



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

GABRIELA TAVARES SILVA

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E DISTRIBUIÇÃO TISSULAR DO VÍRUS
EPSTEIN-BARR (EBV) NO CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL.**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

Gabriela Tavares Silva

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA E DISTRIBUIÇÃO TISSULAR
DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) NO CARCINOMA ESPINOCELULAR
ORAL.**

Trabalho de conclusão de Curso (TCC) apresentado
ao Conselho de Curso de Odontologia da Faculdade
de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jorge Esquiche León, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

1. Resumo	5
2. Introdução	6
3. Objetivos.....	7
4. Metodologia.....	7
5. Resultados	12
6. Discussão	13
7. Conclusões	14
 REFERÊNCIAS.....	 14

1. RESUMO

O VEB é um membro da família Herpesviridae, da subfamília gammaherpesviridae, e está composto por uma cadeia linear e dupla de DNA contido em um nucleocapsídeo icosaédrico de cerca de 100 nm de diâmetro, cercado por um tegumento protéico e um envelope de bicamada lipídica derivado da membrana nuclear interna das células hospedeiras. O único hospedeiro natural para o VEB é o ser humano e as células alvo para o VEB são principalmente os linfócitos B e células epiteliais.

O ciclo de vida está dividido em fase lítica e latente (Slots et al., 2006). O VEB é um dos agentes causadores da mononucleose infecciosa e infecta cerca de 95% da população mundial adulta de forma assintomática, e no seu estado latente pode evoluir estando associado com vários tipos de linfomas de células B, CEC oral, CEC de nasofaringe (alta incidência), câncer gástrico e linfoma de Burkitt (Dolcetti & Masucci, 2003). Além de infectar os linfócitos B, o VEB também pode se alojar em células epiteliais da orofaringe e de glândulas salivares, e periodicamente se replicam na orofaringe ou no epitélio de glândulas salivares, sendo depois excretado na saliva.

O ciclo de vida do VEB envolve dois compartimentos: o sangue periférico e a cavidade oral. Os linfócitos B infectados presentes no periodonto e nas tonsilas desempenham um papel importante na liberação do vírus na saliva. Apesar da capacidade inflamatória e indução de crescimento e transformação do VEB, a maioria dos indivíduos infectados controla o vírus eficientemente e permanecem livres de doenças associadas ao VEB.

Palavras chave: Vírus Epstein-Barr; carcinoma espinocelular; câncer oral; hibridização in situ; EBER1/2.

2- Introdução

O VEB é um membro da família Herpesviridae, da subfamília gammaherpesviridae, e está composto por uma cadeia linear e dupla de DNA contido em um nucleocapsídeo icosaédrico de cerca de 100 nm de diâmetro, cercado por um tegumento protéico e um envelope de bicamada lipídica derivado da membrana nuclear interna das células hospedeiras. O único hospedeiro natural para o VEB é o ser humano e as células alvo para o VEB são principalmente os linfócitos B e células epiteliais. O ciclo de vida está dividido em fase lítica e latente (Slots et al., 2006). O VEB é um dos agentes causadores da mononucleose infecciosa e infecta cerca de 95% da população mundial adulta de forma assintomática, e no seu estado latente pode evoluir estando associado com vários tipos de linfomas de células B, CEC oral, CEC de nasofaringe (alta incidência), câncer gástrico e linfoma de Burkitt (Dolcetti & Masucci, 2003). Além de infectar os linfócitos B, o VEB também pode se alojar em células epiteliais da orofaringe e de glândulas salivares, e periodicamente se replicam na orofaringe ou no epitélio de glândulas salivares, sendo depois excretado na saliva. O ciclo de vida do VEB envolve dois compartimentos: o sangue periférico e a cavidade oral. Os linfócitos B infectados presentes no periodonto e nas tonsilas desempenham um papel importante na liberação do vírus na saliva. Apesar da capacidade inflamatória e indução de crescimento e transformação do VEB, a maioria dos indivíduos infectados controla o vírus eficientemente e permanecem livres de doenças associadas ao VEB.

O câncer de boca é o sexto tipo de câncer com maior taxa de mortalidade. No Brasil, a incidência do câncer bucal é considerada uma das mais altas do mundo, estando entre o sexto tipo de câncer mais comum que acometem o sexo masculino e entre o oitavo mais comum que atinge o sexo feminino, sendo considerado o câncer mais comum da região de cabeça e pescoço, excluindo-se o câncer de pele (Franco et al., 1989). Os CECs orais são os mais comuns, correspondendo a mais de 90% de todos os cânceres de cabeça e pescoço. O CEC tipicamente afeta homens na sexta década de vida, e os fatores de risco inclui o uso de tabaco, consumo de álcool, radiação e irritantes crônicos. Além desses fatores, a associação com alguns tipos de vírus oncogênicos, como o VEB, também podem contribuir para a carcinogênese oral (Al Moustafa et al., 2009; Shah et al., 2009). Apesar de o VEB ser um agente com grande potencial oncogênico e estar frequentemente presente na cavidade bucal, apenas uma pequena porcentagem de CEC oral apresentam associação ao VEB. O VEB age provocando mudanças somáticas nas células através de interações genéticas e epigenéticas (Takacs et al., 2010).

