

Imunoexpressão da proteína hMSH2 em leucoplasia bucal

*Flávia Sirotheau Corrêa PONTES^a, Helder Antônio Rebelo PONTES^b,
Maria Cássia Ferreira de AGUIAR^c, João Batista da SILVEIRA JÚNIOR^d,
Taíse Sousa Pamplona da SILVA^e, Ricardo Alves MESQUITA^e*

^a*Doutoranda em Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, USP,
05508-000 São Paulo - SP*

^b*Professor Assistente, Faculdade de Odontologia, UFPA, 66075-110 Belém - PA*

^c*Professor Adjunto, Faculdade de Odontologia, UFMG, 31270-901 Belo Horizonte - MG*

^d*Aluno de Graduação, Faculdade de Odontologia, UFMG, 31270-901 Belo Horizonte - MG*

^e*Aluna de Graduação, Faculdade de Odontologia, UFPA, 66075-110 Belém - PA*

Pontes FSC, Pontes HAR, Aguiar MCF, Silveira Júnior JB, Silva TSP, Mesquita RA. Immunodetection of protein hMSH2 in the oral leukoplakia. Rev Odontol UNESP. 2006; 35(1): 107-112.

Resumo: A leucoplasia é a principal alteração potencialmente maligna da boca. Embora o fumo, intensificado pelo consumo de álcool, seja o agente etiológico mais importante para a leucoplasia bucal, estudos complementares são importantes para o entendimento da patogenia da transformação maligna dessa alteração. Realizou-se este estudo com o objetivo de analisar a imunoexpressão da proteína de reparo do DNA hMSH2 em amostras de leucoplasia bucal com aspectos morfo-citológicos de hiperqueratose e atipia epitelial (discreta, moderada e acentuada), assim como no epitélio de mucosa bucal normal. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes quando as imunomarcações das graduações histológicas das leucoplasias bucais foram avaliadas entre si, assim como não houve diferenças estatisticamente significantes com a mucosa bucal normal. Esses resultados avaliados em conjunto sugerem que a proteína hMSH2 não está relacionada aos variados graus de atipia epitelial encontrados na histopatologia da leucoplasia bucal, sugerindo que a proteína hMSH2 não participa do processo de transformação maligna da leucoplasia bucal para carcinoma epidermóide. Porém, mais estudos são necessários para confirmar esses resultados.

Palavras-chave: *Carcinogênese; imuno-histoquímica; leucoplasia bucal; hMSH2.*

Abstract: The oral leukoplakia is the main oral precancerous lesion. Even though the fume, potentiated by alcohol drinks, is the most important etiologic agent of both oral leukoplakia and squamous cells carcinoma, other complementary studies are necessary for the pathogenesis understanding of the malignant transformation of this lesion. Therefore, the purpose of this study was to describe and to analyze the repair protein of DNA hMSH2 protein immunoeexpression in oral leukoplakia samples with different degrees of epithelial dysplasia (mild, moderated and severe), as well as in normal oral mucosa epithelium. The results did not show significant statistic differences when the oral leukoplakia with different degrees of epithelial dysplasia were compared with each other, neither there was a statistical significant difference among the oral leukoplakia samples and the normal oral mucosa. These results suggest that the hMSH2 protein does not partake on oral leukoplakia development into oral squamous cells carcinoma.

Keywords: *Carcinogenesis; immunohistochemical; oral leukoplakia; hMSH2.*

Introdução

Entre as doenças da mucosa bucal, a leucoplasia é a lesão potencialmente maligna mais comum da cavidade bucal e apresenta um amplo espectro de alterações histopatológicas que podem variar desde hiperqueratose até atipia epitelial acentuada. A leucoplasia bucal tem um comportamento clínico variado, podendo, de 1,4 a 36,0%, sofrer transformação para o carcinoma epidermóide de boca¹⁻⁶. Alguns fatores como gênero, aspecto clínico, hábito de fumar e grau de atipia epitelial determinam maior ou menor taxa de transformação da leucoplasia para o carcinoma epidermóide de boca⁷⁻¹⁰. Ainda dentro desse contexto, alterações moleculares e genéticas podem ou não estar associadas à transformação neoplásica maligna da leucoplasia^{11,12}.

