



Avaliação dos Níveis das Proteínas VEGFR2 e MMP9 em Diferentes Gradações da Displasia Epitelial

Emisael Stênio Batista Gomes, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Patrícia Luciana Batista Domingos, Ludmilla Regina de Souza, Lucyana Conceição Farias, Alfredo Maurício Batista de Paula, André Luis Sena Guimarães

INTRODUÇÃO

O câncer oral é um problema de saúde pública em muitas partes do mundo e está associado a significativa morbidade e mortalidade [1]. Embora nem sempre sejam clinicamente aparentes, acredita-se que a maioria dos carcinomas de células escamosas oral (CCEO) sejam precedidos por um período durante o qual o epitélio afetado mostra evidências histológicas de displasia epitelial (DE) [2]. A porcentagem anual de doenças potencialmente malignas (DPM), que evoluem para tumores malignos varia em diferentes partes do mundo devido às variações no uso de tabaco e hábitos alimentares. Os mecanismos moleculares envolvidos na transformação maligna do tecido oral normal e displásico ainda são pouco conhecidos [2]. O estabelecimento, a expansão e a metastatização de CCEO acontece quando os tumores estimulam a produção de seus próprios vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese tumoral [3]. A angiogênese pode alterar os níveis de várias proteínas incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o seu receptor VEGFR2, bem como proteínas de degradação da matriz extracelular, tais como matriz de metaloproteinase-9 (MMP-9) [3]. Surpreendentemente, são encontrados resultados controversos na literatura sobre a atuação do VEGFR2 e da MMP-9 na angiogênese que se estabelece no desenvolvimento e progressão do CCEO [3]. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos moleculares relacionados à carcinogênese de boca, destacando seu desenvolvimento e progressão, é um alvo de grande interesse dos estudiosos de Patologia Bucal. Estudos tem buscado investigar os aspectos genéticos e moleculares envolvidos na progressão do CCEO, com um enfoque na expressão de genes relacionados à angiogênese e aos aspectos clinicopatológicos que envolvem, principalmente, lesões bucais potencialmente cancerizáveis e o CCEO. Considerando estes fatos, o presente estudo teve como objetivo avaliar os níveis das proteínas VEGFR2 e MMP-9 em diferentes gradações da displasia epitelial.

Material e métodos

A. População estudada

Este estudo retrospectivo foi realizado com tecidos obtidos, cirurgicamente, de pacientes provenientes do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Foram analisados 48 pacientes com leucoplasia oral (LO), 20 pacientes com CCEO e 21 espécimes de tecido do grupo controle obtido durante a cirurgia para mucocele oral. Os pacientes foram recrutados dos bancos de dados dos serviços de cirurgia de cabeça e pescoço de Montes Claros, Brasil [1]. Das 48 amostras de LO selecionadas, 35 foram classificadas como displasia leve, 12 como displasia moderada e 1 como displasia severa (Classificação da OMS, concordância intra-observador, $\kappa = 0,877$, $p < 0,001$). Os relatórios clínicos de idade, sexo, tabagismo e consumo de álcool foram obtidos dos prontuários dos pacientes.

B. Coloração imuno-histoquímica

Foram investigadas as expressões teciduais das proteínas VEGFR2 e MMP-9 em cada uma das amostras de tecido através da técnica de imunohistoquímica. Todas as reações foram feitas utilizando-se anticorpos monoclonais, bem como controles positivos e negativos específicos, indicados pelo fabricante dos anticorpos.

C. Contagem das amostras imunomarcadas

A expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores foi avaliada usando um Olympus® microscópio BH2 (10 × 40 × ocular e lentes objetivas) e uma estrutura ocular (área de 0,092 milímetros²). Análises imunohistoquímica de todos os antígenos investigados foram realizadas por determinação da porcentagem de células epiteliais coradas positivamente em todos os campos contados (10 campos para cada exemplar).

D. Análise estatística

Amostras de LO foram agrupadas em duas categorias: displasia leve e displasia moderada / grave. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o pacote estatístico SPSS® (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), versão 13.0 para



Windows ®. P valores <0,05 foram considerados significativos.

Resultados

A. Dados demográficos e clínicos

Dos 20 pacientes com CCEO, 16 eram homens (80%) e quatro eram mulheres (20%). Dezesesseis (80%) eram fumantes, e quatro (20%) não eram usuários de tabaco. Dezoito (90%) pacientes relataram o consumo de álcool, e dois não. Não foi observada qualquer associação entre os níveis de expressão VEGFR2 e MMP9 e os dados clínicos (dados não mostrados).

