Graduação Histológica de Malignidade e Localização do Tumor.....	60
5.4	Imunoexpressão da β -Catenina.....	61
5.5	Imunoexpressão da β -Catenina e Graduação Histológica de Malignidade.....	62
5.6	Localização do Tumor e Padrão de Coloração da β -Catenina.....	64
5.7	Imunoexpressão da Wnt-5a.....	65
5.8	Padrão de Marcação e Intensidade de Marcação da Wnt-5a e Graduação Histológica de Malignidade.....	67
5.9	Percentual de Células Marcadas e Intensidade de Marcação da Wnt-5a.....	68
5.10	Imunoexpressão da Wnt-5a e a Localização do Tumor.....	68

5.11	Imunoexpressão da β -Catenina e a Imunoexpressão da Wnt-5a.....	69
6	DISCUSSÃO.....	70
7	CONCLUSÃO.....	84
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXO.....	96