

## Leucoplasia: análise imunohistoquímica de 2 casos

### *Leukoplakia: immunohistochemistry analysis of two cases*

Bruno Tochetto Primo<sup>1</sup>, Luciano Mayer<sup>2</sup>, Luciana M. P. Ramalho<sup>3</sup>,  
Marília Gerhardt de Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mestre em CTBMF - ULBRA/RS, <sup>2</sup> Doutorando em CTBMF - PUCRS, <sup>3</sup> PhD, Professora de Odontologia – UFBA, <sup>4</sup> PhD, Pesquisadora, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

#### RESUMO

As leucoplasias apresentam alterações epiteliais citológicas e estruturais denominadas displasias. Tais lesões são frequentemente descritas como lesões com potencial para transformação em carcinomas espinocelulares bucais. A falta de consenso e a subjetividade quanto à classificação das displasias bucais está diretamente relacionada com a variabilidade inter e intra-observador. Face ao exposto, torna-se necessário um sistema fidedigno para a predição da progressão do câncer que viabilize um tratamento cada vez mais precoce. A identificação de eventos genéticos moleculares importantes no desenvolvimento do carcinoma espinocelular bucal tornou possível a detecção de lesões que podem progredir para malignidade. Isto traz a possibilidade de intervir eficientemente naqueles pacientes portadores de lesões precursoras em estágios precoces. **Objetivo:** O objetivo do artigo é discorrer sobre o tema leucoplasia bucal e suas formas de análise imunohistoquímica, além da apresentação de 2 casos clínicos analisados imunohistoquimicamente com o marcador CK 14, MIB, p53, p63 e Rb. **Resultados:** A expressão imunohistoquímica dos anticorpos Ck 14 e RB mostrou-se intensa e difusa em toda a espessura epitelial. As imunomarcações MIB e p53 apresentaram-se pouco intensas e restritas às células da camada basal do epitélio. Observou-se imunomarcagem nuclear intensa e difusa da proteína p63 nas células epiteliais predominantemente na camada basal e células parabasais. **Conclusão:** Com base nos relatos desse trabalho foi possível observar que os marcadores de ciclo celular podem ajudar a identificar a evolução de lesões cancerizáveis da cavidade bucal.

**Palavras-chave:** Leucoplasia Bucal. Neoplasias Bucais. Biomarcadores Farmacológicos. Diagnóstico.

#### ABSTRACT

The leukoplakias show epithelial cytological and structural changes called dysplasias. Such lesions are often described as potential lesions for transformation into oral squamous cell carcinomas. The lack of consensus and subjectivity regarding the classification of oral dysplasia is directly related to the variability of inter-and intra-observer. Given the above, it becomes necessary a reliable system for predicting the progression of cancer which will make possible an increasingly early treatment. The identification of important molecular genetic events in the development of oral squamous cell carcinoma made possible the detection of lesions that can progress to malignancy. This brings the possibility of intervening effectively in those carrier patients of precursor lesions in early stages. **PURPOSE:** The aim of this article is to discuss the issue oral leukoplakia and its ways of immunohistochemical analysis, in addition to the presentation of two clinical cases analyzed immunohistochemically with the markers CK 14, MIB, p53, p63 and Rb. **RESULTS:** The immunohistochemistry aspect from the antibody Ck and RB 14 was shown to be intense and diffuse throughout the epithelial thickness. The MIB and p53 immunoblots were shown rather weak and restricted to the basal cell layer of the epithelium. There was intense and diffuse nuclear immunostaining of p63 protein in epithelial cells predominantly in the basal layer and parabasal cells. **CONCLUSION:** Based on this article reports it was possible to observe that the cell cycle markers may help to identify the progression of precancerous lesions of the oral cavity.

**Keywords:** Leukoplakia, Oral. Mouth Neoplasms. Biomarkers, Pharmacological.

Leukoplakia, Oral. Diagnosis.

#### REVISÃO DA LITERATURA

As displasias bucais comumente são precursoras do câncer de boca. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) não há um consenso claro sobre o sistema de classificação mais clinicamente apropriado para a displasia bucal (1). Muitos fatores desempenham um papel nisso, pois a precisão da classificação depende da qualidade do tecido e do local em que a biópsia é

obtida. A classificação das displasias também é subjetiva, graças à variabilidade inter e intra-observador. Um sistema melhor para a predição de progressão do câncer é, portanto, necessário (2).

