

## PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DO MARCADOR TUMORAL MAGE EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES ORAIS E MESTÁSTASES CERVICAIS – UM ESTUDO DE CASOS

CÁCIA SIGNORI<sup>1</sup>; YASSAMIN MONA MAJZOOB<sup>2</sup>; DEISE DE AVILA SILVA<sup>2</sup>;  
ANA PAULA NEUTZLING GOMES<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [caciasignori@gmail.com](mailto:caciasignori@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [apngomes@gmail.com](mailto:apngomes@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) representa uma parcela aproximada de 94% de todas as neoplasias malignas orais. Apresenta comportamento biológico variável, já que existem tumores em estágios iniciais que se manifestam de forma agressiva, com a presença de metástase regional precoce e caracterizados por baixa sobrevida, e em contrapartida há outras neoplasias que, mesmo em fases evoluídas da doença, podem demorar a causar metástase (KADEMANI et. al., 2005).

O prognóstico do carcinoma espinocelular oral ainda é pobre, justificando a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas e estratégias que permitam o diagnóstico precoce, e um prognóstico e tratamentos adequados. Os antígenos específicos de tumores estão incluídos em uma dessas estratégias (SCANLAN et al., 2002).

Os antígenos MAGE-A não são expressos em tecidos saudáveis, com exceção da placenta, testículos e tecidos fetais (MULLER-RICHTER et al., 2008). Paralelamente a isso, há vários relatos de sua expressão em diferentes tipos tumorais, como câncer cervical, melanoma e carcinoma espinocelular da cavidade bucal (SHARMA et al., 2006).

A utilização desse marcador tumoral poderá constituir uma nova ferramenta para o enriquecimento diagnóstico, para o cálculo do risco individual, e até poderá proporcionar um alvo para a imunoterapia seletiva, ganhos esses atribuídos à sua expressão restrita às células tumorais (MULLER-RICHTER, 2009).

Este trabalho investigou a expressão imuno-histoquímica do anticorpo MAGE (Y-18) em carcinomas espinocelulares primários com e sem metástases cervicais, bem como nos linfonodos metastáticos.

### 2. METODOLOGIA

Este trabalho foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas obtendo aprovação para sua realização sob o parecer OF.51/12.

Foram selecionados dos Arquivos do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas 10 casos de carcinoma espinocelular oral, cujo tratamento cirúrgico envolveu a ressecção de linfonodos cervicais. Essa amostra foi constituída por cinco casos de lesões primárias de carcinoma espinocelular sem envolvimento linfonodal e

cinco casos de lesões primárias com diagnóstico de linfonodos regionais metastáticos.

Os espécimens utilizados foram rotineiramente fixados em formol 10% e incluídos em parafina. As lâminas referentes aos casos selecionados e coradas pelo método da hematoxilina e eosina (H & E) foram submetidas a estudo morfológico em microscopia de luz por um patologista experiente, para confirmação do diagnóstico previamente obtido e determinação do grau de diferenciação dos tumores.

Todos os dez casos de tumores primários, somados aos linfonodos histologicamente positivos para metástase, foram submetidos à técnica imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal MAGE-A (Y-18).

A avaliação das proteínas MAGE foi realizada com o auxílio da técnica imuno-histoquímica pelo método streptavidina-biotina (SABC, do inglês Streptavidina-Biotin Complex). A reação foi realizada sobre secções teciduais, estendidas em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas. Inicialmente, os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol, passaram pelo processo de reidratação em cadeia descendente de etanol e foram imersos em solução de hidróxido de amônia a 10% para remoção do pigmento formólico.

As secções teciduais foram então submetidas ao tratamento para recuperação antigênica, e a seguir foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena tecidual.

Após, foram incubadas com o anticorpo primário MAGE (Y-18) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Europe), e lavadas com tampão Tris-HCl (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Os cortes foram então incubados com o anticorpo secundário Rabbit anti-Goat IgG (Pierce® - Rockford, IL USA), e logo após prosseguiu-se a incubação com o complexo terciário (Vectastain ABC Kit – Vector Laboratories, Inc. CA USA). A revelação da reação foi realizada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diamino-benzidina, DakoCytomation, Inc. 6392 Via Real Carpinteria, California 93013 USA). O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário e como controle positivo foi usado um carcinoma oral indiferenciado.

A expressão imuno-histoquímica positiva de MAGE (Y-18) foi determinada por meio de análise em microscopia de luz e foi definida por um padrão de coloração citoplasmático nos tumores primários e metástases cervicais.

Para a avaliação da marcação imuno-histoquímica, um sistema subjetivo de pontuação foi utilizado considerando a homogeneidade da reação na região mais marcada, baseado na quantidade de células que apresentaram marcação (escores: 0 - negativo; 1 – fracamente positivo; 2 – moderadamente positivo; 3 – fortemente positivo).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra de nosso estudo incluiu 10 pacientes (9 homens e 1 mulher), de idades variando entre 43 a 81 anos (média: 60,9) com diagnóstico histológico de carcinoma espinocelular de cavidade oral. Os sítios primários de maior acometimento foram representados pela língua, seguida do assoalho bucal. De acordo com o estadiamento tumoral (Sistema TNM), realizado previamente ao diagnóstico definitivo, 8 pacientes apresentavam tumores com mais de 2cm, mas que não invadiam estruturas adjacentes (T2=6; T3=2). Em 2 pacientes os tumores foram classificados como T4, apresentando invasão à estruturas vizinhas (1 com metástase). O status linfonodal previamente à cirurgia foi definido como positivo para metástase em 3 dos 10 casos, sendo confirmado pelo exame anátomo-

patológico. Em 2 pacientes com pescoço clinicamente negativo foi observada a disseminação metastática cervical, sendo que estas 2 lesões apresentavam mais de 4cm (T3).