Com o advento e o avanço de técnicas de biologia molecular, estudos têm sido realizados com a finalidade de elucidar os mecanismos intrínsecos que ocorrem nos processos celulares. Os novos modelos de estudo sobre leucoplasia bucal têm a finalidade de desvendar as mudanças moleculares através da combinação e integração de múltiplos marcadores moleculares¹¹⁻¹³.

O sistema de reparo representa um mecanismo fisiológico de reparo e manutenção do DNA, mantendo a estabilidade genética e evitando mutações gênicas. As vias de reparo de DNA descritas na literatura compreendem: reparo de combinação homóloga, união final não-homóloga, reparo de excisão de nucleotídeo; reparo de excisão de base e reparo de bases mal pareadas¹⁴.

A correção de bases mal pareadas é realizada pelo sistema de reparo de bases mal pareadas denominado sistema MMR (do inglês *mismatch repair*). O sistema de reparo de bases mal pareadas humano é formado por seis genes capazes de sintetizar proteínas com a função de reparo do DNA: hMSH2 (do inglês *human mut S homolog*); hMLH1 (do inglês *human mut L homolog*); hMSH3 (do inglês *human mut S homolog*); hPMS1 (do inglês *human post meiotic segregation*); hPMS2 (do inglês *human post meiotic segregation*) e hMSH6 (do inglês *human mut S homolog*). As proteínas produzidas por esses genes possuem a capacidade de remover um segmento de DNA contendo uma alteração na sequência de bases e posteriormente corrigi-lo¹⁵⁻²⁰.

Alguns estudos têm demonstrado mutações dos genes de reparo de bases mal pareadas em neoplasias das regiões de cabeça e pescoço, na síndrome do câncer cólon-retal não polipose hereditário (HNPCC do inglês *hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome*) e em neoplasias não vinculadas ao HNPCC^{15,21,22}.

Devido à ausência de estudos do produto protéico do sistema de reparo de DNA em leucoplasias bucais, este trabalho tem como proposta analisar a imunomarcagem da proteína hMSH2 na leucoplasia bucal e na mucosa bucal normal.

Material e método

As amostras de leucoplasia bucal e de mucosa bucal normal foram selecionadas nos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da UFMG (Figura 1). Foram selecionadas 32 amostras com diagnóstico clínico de leucoplasia bucal e 8 amostras de mucosa bucal normal. Em cortes de 4 µm de espessura, corados pela hematoxilina e pela eosina (H&E), realizou-se a gradação histopatológica das leucoplasias bucais, por dois patologistas, de acordo com o sistema proposto por Paula, Gomez²² (2001) (Tabela 1), obtendo-se 8 amostras de hiperqueratose, oito amostras de atipia epitelial discreta, oito amostras de atipia epitelial moderada e oito amostras de atipia epitelial acentuada.

Imuno-histoquímica

A reação imuno-histoquímica para a identificação da proteína MSH2 foi desenvolvida no Laboratório de Imuno-Histoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG. A técnica utilizada foi a da streptavidina-biotina. Cortes de 3 µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro previamente preparadas com 3-aminopropyltriethoxy-silane a 10% (Sigma Chemical, St. Louis, USA), desparafinizadas e reidratadas. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram mergulhadas em solução de TRS – pH 6,0 (Target Retrieval Solution -Dako Corpora-

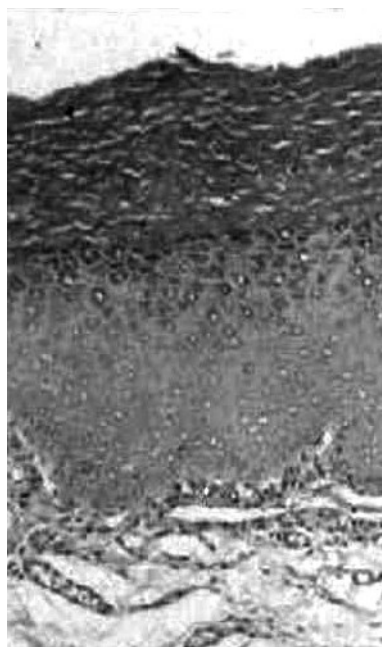


Figura 1. hiperqueratose e acantose (técnica hematoxilina e eosina; aumento de 400X).