Clinicamente, as displasias bucais são representadas com maior frequência como manchas brancas (leucoplasia), ou como manchas vermelhas (eritroplasia), podendo, também, apresentar aspecto heterogêneo (eritroleucoplasia) (3). Uma recente revisão sistemática de 23 estudos estimou a prevalência global de leucoplasia ser entre 1,49% e 2,6% (4).

A OMS (5), em 1978, procurou definir a “leucoplasia bucal” para estabelecer uma forma

Recebido em 17/02/2012; revisado em 30/03/2012.

Correspondência / Correspondence: Marília Gerhardt de Oliveira.  
Av. Coronel Lucas de Oliveira, 1841/203, Petrópolis, Porto Alegre,  
RS, Brasil. 90460-000. Tel. / Fax: +55 51 3330.9545 E-mail:  
gerhardtoliveira@gmail.com

internacionalmente aceita para caracterizar manchas brancas “que carregam um risco aumentado de potencial maligno”. Ao longo de um período de 25 anos a definição da OMS de leucoplasia tem sido citada por pesquisadores e clínicos, e adaptada ou refinada por outros grupos de trabalho e peritos em vários seminários internacionais.

A definição mais aceita na literatura e/ou clinicamente é da OMS, de 2005, que estabelece leucoplasia bucal como: “Mancha branca ou placa que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como qualquer outra doença” (1).

Considerando-se a elevada incidência na população adulta e as altas taxas de mortalidade e morbidade do carcinoma de células escamosas de boca, o diagnóstico precoce é considerado o fator de prognóstico mais favorável para o paciente. Dessa forma, necessita-se de estudos visando o reconhecimento precoce de lesões com maior capacidade de transformação maligna. O objetivo do artigo é discutir sobre o tema leucoplasia bucal e suas formas de análise imunohistoquímica, além da apresentação de 2 casos clínicos analisados imunohistoquimicamente com o marcador CK 14, MIB, p53, p63 e Rb.

## DESCRIÇÃO DOS CASOS

Duas amostras de leucoplasia labial provenientes do Serviço de Patologia Bucal da Universidade Federal da Bahia (UFBA) foram utilizadas neste estudo. Para confirmação diagnóstica e avaliação dos aspectos morfológicos das lesões, foram realizados cortes para coloração hematoxilina-eosina (HE).

Os procedimentos de imunohistoquímica foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Otorrinolaringologia da Universidade de Heidelberg, na Alemanha. Dos tecidos emblocados em parafina foram feitos cortes de 4  $\mu$ m de espessura, que foram estendidos em lâminas de vidro previamente identificadas. Foi utilizada uma lâmina para cada anticorpo. A marcação imunohistoquímica seguiu o seguinte processamento de recuperação antigênica:

1. *Desparafinização*: os cortes foram desparafinizados em duas mudanças de xilol, por 5 minutos cada, sendo então re-hidratados através de álcoois graduados e água deionizada;

2. *Recuperação antigênica*: os cortes foram imersos em 10 mmol/L de tampão citrato e colocados em forno micro-ondas, por 3 minutos a 700 W, seguidos por 10 minutos a 200 W e então esfriados à temperatura ambiente, por 20 minutos e lavados com água deionizada e PBS;

3. *Bloqueio da peroxidase endógena*: os cortes foram imersos em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em PBS por 10 minutos, seguidos de lavagem em PBS;

4. *Incubação no soro de cavalo*: os cortes foram incubados por 1 hora em soro de cavalo, para bloquear ligações a antígenos não específicos;

5. *Incubação dos anticorpos primários*: os cortes foram incubados a 4 °C, durante a noite, com os anticorpos monoclonais anti-p53 e anti-Rb (Tabela 1).