B. Dados da análise imuno-histoquímica

Todas as amostras de DE apresentaram células basais e suprabasais imunocoradas para as proteínas VEGFR2 e MMP9 (Fig. 1, C-F). A expressão das proteínas VEGFR2 e MMP9 no CCEO foram de 80% e 75%, respectivamente (Fig. 1A). O nível de MMP9 mostrou-se aumentado no CCEO quando comparado com a ED ($p = 0,014$) e o grupo controle ($p = 0,014$) (Fig. 1 e Fig. 2). Não foram observadas diferenças nos níveis de VEGFR2 quando comparou-se CCEO e displasia moderada / grave (Fig. 1 e Fig. 2). Por outro lado, tanto a imunexpressão de VEGFR2 quanto de MMP-9 apresentaram-se aumentadas quando comparou-se a displasia leve e a displasia moderada / grave (Fig. 2A e B).

C. Expressão da proteína correlações

Foi encontrada uma correlação positiva entre VEGFR2 e MMP-9 em amostras de LO ($r = 0,452$, $p = 0,001$). Nenhuma correlação foi encontrada em CCEO ($r = -0,042$, $p = 0,861$).

Discussão

Alguns estudos sugerem que as alterações nos níveis de proteínas podem contribuir para o desenvolvimento de CCEO [4,5,6]. A angiogênese é um dos eventos mais importantes relacionados com a progressão da doença a partir da fase pré-neoplásica de displasia severa para um eventual câncer invasivo [7]. O VEGF é um importante modulador da angiogênese e promove a migração de células endoteliais através do ambiente hipóxico presente no tumor [7]. Os nossos dados indicam que o aumento dos níveis de VEGFR2 está associado a uma pior classificação da ED. Tem sido relatado que a metaloproteinase, MMP-9, é responsável pela clivagem e ativação de certos fatores de crescimento, incluindo VEGF [8]. A capacidade proteolítica de MMPs pode não só criar espaços que permitam a migração de células, mas também produzir fragmentos de substratos específicos com atividades biológicas distintas, regulando a arquitetura do tecido e junções intercelulares [9]. Além disso, as MMPs são capazes de ativar, desativar ou modificar a atividade de várias moléculas de sinalização [10]. No presente estudo, foi observado que os níveis de MMP9 foram maiores no grupo do CCEO, quando comparados com os grupos controle e ED.

Conclusão

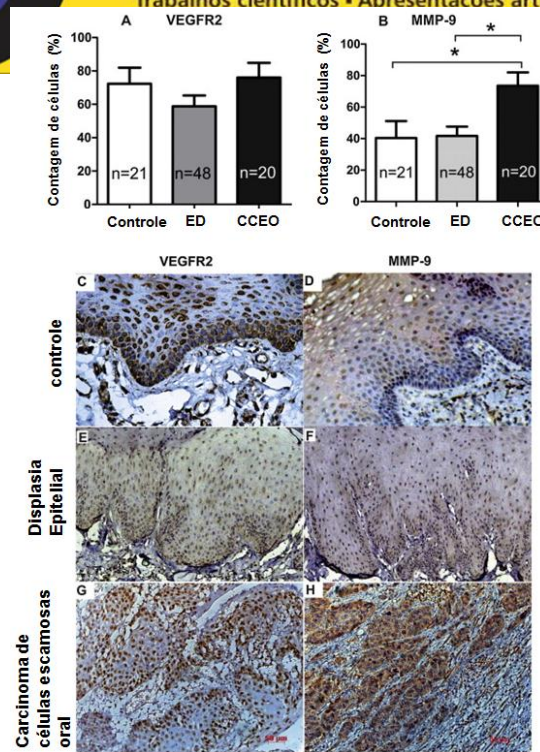
Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo sugerem que a expressão de MMP9 e VEGFR2 está relacionado com ED. Um aumento nos níveis de MMP9 ainda é observado no CCEO. Mais estudos serão necessários para elucidar os mecanismos moleculares que regulam a angiogênese em condições pré-malignas, o que facilitaria o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a prevenção e tratamento desses tumores.