Um subtipo do CEC, o carcinoma linfoepitelial (CLE), apresenta frequente associação com o VEB. O CLE de boca e orofaringe tem uma tendência de 70% à metástase e 16,6% de espalhar-se localmente. Em contraste, nenhum dos CLEs nasais e paranasais teve metástase, mas 60% espalhou-se localmente. O tratamento de CLE durante a última década, em grande parte consistiu-se de cirurgia em associação com radioterapia ou radio/quimioterapia. A taxa de mortalidade dos pacientes

com CLE, se tratados adequadamente, é baixa. No entanto, ainda há necessidade de utilizar técnicas sensíveis como a hibridização *in situ* para conhecer o perfil de CECs orais VEB positivos, outros que CLE, para poder definir o perfil desta população e estabelecer correlações clínico patológicas com implicações terapêuticas e prognósticas (Tsang et al., 2005).

3- Objetivos

O presente estudo teve como objetivo analisar, através da técnica imunistoquímica, a presença e localização do VEB em biópsias de pacientes diagnosticados com CEC (n=30) na cavidade oral, visando compreender seus mecanismos tumorigênicos.

4- Metodologia

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microscopia e Histopatologia (DESCOL, FORP-USP). O estudo foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 60786216.8.0000.5440). Este trabalho faz parte do projeto de pesquisa intitulado “Estudo Clinicopatológico, Imunistoquímico, Hibridização *in situ* e Genética Molecular em Carcinomas Espinocelulares da Região de Cabeça e Pescoço”.

4.1 Procedimentos laboratoriais:

A Seleção da amostra:

Foi realizado um estudo retrospectivo, cujos dados clínicos foram obtidos dos formulários clínicos de encaminhamento das biópsias ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Foram selecionados 30 casos diagnosticados como CEC (n=30), bem como avaliado histopatologicamente os mesmos em lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

Destes 30 casos, 22 corresponderam ao gênero masculino e 08 ao gênero feminino. Foram obtidos 46 cilindros de tecidos através da técnica “*Tissue Microarray*” (TMA). Todos os casos foram compatíveis com CEC. Seis cilindros de TMA não apresentaram material suficiente para análise imunistoquímica, sendo excluídos do presente projeto de pesquisa.

Após coleta e análise dos dados compatíveis com CEC, observamos um maior acometimento em homens quando comparados a pacientes do sexo feminino (proporção 2,75:1). Dentre os casos estudados, uma parcela significativa foi de pacientes com hábitos de fumar (22 casos) e ingerir bebidas alcoólicas (cerveja, destilados) (22 casos). A localização dos tumores foi mais freqüente em soalho (10), palato mole (4) e língua(5), sendo também observados em região de trígono retromolar (3), seio maxilar (2) e orofaringe (1). Totalizando 20 orais e 5 orofaríngeo. Dados clínicos indisponíveis em prontuários foram classificados como NR (não relatado) (Ver tabela 1).

A Análise histopatológica:

A partir do material existente nos blocos de parafina, foi realizados novos cortes com 5 µm de espessura, que foram corados com hematoxilina-eosina (HE), e posteriormente analisados para descrição morfológica dos cortes convencionais e confirmação do diagnóstico.

Os Estágio morfológico e classificação:

O grau de diferenciação celular no CEC oral foi realizado de acordo com os critérios propostos pela OMS (El-Naggar et al., 2017). (Ver tabela 1).

A Técnica imunoistoquímica:

Para a realização das reações de imunoistoquímica, os blocos de parafina foram cortados na espessura de 3 µm e colocados sobre lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Company, Missouri, USA). A recuperação antigênica foi feita através da imersão das lâminas em um recipiente com solução de ácido cítrico em água destilada de pH 6,0. Após resfriamento, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada utilizando peróxido de hidrogênio a 20% em duas incubações, após isso, os cortes foram colocados em solução salina tamponada com tris e detergente (TBST: Tris-buffered saline + Tween 20). Os cortes foram incubados com o anticorpo anti-EBV (LMP-1) durante 16 horas a 4°C. Após, foram submetidos à técnica de imunoistoquímica pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase (Universal LSAB™+ Kit/HRP, Rb/Mo/Goat, K0690, Dako) e exposto ao cromógeno DAB. Os cortes foram lavados em água corrente e destilada e contra corados com hematoxilina de Carazzi. Áreas com maior densidade de imunomarcção foram selecionadas e a densidade e porcentual de células positivas serão registradas em x400 (0,785mm²) (células positivas/mm²).