**Tabela 1** - Painel de anticorpos, clones e protocolo de exposição.

Anticorpo	Clone	Fonte	Diluição	Tempo de incubação (min)
Ck 14	LL02	Mono	1:20	60
MIB	MIB-1	Mono	1:50	60
p53	Bp-53-11	Mono	1:8000	60
p63	Ab-1	Mono	1:100	60
Rb	1F8	Mono	1:75	45

6. *Incubação no anticorpo secundário*: após lavagem em PBS, os cortes foram incubados no anticorpo secundário;

7. *Incubação nos reagentes ABC* (Vectastain Eli-te ABC kit, Vector, Burlingame, CA, Estados Unidos): para amplificar a reação, os cortes foram imersos por 30 minutos à temperatura ambiente, no complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase;

8. *Deteção com DAB* (DAB peroxidase substrate kit, Vector, Burlingame, CA, Estados Unidos): após lavagem em PBS, a reação foi revelada com o substrato da enzima junto com o cro-mógeno diaminobenzidina, por aproximadamente 7 minutos;

9. *Contra-coloração*: foi realizada com a imersão dos cortes em 50 mmol de NaHCO<sub>3</sub>, seguida de lavagem rápida em água deionizada e mergulho rápido em hematoxilina. Após, para a remoção do excesso de corante, os cortes receberam lavagem em água corrente por 10 minutos;

10. *Fixação*: os cortes receberam desidratação em álcoois graduados e diafinização com xilol;

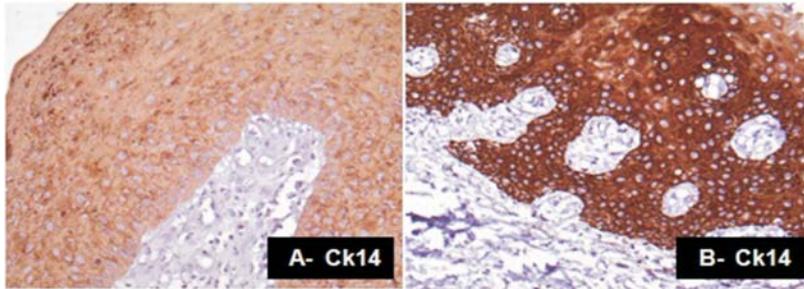
11. *Montagem*: as lâminas foram montadas com Eukitt (O. Kindler GmbH & Co., Freiburg, Alemanha).

## RESULTADOS

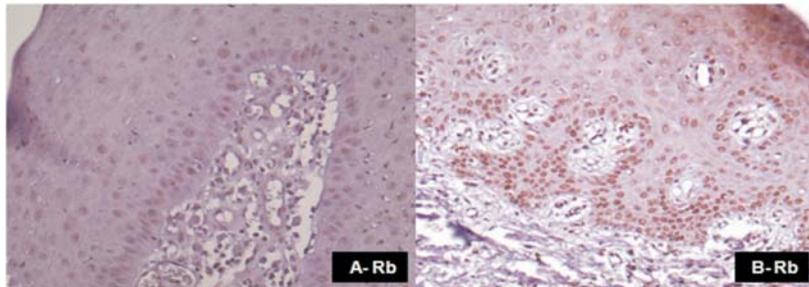
A expressão imunohistoquímica dos anticorpos Ck 14 (Figura 1) e RB (Figura 2) mostrou-se intensa e difusa em toda a espessura epitelial. A imunomarcagem MIB (Figura 3) e a p53 (Figura 4) apresentaram-se pouco intensa e restrita à esparsas células da camada basal do epitélio. Observou-se imunomarcagem nuclear intensa e difusa da proteína p63 (Figura 5) nas células epiteliais predominantemente na camada basal e nas células parabasais.

## DISCUSSÃO

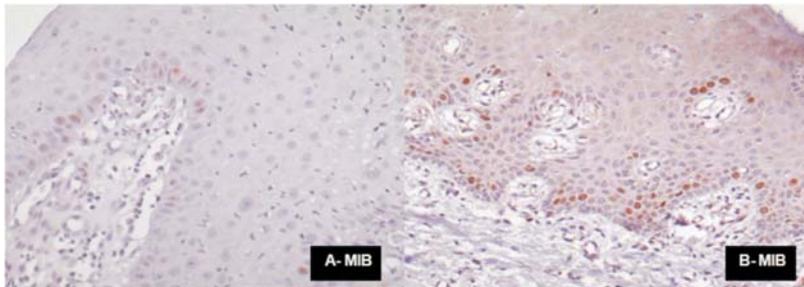
Os critérios para estabelecer o grau de displasia, em lesões da cavidade bucal potencialmente malignas, são baseados na identificação de alterações citológicas e morfológicas, a partir do terço basal do epitélio e ascendente em direção ao terço médio e



