

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MASTÓCITOS (TRIPTASE POSITIVOS) PELO MÉTODO DA STREPTAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE (IMUNOISTOQUÍMICA) EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES E LESÕES CANCERIZÁVEIS DA BOCA

OLIVEIRA-NETO, Helenisa Helena¹; **ALENCAR**, Rita de Cássia Gonçalves²; **SILVA**, Tarcília Aparecida³; **MENDONÇA**, Elismauro Francisco⁴; **BATISTA**, Aline Carvalho⁵

Palavras-chave: Mastócitos, Triptase, Carcinoma espinocelular, Lesões cancerizáveis

1. INTRODUÇÃO (Justificativa e objetivos)

Diversas células e substâncias podem estar envolvidas na progressão ou defesa tumoral (ABBAS et al, 2000). Dentre essas células estão os mastócitos (MCs), os quais participam ativamente na resposta imune e inflamatória de uma série de doenças da boca, sintetizando um grande número de substâncias ativas (BATISTA et al, 2005, RODINI et al, 2004). Dentre as inúmeras substâncias sintetizadas pelos mastócitos estão substâncias angiogênicas (BLAIR et al, 1997; SAWATSUBASHI et al, 2000; METCALFE et al, 1997), citocinas pró-inflamatórias/imunorregulatórias METCALFE et al, 1997; ABBAS et al, (2000) e quimiocinas (ABBAS et al, 2000). Todavia, o papel dos MCs em tumores, especialmente da boca, ainda não foi definido, sendo correlacionado tanto com a defesa anti-tumoral (SAND L et al, 2002) quanto com a progressão do tumor (IAMAROON et al, 2003). Desta maneira, o presente estudo teve como objetivos: 1- identificar/quantificar os MCs em lesões cancerizáveis (leucoplasias) com e sem displasia epitelial (LC/SD) – grupo I, em carcinomas espinocelulares de boca (CEC) – grupo II e em mucosa bucal clinicamente saudável (Controle) – grupo III; 2- comparar duas técnicas para identificação de mastócitos: a técnica histoquímica do Azul de Toluidina (AT) (Subprojeto de PIBIC/2004-2005) com a técnica de imunoistoquímica do tipo imunoperoxidase proposta no presente subprojeto.

2. METODOLOGIA

2.1-Amostragem: Foram selecionados 26 casos de LC/SD e 12 casos Controles dos arquivos de blocos do Laboratório de Patologia Bucal da FO/UFG e 38 casos de CEC de boca (assoalho de boca, língua, gengiva/rebordo alveolar palato e mucosa jugal) do Serviço de Anatomia-patológica do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer de Goiás (HAJ/ACCG).

2.2-Identificação de mastócitos: Os MCs foram identificados pelo método da streptavidina-biotina-peroxidase (imunoistoquímica), com a utilização de anticorpos monoclonais de camundongo anti-triptase de MCs humanos (M7052, DAKO, Glostrup-Denmark), a uma diluição de 1:2000.

2.3-Contagem dos mastócitos triptase⁺ por mm² e análise estatística: O número de MCs triptase positivos (triptase⁺) foi quantificado por meio de análise morfométrica utilizando microscópio óptico, contendo um retículo de integração em rede quadrada (Carl Zeiss). Em cada amostra, os MCs foram quantificados na região subepitelial (LC/SD e

Controle) e no fronte de invasão tumoral (CEC) utilizando um aumento de 40x em 10 campos microscópicos consecutivos. No aumento de 40x a área do retículo é igual a $0,0961\text{mm}^2$. Registramos o número total de MCs encontrados na área percorrida e dividimos este número por $0,961\text{mm}^2$, obtendo-se a quantidade de células por mm^2 . Os resultados dos grupos avaliados foram expressos como média do número de MCs por $\text{mm}^2 \pm$ o respectivo desvio padrão. Os dados obtidos foram trabalhados estatisticamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Resultados: O número médio de MCs triptase⁺ por $\text{mm}^2 \pm$ e o desvio padrão no grupo de CEC foi de $104,73 \pm 40,13 \text{ mm}^2$, no grupo das LC/SD foi de $120,84 \pm 53,07 \text{ mm}^2$ e no grupo representado pelo controle foi de $165,83 \pm 62,96 \text{ mm}^2$. Observou-se, desta maneira, que a densidade de MCs triptase⁺ foi menor nas amostras de CEC e de LC/SD quando comparadas com as amostras de mucosa bucal clinicamente saudável (controle), e essa diferença foi estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney, $P=0,0003$ e $P=0,03$, respectivamente) (Figura 1).