Tabela 1. Sistema de graduação histológica do epitélio bucal proposto por Paula & Gómez (2001) usado na avaliação histológica das leucoplasias bucais

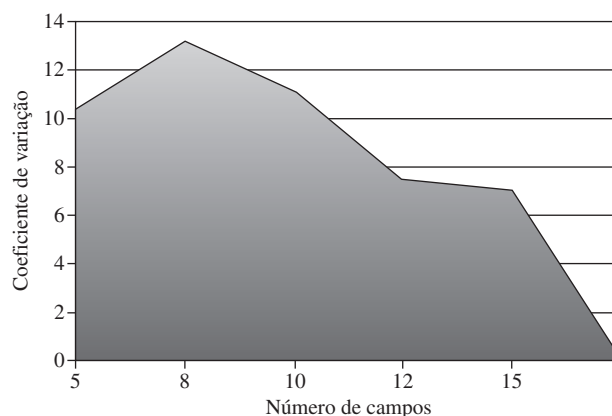
Graduação histológica	Critérios morfo-citológicos
Ausência de atipia epitelial	Sem alterações morfo-citológicas
Atipia epitelial discreta	Presença de uma ou mais alterações morfo-citológicas, restrita à camada basal do epitélio
Atipia epitelial moderada	Presença de uma ou mais alterações morfo-citológicas acometendo metade da espessura do epitélio e a presença de projeções epiteliais em forma de gota
Atipia epitelial acentuada	Presença de uma ou mais alterações morfo-citológicas acometendo mais de metade da espessura do epitélio e a presença de projeções epiteliais em forma de gota

tion, Glostrup, Denmark) por 40 minutos, em temperatura entre 95°C e 98°C. Para a inibição da peroxidase endógena, os cortes passaram por banhos de peróxido de hidrogênio 10 volumes. Os cortes foram incubados em anticorpo anti-hMSH2 (Clone G219-1129 - Pharmigen, San Diego, USA, 1:100). As amostras foram posteriormente incubadas em anticorpo secundário e em complexo terciário (LSAB+ Peroxidase, Dako Corporation, Carpinteria, USA). A revelação da reação foi com solução de diaminobenzidina 0,025% (3,3' diaminobenzidina, Sigma Chemical, St. Louis, USA) por três minutos. As lâminas foram contra-coloradas com hematoxilina de Mayer, desidratadas, diafanizadas e montadas com Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA).

Análise da imunomarcção

Essa análise foi realizada por um único observador, utilizando-se um retículo de contagem para delimitação de campos ajustados a um microscópio de luz (Carl Zeiss – Axiostar 1122-100), com aumento final de 400x para a avaliação da imunomarcção para hMSH2. Consideraram-se células positivas aquelas que apresentavam o núcleo com a coloração castanha como resultado da precipitação do cromógeno diaminobenzidina. Em cada campo, foram contados o número total de células e o número de células positivas para hMSH2. Com essa análise foi criado o índice de marcação para as áreas epiteliais analisadas, em cada uma das amostras: mucosa bucal normal, hiperkeratose, atipia epitelial discreta, moderada e acentuada. Esse índice indica a porcentagem de células positivas em relação ao número total de células. De acordo com dados da literatura, foram consideradas como positivas para hMSH2 as amostras com índice de marcação maior ou igual a 20%¹⁹.

O número mínimo de campos a serem avaliados na análise da imunomarcção da proteína hMSH2 foi estabelecido pela estabilização do gráfico em um patamar de 12 campos (Figura 2). A distribuição dos campos a serem analisados, em toda a extensão epitelial da amostra, foi realizada de acordo com os seguintes critérios: 1) com a lâmina corada em H&E, a área epitelial que apresentava atipia foi avaliada; 2) a seguir, na lâmina do mesmo caso, preparada pela técnica imuno-histoquímica, foi realizada a contagem do

**Figura 2.** Coeficiente de variação por número de campos na análise da imunomarcção para MSH2 das amostras estudadas.

número total de campos presentes na região do epitélio que apresentava atipia; 3) o número total de campos foi então dividido pelo número mínimo de campos a serem analisados para a proteína hMSH2 - o produto dessa divisão, subtraído pelo número 1, corresponde ao número mínimo de campos a serem ignorados a partir de cada campo avaliado; e 4) nos casos em que o número de campos foi menor do que 12, foi analisado o número máximo de campos.

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software BioEstat (Ayres et al.²³, 2003), e sendo estabelecido um erro de 5% ($p < 0,05$).