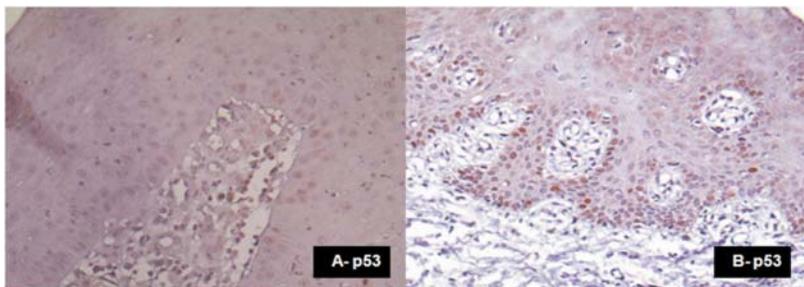
**Figura 1** - A) Expressão imunohistoquímica da CK14 em Displasia Epitelial da Mucosa Bucal. Observa-se intensa e difusa marcação citoplasmática para a CK14 em toda a espessura epitelial (Streptavidina biotina, aumento aprox. 200x). B) Expressão imunohistoquímica da CK14 em Displasia Epitelial da Mucosa Bucal. Observa-se intensa e difusa marcação citoplasmática para a CK14 em toda a espessura epitelial (Streptavidina biotina, aumento aprox. 200x).



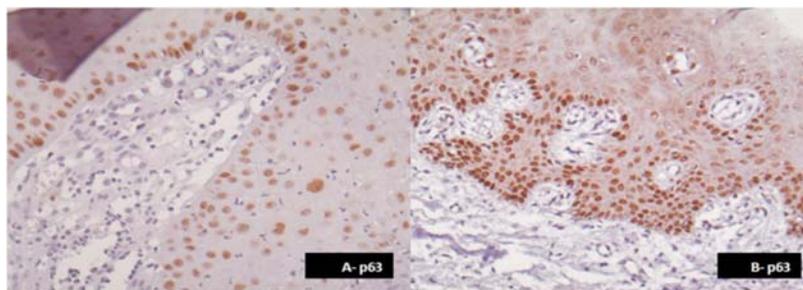
**Figura 2** - A) Expressão imunohistoquímica da pRb em Displasia Epitelial da Mucosa Bucal. Observa-se imunomarcção nuclear pouco intensa e difusa nas células epiteliais (Streptavidina biotina, aumento aprox. 200x). B) Expressão imunohistoquímica da pRb em Displasia Epitelial da Mucosa Bucal. Observa-se imunomarcção nuclear difusa nas células epiteliais (Streptavidina biotina, aumento aprox. 200x).



**Figura 3** - A) Expressão imunohistoquímica da MIB em Displasia Epitelial da Mucosa Bucal. Observa-se imunomarcção nuclear pouco intensa e restrita à esparsas células da camada basal do epitélio (Streptavidina biotina, aumento aprox. 200x). B) Expressão imunohistoquímica da MIB em Displasia Epitelial da Mucosa Bucal. Observa-se imunomarcção nuclear nas células da camada basal do epitélio e em células para basais esparsas (Streptavidina biotina, aumento aprox. 200x).



**Figura 4** - A) Expressão imunohistoquímica da p53 em Displasia Epitelial da Mucosa Bucal. Observa-se imunomarcção nuclear pouco intensa restrita às esparsas células da camada basal do epitélio (Streptavidina biotina, aumento aprox. 200x). B) Expressão imunohistoquímica da p53 em Displasia Epitelial da Mucosa Bucal. Observa-se imunomarcção nuclear pouco intensa predominantemente em células da camada basal do epitélio (Streptavidina biotina, aumento aprox. 200x).



**Figura 5** - A) Expressão imunohistoquímica da p63 em Displasia Epitelial da Mucosa Bucal. Observa-se imunomarcção nuclear difusa nas células epiteliais (Streptavidina biotina, aumento aprox. 200x). B) Expressão imunohistoquímica da p63 em Displasia Epitelial da Mucosa Bucal. Observa-se imunomarcção nuclear intensa e difusa nas células epiteliais predominantemente na camada basal e células parabasais (Streptavidina biotina, aumento aprox. 200x).

superior das camadas epiteliais, sendo que o grau de displasia progride de leve, moderada à grave, respectivamente. No entanto, prever o comportamento das displasias é difícil e as características histológicas nem sempre fornecem informações prognósticas confiáveis (6).