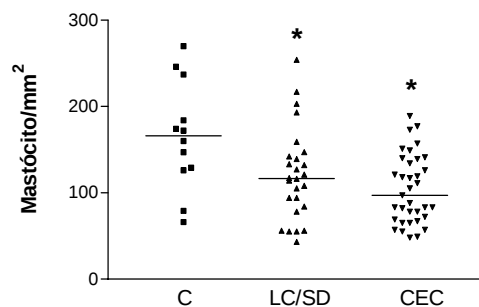


Figura 1: Número de mastócitos triptase positivos por mm^2 nas amostras de carcinomas espinocelulares – $n=38$, leucoplasias sem/com displasia – $n=26$ e nas amostras de mucosa bucal clinicamente saudável (controle) – $n=12$. *representa diferença estatisticamente significativa quando comparado com o Controle (Teste Mann-Whitney com $P<0.05$).

Adicionalmente, a análise estatística dos resultados revelou que o número de MCs triptase⁺ foi significativamente maior que o número de células coradas pelo AT nos grupos de mucosa bucal clinicamente saudável (controle) e de LC/SD (Teste Mann-Whitney, $P<0,001$ e $P<0,01$, respectivamente).

3.2-Discussão: Neste trabalho, encontramos um número significativamente menor de MCs triptase⁺ nas amostras de CEC e LC/SD quando comparadas com o grupo controle. Prévios estudos demonstraram achados semelhantes (LATCHER et al, 1995; SAND et al, 2002). Latcher et al (1995), encontraram um número de MCs significativamente mais baixo em desordens pré-malignas e neoplasias malignas em lesões colo-retais se comparado com tecido colo-retal normal (LATCHER et al, 1995). Em 2002, Sand et al, em estudo experimental realizado em ratos, observaram que a quantidade de MCs em lábio inferior diminuiu significativamente em animais expostos a carcinógenos químicos e, constataram também, o desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço nesses mesmos animais (SAND et al, 2002). Em contrapartida, recente estudo realizado em humanos, utilizando a técnica de imunoistoquímica (IQ), a mesma empregada neste estudo, demonstrou um aumento significativo na densidade de MCs e de pequenos vasos sanguíneos em amostras de CEC, displasias cancerizáveis e lesões hiperqueratóticas da boca se comparado com mucosa bucal clinicamente saudável (IAMAROON et al, 2003). Em relação à metodologia empregada, nossos resultados revelaram que a técnica de imunoistoquímica (IQ), utilizando anticorpos anti-triptase de MCs, é mais específica que a do AT. Em concordância com esses achados, alguns estudos têm demonstrado que o método de IQ, com a utilização

de anticorpos anti-triptase de MCs, é mais específico que a identificação dos grânulos metacromáticos através da coloração histoquímica do AT (BATISTA et al, 2005).

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que há uma diminuição significativa na densidade de MCs triptase+ no CEC e LC/SD de boca considerando amostras controle. A deficiência de MCs no CEC pode refletir numa importante modificação do microambiente tumoral durante a carcinogênese, que pode permitir a proliferação das células epiteliais neoplásicas. Todavia, mais estudos serão necessários para validar essa hipótese. Concluimos, ainda, que a técnica de IQ apresenta-se mais específica que a técnica histoquímica do AT para identificação de MCs humanos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Effector mechanisms of immune responses. In: ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Cellular and Molecular Immunology*. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 235-339.
- 2-BATISTA, A.; RODINI, C.O.; LARA, V.S. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Disease*, v. 11, n. 4, p. 249-254, 2005.
- 3-BLAIR, R.J. et al. Human mast cells stimulate vascular tube formation. *J Clin Invest*, v. 99, p. 2691-2700, 1997.
- 4-IAMAROON, A. et al. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med*, v. 32, p. 195-199, 2002.
- 5-LACHTER, J.; STAIN, M.; LICHTIG, C.; EIDELMAN, S.; MUNICHOR, M. Mast cells in colorectal neoplasias and pre-malignant disorders. *Dis Colon Rectum*, v. 38, p. 290-293, 1993.
- 6-METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. *Physiol Rev*, v. 77, n. 4, p. 1033-1079, 1997.
- 7-RODINI, C.O.; BATISTA A.C.; LARA V.S. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 97, n. 1, p. 59-63, 2004.
- 8-SAND, L. et al. Effects of long-term administration of cancer-promoting substances on oral subepithelial mast cells in rat. *Anticancer Research*, v. 22, p. 2623-2628, 2002.
- 9-SAWATSUBASHI, M. et al. Association of vascular endothelial growth factor and mast cells with angiogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*, v. 436, p. 243-248, 2000.

Fonte de Financiamento—Projetos CNPq -processos nº 620013/2004-4 e 401305/2005-8.

¹Aluna do Programa Voluntário de Iniciação Científica (PIVIC). Disciplina de Patologia Geral e Bucal. Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO-UFG) helenisahelena@hotmail.com

²Pesquisadora Participante, Membro do Serviço de Anatomia-Patológica do Hospital Araújo Jorge da ACCG, Goiânia-GO.

³Pesquisadora Participante, Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG)

⁴Pesquisador Participante, Disciplina de Patologia Geral e Bucal da FO-UFG.

⁵Orientadora, Disciplina de Patologia Geral e Bucal da FO-UFG— ali.caba@uol.com.br