Resultado

Todas as amostras do nosso estudo foram imunopositivas para a proteína hMSH2, com marcação nuclear nos ceratinóticos da camada basal e suprabasal (Figuras 3 e 4). Os valores de média, máximo e mínimo de cada variável estudada (mucosa bucal normal, hiperkeratose, atipia epitelial discreta, atipia epitelial moderada e atipia epitelial acentuada) podem ser visualizados na Tabela 2. A comparação entre os dados das cinco amostras independentes foi realizada através da análise de variância de Kruskal-Wallis.

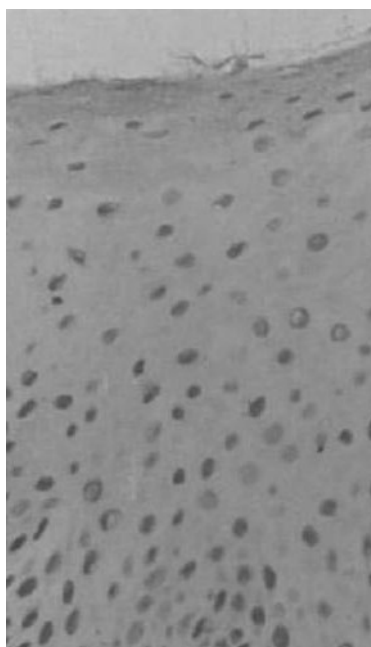


Figura 3. Imunomarcção da proteína hMSH2 em leucoplasia bucal (técnica streptavidina-biotina; aumento de 400x).

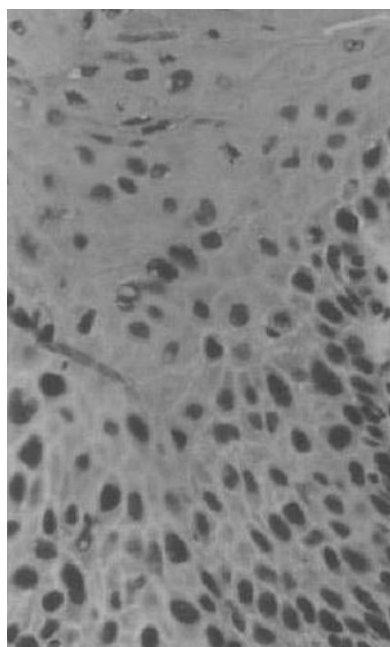


Figura 4. Imunomarcção da proteína hMSH2 em leucoplasia bucal (técnica streptavidina-biotina; aumento de 400x).

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as imunomarcações da proteína hMSH2 nos diferentes aspectos histológicos de leucoplasia bucal e a mucosa bucal normal ($H = 1,414$; graus de liberdade = 4; $p = 0,84$). O teste de

Tabela 2. Valores de média, máximo e mínimo das variáveis avaliadas

Variável	Maximo	Mínimo	Média
Mucosa bucal normal (n = 8)	46,7	24,2	39,4
Hiperkeratose (n = 8)	68,3	26,9	45,3
Atipia epitelial discreta (n = 8)	91,2	28,05	51,05
Atipia epitelial moderada (n = 8)	85,1	28,8	45,07
Atipia epitelial acentuada (n = 8)	87,44	25,3	48,6

Mann-Whitney foi utilizado quando os casos foram agrupados em dois grupos. O primeiro grupo foi formado por casos de hiperkeratose e atipia epitelial discreta (16 casos) e o segundo grupo foi formado por casos de atipia epitelial moderada e acentuada (16 casos). O teste de Mann-Whitney demonstrou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as imunomarcações da proteína hMSH2 nos dois grupos avaliados ($p = 0,91$).

Discussão

Estudo de Vora et al.²⁴ (2003) evidenciou, através de imuno-histoquímica, a importância da proteína BRCA1, cuja relevância em carcinomas de mama e ovário já está bem documentada, na progressão de carcinomas epidermóides de língua ao analisarem a expressão dessa proteína em leucoplasia e em carcinomas localizadas nesse sítio anatômico. Já Uehara et al.²¹ (2005) demonstraram que as expressões das proteínas hMLH1 e hMSH2, com importância bem relatada em carcinoma de cólon, podem ser utilizadas como marcadores prognósticos para carcinomas epidermóides de esôfago²⁵. As conclusões desses trabalhos nos permitiram inferir que proteínas com confirmada participação na patogênese de carcinomas em locais diferentes das regiões de cabeça e pescoço podem participar do processo de aquisição do fenótipo maligno na cavidade bucal. Seguindo essa linha de pensamento e em função de inexistirem trabalhos que relacionassem as proteínas de reparo de base mal pareadas do DNA em leucoplasias bucais, este trabalho propôs analisar, através de uma análise imuno-histoquímica, a participação da proteína hMSH2 em leucoplasias bucais com diferentes graus de atipia.