Os fatores de risco, fumo e/ou álcool, estiveram presentes na quase totalidade dos casos, exceto na única paciente do sexo feminino. O fumo se manteve de forma predominante em 90% dos casos, e esteve associado ao álcool em 20%. O álcool não foi relatado de maneira isolada.

Tabela 1 – Expressão do Antígeno Tumoral MAGE (Y-18) em tumores primários, com e sem envolvimento linfonodal, relacionado ao grau de diferenciação histológica das lesões de carcinoma espinocelular.

Casos	Tumor Primário SEM Metástase		Tumor Primário COM Metástase						
	Grau	T	Casos	Grau	T	N1	N2	N3	N4
<b>Caso 1</b>	Grau III	+	<b>Caso 6</b>	Grau IV	+	+	x	x	x
<b>Caso 2</b>	Grau III	+	<b>Caso 7</b>	Grau II	+	+	+	x	x
<b>Caso 3</b>	Grau III	+	<b>Caso 8</b>	Grau III	+	+	+	+	x
<b>Caso 4</b>	Grau III	+	<b>Caso 9</b>	Grau IV	-	-	x	x	x
<b>Caso 5</b>	Grau II	-	<b>Caso 10</b>	Grau I	+	x	+	+	+

Tumor (T), Nível dos linfonodos (N), marcação positiva (+), marcação negativa (-), linfonodo não comprometido (X).

Na Tabela 1, em relação ao grau de diferenciação e expressão do antígeno tumoral MAGE (Y-18) em tumores primários com e sem envolvimento linfonodal, observou-se que a marcação imuno-histoquímica não teve relação com o grau histológico, já que tivemos um tumor Grau I positivo para o MAGE e um tumor Grau IV negativo para este antígeno. Assim como em nosso trabalho, diversas pesquisas não encontraram uma correlação entre a marcação positiva do MAGE e o grau histológico do tumor ou TNM (PASTORCIC-GRGIC et al., 2009; ATANACKOVIC et al., 2006; KIENSTRA et al., 2003; HAIER et al., 2006).

Em nosso trabalho, como já era esperado em função dos resultados da literatura, o percentual de casos de CECs positivos também foi alto. Oito dos 10 casos de CEC avaliados expressaram o MAGE (Y-18), 4/5 de cada grupo estudado. Dessa forma, não conseguimos associar a positividade para este antígeno com a presença ou ausência de disseminação metastática, o que nos leva a sugerir, apesar do pequeno número de casos estudados, que a utilidade deste antígeno como marcador prognóstico é limitada, concordando com a maioria dos estudos publicados.

Quando consideramos o padrão de marcação no tumor primário e na lesão metastática, nosso estudo demonstrou associação positiva entre a marcação imuno-histoquímica do MAGE nos tumores primários e em suas metástases. Entretanto, a expressão ocorre com intensidade variada, assim como vislumbrado pelo estudo de Figueiredo et al. (2006).

#### 4. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou frequente expressão dos membros da família MAGE-A em carcinomas espinocelulares orais com e sem metástases cervicais, assim como nos tumores metastáticos, sendo que tal expressão não esteve relacionada ao grau de diferenciação histológica, como também não mostrou associação com o potencial metastático.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATANACKOVIC, D. et al. Expression of Cancer Testis Antigens as Possible Targets for Antigen-Specific Immunotherapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Biology & Therapy**, v.5, n.9, p.1218-1225, 2006.
- FIGUEIREDO, D. L. A.; MAMEDE, R. C. M.; ZAGO, M. A. Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas. **Head & Neck**, v.28, n.7, p.614-619, 2006.
- HAIER, J. et al. Expression of MAGE-A cancer/testis antigens in esophageal squamous cell carcinomas. **Anticancer Research**, v.26, n.3B, p.2281-2287, 2006.
- KADEMANI, D. et al. Prognostic Factors in Intraoral Squamous Cell Carcinoma: The Influence of Histologic Grade. **J Oral Maxillofac Surg**, v.63, p.1599-1605, 2005.
- KIENSTRA, M. A. et al. Identification of NY-ESO-1, MAGE-1 e MAGE-3 in head and neck squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v.25, n.6, p.457-463, 2003.
- MÜLLER-RICHTER, D. A. et al. Driemel O Different expression of MAGE-A-antigens in foetal and adult keratinocyte cell lines. **Oral Oncol**, v.44, n.7, p.628-33, 2008.
- MÜLLER-RICHTER, D. A. et al. MAGE-A antigens in patients with primary oral squamous cell carcinoma. **Clinical Oral Investigations**, v.14, n.3, p.291-296, 2009.
- PASTORCIC-GRGIC, M. et al. Prognostic value of MAGE-A and NY-ESO-1 expression in Pharyngeal Cancer. **HEAD & NECK**, v.32, n.9, p.1178-84, 2009.
- SCANLAN, M. J. et al. Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis. **Int J Cancer**, v.98, p.485-92, 2002.
- SHARMA, P. et al. Cancer-Testis Antigens: Expression and Correlation with Survival in Human Urothelial Carcinoma. **Clin Cancer Res**, v.12, n.18, p.5442-5447, 2006.