Leucoplasia é um termo clínico utilizado para descrever uma lesão, não tendo uma histologia específica. O exame ainda pode mostrar atrofia ou hiperplasia (acantose) e pode ou não demonstrar displasia epitelial. As lesões leucoplásicas apresentam um padrão de comportamento variável, mas com uma tendência à transformação maligna que pode ser avaliada. A leucoplasia é a lesão cancerizável mais comum da cavidade bucal (7).

As duas formas de classificação clínica da leucoplasia são: homogênea e não homogênea. A distinção destas formas é puramente clínica, baseada na cor e na espessura da superfície, mas tem influência direta sobre o resultado ou o prognóstico. Lesões homogêneas são uniformemente lisas, finas e exibem fendas rasas na superfície de queratina. O risco de transformação maligna é relativamente baixo. A forma não homogênea apresenta um risco muito maior de transformação maligna. As variações não homogêneas incluem:

- salpicada: misturada, branco e vermelho, mas mantendo caráter predominantemente branco;
- nodular: crescimentos de pequenos pólipos, arredondados, vermelhos ou brancos;
- verrucoso: aparência da superfície enrugada ou ondulada (5).

A identificação de eventos genéticos moleculares importantes no desenvolvimento de carcinoma espinocelular bucal tornou possível a detecção de lesões que podem progredir para malignidade. Isto traz a possibilidade de intervir eficientemente naqueles pacientes portadores de lesões precursoras em estágios cada vez mais precoces.

A imunohistoquímica é um método que pode ser aplicado em cortes histológicos e em preparados citológicos. Baseia-se no reconhecimento de determinados antígenos por anticorpos marcados. O princípio de todos os métodos imunohistoquímicos é a identificação de antígenos (Ag) celulares ou teciduais, por uma reação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) *in situ*. Biomarcadores são proteínas ou genes que podem ser diferencialmente expressos em câncer, pré-câncer, e em tecido normal. Esta diferença de expressão pode ser usada para ajudar a prever o resultado clínico do indivíduo ou grupos de pacientes (2).

Nos estudos imunohistoquímicos de leucoplasias o grau de proliferação celular se correlaciona com o grau de displasia. Embora a camada basal do epitélio bucal normal mostre uma atividade proliferativa celular muito baixa, as leucoplasias, mesmo aquelas de baixo grau de displasia, exibem um aumento muito significativo desta atividade. Displasias de alto grau podem ser claramente diferenciadas das displasias de baixo grau, bem como do epitélio bucal normal, pela presença de células em proliferação nos estratos celulares da camada basal.

Avaliando três marcadores diferentes de proliferação celular (MIB, ciclina D1 e CENP-F) pela distribuição da positividade em amostras de epitélio bucal normal e de leucoplasias os autores conseguiram detectar mudanças proliferativas nas amostras de lesões bucais. No entanto, devido à sua coloração intensa e generalizada na camada basal e superficial mostrando clara diferença entre os tecidos normais e anormais, observaram que o MIB forneceu maiores informações quanto ao comportamento das lesões cancerizáveis para a prevenção do câncer, pois se mostrou expresso em quase todos os estágios do ciclo celular e assim puderam detectar as células em divisão celular (8).

Muitas neoplasias malignas são resultado de falhas no controle da proliferação celular, devido a defeitos na regulação do ciclo celular. A proteína p53 é produzida pelo gene supressor de tumor TP53, e é uma das principais proteínas envolvidas na regulação do

ciclo celular, determinando o bloqueio do ciclo no ponto de restrição em final de G1, na presença de DNA danificado. Mutações do gene TP53 são as alterações genéticas mais encontradas no câncer, ocorrendo aproximadamente em 40-50% do câncer bucal (9). Estudos revelam que a mucosa bucal normal é imunonegativa ou apresenta baixos índices de células p53 positivas, sendo estas restritas às camadas basal e parabasal (10). A intensidade de imunomarcção à proteína p53 aumenta de acordo com o grau da displasia em lesões bucais, sendo que a marcação suprabasal é associada com displasias moderada e severa e o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas (10).