Nossos resultados sobre o estudo da imunexpressão da proteína MSH2 em leucoplasias bucais, com variados aspectos histológicos, não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas quando foram feitas as comparações entre mucosa bucal normal, hiperkeratose, atipia epitelial discreta, moderada e acentuada. Ao lado disso, foi observado um padrão de imunomarcção da proteína MSH2 semelhan-

te na mucosa bucal normal e nos aspectos histológicos da leucoplasia bucal. Esses resultados sugerem que não há a participação da proteína hMSH2 na progressão para a aquisição do fenótipo maligno das leucoplasias bucais.

É oportuno mencionar que o fato de observarmos imunomarcagem da proteína MSH2 não necessariamente implica que a proteína encontre-se funcional. Alterações genéticas menores são capazes de inativar a função de uma proteína e, ainda assim, permitem que ela seja secretada, de uma forma truncada, em níveis normais. Como nestas condições, a proteína alterada, permanece imunorreativa, as alterações genéticas ocorridas não são detectadas por avaliação imunohistoquímica²⁵⁻²⁷.

Por isso, somente poderemos descartar, de modo definitivo, a participação da proteína hMSH2 na evolução da leucoplasia bucal após uma avaliação de todos os exons e íntrons do gene que codifica essa proteína^{28,29}.

Convém aclarar, também, que a análise da imunoexpressão de todas as outras proteínas que participam do sistema MMR, principalmente hMLH1, seria importante para avaliar a eficiência desta via de reparo em leucoplasias bucais. É útil lembrar que a perda da expressão das proteínas hMLH1 e hMSH2 é responsável por mais de 2/3 das neoplasias que surgem na síndrome hereditária do carcinoma cólon-retal não-polipóide (HNPCC) e que as deficiências nas demais proteínas participantes desta via de reparo do DNA representam juntas somente 10% dos casos³⁰. A proteína hMSH2 interage tanto com a proteína hMSH6, formando heterodímero MutS α , como com a proteína hMSH3, formando heterodímero MutS β . Tais heterodímeros são essenciais para o reconhecimento de danos no DNA, daí a importância da proteína hMSH2 no sistema MMR^{30,31}.

No presente trabalho não avaliamos a imunoexpressão da proteína hMLH1 em função de não conseguirmos alcançar um padrão ideal de imunomarcagem para ela. Acreditamos que problemas inerentes ao anticorpo hMLH1 utilizado concorreram para a deficiência na padronização da marcação, uma vez que utilizamos o protocolo preconizado pelo fabricante.

Recentemente, um estudo não encontrou diferenças morfológicas ou quantitativas na imunoexpressão da proteína hMSH2 nas diferentes gradações histológicas de queilite actínica em relação à mucosa labial normal³². Essa informação associada aos nossos resultados corroboram a assertiva de que diferentes tipos histológicos de neoplasias malignas apresentam patogêneses diferentes³².

Conclusão

A proteína hMSH2, por não estar relacionada aos graus de atipia epitelial encontrados na histopatologia da leucoplasia bucal, não participa do processo de transformação maligna da leucoplasia bucal para carcinoma epidermóide;

porém, mais estudos em biologia molecular são necessários para confirmar esses resultados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e CAPES.