Referências

- [1] A.M. DE PAULA, L.R. SOUZA, L.C. FARIAS, G.T. CORREA, C.A. FRAGA, N.B. ELEUTERIO, A.C. SILVEIRA, F.B. SANTOS, D.S. HAIKAL, A.L. GUIMARAES, R.S. GOMEZ, Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization, *Oral Oncol.* 45 (2009) 777–782.
- [2] S.K. MITHANI, W.K. MYDLARZ, F.L. GRUMBINE, I.M. SMITH, J.A. CALIFANO, Molecular genetics of premalignant oral lesions, *Oral Dis.* 13 (2007) 126–133.
- [3] C. Neuchrist, B.M. Erovic, A. Handisurya, G.E. Steiner, P. Rockwell, C. Gedlicka, M. Burian, Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck, *Laryngoscope* 111 (2001) 1834–1841.
- [4] M.J. ASHAZILA, T.P. KANNAN, R.N. VENKATESH, B.P. HOH, Microsatellite instability and loss of heterozygosity in oral squamous cell carcinoma in Malaysian population, *Oral Oncol.* 47 (2011) 358–364.
- [5] T. FONSECA-SILVA, L.C. FARIAS, C.M. CARDOSO, L.R. SOUZA, C.A. CARVALHO FRAGA, M.V. OLIVEIRA, L.O. BARROS, L.R. ALVES, A.M. DE PAULA, L. MARQUES-SILVA, R.S. GOMEZ, A.L. GUIMARAES, Analysis of p16(CDKN2A) methylation and HPV-16 infection in oral mucosal dysplasia, *Pathobiology* 79 (2012) 94–100.
- [6] W.S. SANTHI, P. SEBASTIAN, B.T. VARGHESE, O. PRAKASH, M.R. PILLAI, NF-kappaB and COX-2 during oral tumorigenesis and in assessment of minimal residual disease in surgical margins, *Exp. Mol. Pathol.* 81 (2006) 123–130.
- [7] L.M. ELLIS, L. ROSEN, M.S. GORDON, Overview of anti-VEGF therapy and angiogenesis. Part 1: angiogenesis inhibition in solid tumor malignancies, *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 4 (Suppl. 1–10) (2006), quz 11–quz 12.
- [8] M. EGEHLAD, Z. WERB, New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 161–174.
- [9] M.S. PEPPER, Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator plasmin systems in angiogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 1104–1117.
- [10] S. HIRATSUKA, K. NAKAMURA, S. IWAI, M. MURAKAMI, T. ITOH, H. KIJIMA, J.M. SHIPLEY, R.M. SENIOR, M. SHIBUYA, MMP9 induction by vascular



endothelial growth factor receptor-1 is
Cancer Cell 2 (2002) 289–300.



involved in lung-specific metastasis,

Figura 1. (A) Análise imuno-histoquímica de VEGFR2 e MMP-9 (B) no grupo controle (mucocele), displasia epitelial (ED) e amostras de carcinoma de células escamosas oral (CCEO). As barras indicam o erro padrão. Análise por testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para análises estatísticas. * Indica que $p < 0,05$. Imunohistoquímica Representação das proteínas VEGFR2 e MMP-9 na mucosa oral normal (B e C), leucoplasia (D e E) e carcinoma epidermóide de boca (F e G). Barra de escala, 50 μ m.

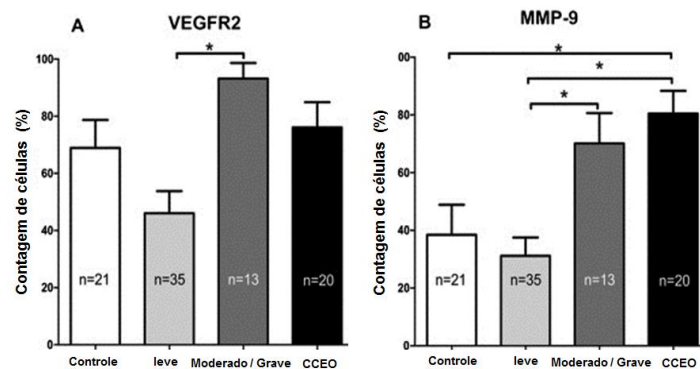


Figura 2. (A) Análise imuno-histoquímica de VEGFR2 e MMP-9 (B) no grupo controle (mucocele), displasia epitelial leve (leve), displasia epitelial moderada / grave e amostras de carcinoma de células escamosas oral (CCEO). As barras indicam o erro padrão. Análise por testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram utilizados para análises estatísticas. * Indica que $p < 0,05$.