A proteína p63 é relacionada aos processos biológicos que contribuem para a homeostase epidérmica, incluindo adesão, proliferação, estratificação e diferenciação celular. Defeitos em quaisquer destes processos podem contribuir para um fenótipo neoplásico (11). A p63 é expressa nas células da camada proliferativa da membrana basal em mucosa bucal normal, onde provavelmente serve para impedir a diferenciação das células basais, assim, ajudando a manter o estrato celular. No entanto, em caso de alterações displásicas, ou seja, da transição de mucosa bucal normal para displasia epitelial, queratinócitos displásicos acima da camada basal podem sofrer processo de diferenciação, sendo assim, aumentando a expressão da proteína p63. Por essa presunção, pode-se explicar porque existe aumento da imunomarcção da p63 na progressão das lesões displásicas (12). Avaliando carcinomas espinocelulares bucais foi observado que a imunomarcção elevada da proteína p63 estava associada a fenótipo tumoral mais agressivo e prognóstico ruim (13).

Outra forma de regulação do ciclo celular é a proteína do retinoblastoma (Rb), que tem sua expressão alterada em muitos carcinomas espinocelulares, mas, sua importância na progressão tumoral permanece indefinida (14).

O padrão de marcação das citoqueratinas nas células epiteliais reflete o grau de diferenciação tecidual. Assim, podem ser observadas expressões aberrantes durante o processo de carcinogênese ou até mesmo ausência de expressão de algumas citoqueratinas. Em outras palavras, a expressão dos filamentos intermediários de citoqueratinas pode ser modulada por mudanças na proliferação e diferenciação das células, sendo que a expressão dessas células pode ou não ser alterada depois da transformação maligna (15). A expressão de Ck14 na fibrose *submucosa* bucal (condição pré-maligna) ocorre semelhante ao observado em lesões de carcinoma espinocelular bucal, sugerindo um possível potencial para ser usada como imunomarcador de transformação maligna em lesões bucais (16).

## CONCLUSÃO

Com base nos relatos desse trabalho foi possível observar que os marcadores de ciclo celular podem ajudar a identificar a evolução de lesões cancerizáveis da cavidade bucal.

## REFERÊNCIAS

1. BARNES, JOHN. et al. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. **World Health Organization Classification of Tumours.**, IARC Press, Lyon, 2005.
2. NANKIVELL, PAUL; MEHANNA, HISHAN. Oral dysplasia: biomarkers, treatment, and follow-up. **Curr. Oncol. Rep.**, Philadelphia, v. 13, n. 2, p. 145-152, Apr. 2011.
3. VAN DER WAAL, ISAAC. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 423-425, Jun. 2010.
4. PETTI, STEFANO. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 770-780, Dec. 2003.
5. WARNAKULASURIYA, S; JOHNSON, NW; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 36, n. 10, p. 575-580, Nov. 2007.
6. VERED, M; ALLON, I; DAYAN, D. Maspín, p53, p63, and Ki-67 in epithelial lesions of the tongue: from hyperplasia through dysplasia to carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 38, n. 3, p. 314-320, Mar. 2009.
7. TAOUDI BENCHEKROUN, M. et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in the risk of oral cancer. **Cancer Prev. Res. (Phila)**, Philadelphia, v. 3, n. 3, p. 800-809, Jul. 2010.
8. LIU, SHAO CHEN; KLEIN-SZANTO, ANDRÉS J. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 145-151, Mar. 2000.
9. NYLANDER, K; DABELSTEEN, E; HALL, P. A. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, n. 9, p. 413-424, Oct 2000.
10. FAN, GK. et al. Immunohistochemical analysis of P57(kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 147-153, Feb. 2006.
11. KING, K. E. Et al. Unique domain functions of p63 isoforms that differentially regulate distinct aspects of epidermal homeostasis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 53-63, Jun. 2010.
12. CHEN, YK; HSUE, SS; LIN, M. Expression of p63 protein and mRNA in oral epithelial dysplasia. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 34, n. 4, p. 232-239, Apr. 2005.
13. LO MUZIO; L. et al. P63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 36, n. 2, p. 187-194, Feb. 2005.
14. MARTÍNEZ, A. et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 34, n. 5, p. 257-262, May. 2005.
15. VAIDYA, M. M. et al. Cytokeratin expression in squamous cell carcinomas of the tongue and alveolar mucosa. **Eur. J. Cancer. Part B**, v. 32B, n. 5, p. 333-336, Sep. 1996.
16. RANGANATHAN, K. et al. Cytokeratin expression in oral submucous fibrosis—an immunohistochemical study. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 35, n. 1, p. 25-32, Jan. 2006.