Referências

1. Waal IVD, Schepman KP, Meiji EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.* 1997; 33B:291-301.
2. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited: a clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer.* 1975; 36:1386-92.
3. Banoczy J. Follow-up studies in oral leukoplakia. *J Maxillofac Surg.* 1977; 5 (56):69-75.
4. Cheng LH, Hudson J. Ultrastructural changes in malignant transformation of oral mucosa. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 40:207-12.
5. Klein-Szanto, AJP, Banoczy J, Schroeder HE. Metaplastic conversion of the differentiation pattern in oral epithelia affected by leukoplakia simplex. A stereologic study. *Pathol Eur.* 1976; 11:189-210.
6. Lind PO. Malignant transformation in oral leukoplakia. *Scand J Dent Res.* 1987; 95: 449-55.
7. Scheifele C, Reichart PA. Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? *Oral Oncol.* 2003; 39: 470-5.
8. Okazaki Y, Tanaka Y, Tonogi M, Yamane G. Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* 2002; 38: 562-73.
9. Oliver RJ, Macdonald DG, Felix DH. Aspects of cell proliferation in oral epithelial dysplastic lesions. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29: 49-55.
10. Sudbo J, Reith A. When is an oral leukoplakia pre-malignant? *Oral Oncol.* 2002; 38: 813-4.
11. Jefferies S, Foulkes WD. Genetic Mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2001; 37: 115-26.
12. Lippman S, Hong WK. Molecular Markers of the risk of oral cancer. *N Engl J Med.* 2001; 34: 1323-6.
13. Liu SC, Klein-Szanto AJP. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol.* 2000; 36:145-51.
14. Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H. DNA repair/ pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fall-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res.* 2002; 511:145-78.
15. Nunn J, Naginis S, Risk JM, Prime W, Maloney P, Liloglou T, et al. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and

- hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2003; 39:115-29.
16. Habraken Y, Sung P, Prakash L, Prakash S. Enhancement of MSH2-MSH3-mediated mismatch recognition by the yeast MLH1-PMS1 complex. *Curr Biol.* 1997; 7: 790-7.
 17. Marti MT, Kunz C, Fleck O. DNA Mismatch Repair and Mutation Avoidance Pathways. *J Cell Physiol.* 2002;191(9): 28-41.
 18. Drotschmann K, Shcherbakova VP, Kunkel AT. **Mutator** phenotype due to loss of heterozygosity in diploid yeast strains with mutations in MSH2 and MLH1. *Toxicol Lett.* 2000;112 (113): 239-44.
 19. Perrin J, Parriaux D, Noguchi T, Giovannini MH, Giovannini M, Delpero JR et al. MSH2 and MLH1 immunodetection and the prognosis of colon cancer. *Int J Oncol.* 2001;19: 891-5.
 20. Pyatt RE, Nakagawa H, Hampel H, Sedra M, Fuchik MB, Comeras I. Identification of a deletion in the mismatch repair gene, MSH2, using mouse-human cell hybrids monosomal for chromosome 2. *Clin Genet.* 2003; 63: 215-8.
 21. Uehara H, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Kurokawa T, Murakami S, et al. Deficiency of hMLH1 and hMSH2 Expression Is a Poor Prognostic Factor in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Surg Oncol.* 2005; 92: 109-15.
 22. Paula AMB, Gomez RS. Immunolocalization of p53, glutathione S-transferase and CD57 antigens in oral leukoplakia. *Anticancer Res.* 2001; 21:379-85.
 23. Ayres M, Ayres DL, Santos AS. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. *IOEPA.* 2003; 22:227-64.
 24. Vora HV, Shah NG, Patel DD, Trivetdi TI, Choksi TJ. BRCA1 Expression in leukoplakia and carcinoma of the tongue. *J Surg Oncol.* 2003; 83: 232-40.
 25. Leach FS, Polyak K, Burrellin M, Jonhson KA, Hill D, Dunlop MG, et al. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 1996; 56: 235-40.
 26. Kariola R, Otway R, Lonnqvist KE, Raevaara TE, Macrae F, Vos YJ, et al. Two mismatch repair gene mutations found in colon cancer patient- which one is pathogenic? *Hum Genet.* 2002; 112: 105-9.
 27. Mu David, Mihray T, Duckett DR, Drummond JT, Modrich P, Sancar A. Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 760-9.
 28. O'Brien V, Brown R. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR system. *Carcinogenesis.* 2005, 6: 1-36.
 29. Chung CD, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003; 7: 560-70.
 30. Bernstein C, Bernestein H, Payne CM, Garewal H. DNA repair/ pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res.* 2002; 511: 145-78.
 31. Marti TM, Kunz C, Fleck O. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol.* 2002; 191: 28-41.
 32. Pontes HAR, Aguiar MCF, Mesquita RA, Pontes FSC, Silveira Júnior JB. Imunoexpressão da proteína de reparo hMSH2 em queilite actínica e mucosa labial normal. *Rev Bras Cancerol.* 2005; 51(1): 23-30.