A Técnica de hibridização in situ (HIS):

Para a realização das reações de HIS, os blocos de parafina foram cortados na espessura de 3 µm e colocados sobre lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Company, Missouri, USA). Os preparados foram lavados em água corrente por 10 minutos, e passaram por duas passagens de água destilada. Com as lâminas colocadas em câmara úmida, os cortes foram incubadas com proteinase K, diluída em solução tampão a base de TRIS (Tris-hidroximetilanoetano) (10mM Tris e NaCl, pH= 7,6), na proporção de 1:10, durante 25 minutos em temperatura ambiente. Após, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada utilizando peróxido de hidrogênio a 20% em duas incubações, após isso, os cortes foram colocados em solução salina tamponada com tris e detergente (TBST: Tris-buffered saline + Tween 20). Os cortes foram incubados com a sonda PNA (EBER1/2) e colocados no hibridizador para desnaturação a 92°C e hibridizados a 37°C. A seguir, os cortes foram lavados em TBST e foi realizado o procedimento de

amplificação e visualização para sondas. Após lavagens com água destilada e TBST, os cortes foram incubados com estreptavidina primária, biotil tiramida pronta para uso (RTU) e estreptavidina secundária a temperatura ambiente (TA). Em câmara úmida, foi adicionada em cada corte de 2 a 3 gotas de substrato (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) e nitroblue tetrazolium (NBT), incubados por 45 minutos em temperatura ambiente. O substrato foi removido com água destilada e as lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos. Os cortes foram contracorados com corados com hematoxilina de Carazzi levemente por 1 minuto em temperatura ambiente, lavados em água corrente por 5 minutos, passados em água destilada e feito a montagem em solução aquosa.

A Análise estatística:

A expressão diferencial entre as lesões e a correlação entre as mesmas, será feito adotando uma significância de 5%, por meio do software SAS (Cary, Carolina do Norte, EUA).

Tabela 1: Dados epidemiológicos dos casos de carcinoma espinocelular oral e orofaríngeo.

	Gênero	Localização	Tabagismo	Etilismo	Grau de diferenciação	Diagnóstico
1	Masculino	Trigono retromolar	Sim	Sim	Pobrementemente diferenciado	CEC
2	Masculino	Soalho	Sim	Sim	NR	CEC
3	Masculino	Soalho	Sim	Sim	NR	CEC
4	Masculino	Soalho	Sim	Sim	Pouco diferenciado	CEC
5	Masculino	Laringe	Sim	Sim	NR	CEC
6	Masculino	Mucosa oral	Sim	Sim	NR	CEC
7	Masculino	Palato mole	Sim	Sim	Pouco diferenciado	CEC
8	Feminino	Seio maxilar	Não	Não	Bem diferenciado	CEC
9	Masculino	Palato mole	Sim	Sim	Pouco diferenciado	CEC
10	Feminino	Mucosa jugal	Sim	Sim	Moderadamente diferenciado	CEC
11	Masculino	Trigono retromolar	Sim	Sim	Moderadamente diferenciado	CEC
12	Feminino	Palato mole	Sim	Sim	Moderadamente diferenciado	CEC
13	Masculino	Soalho/Língua	NR	Sim	Bem diferenciado	CEC
14	Masculino	Língua	Sim	Sim	Bem diferenciado	CEC
15	Feminino	Soalho	Não	Não	NR	CEC
16	Masculino	Base de língua	Sim	Sim	NR	CEC
17	Masculino	Soalho	Sim	Sim	Bem diferenciado	CEC
18	Masculino	Soalho	Sim	Sim	Moderadamente diferenciado	CEC
19	Masculino	Orofaringe	Sim	Sim	NR	CEC
20	Feminino	Soalho	Sim	Sim	Moderadamente diferenciado	CEC
21	Masculino	Base de língua	NR	NR	NR	CEC
22	Masculino	Palato mole	Sim	Sim	NR	CEC
23	Feminino	Soalho	Sim	Não	NR	CEC
24	Feminino	Palato duro	Não	NR	Bem diferenciado	CEC
25	Masculino	Trigono retromolar	Sim	Sim	Moderadamente diferenciado	CEC
26	Masculino	Soalho	Sim	Sim	Moderadamente diferenciado	CEC
27	Masculino	Língua	Sim	Sim	NR	CEC
28	Masculino	Língua	Não	Não	NR	CEC
29	Feminino	Seio maxilar	Não	Não	NR	CEC
30	Masculino	Língua	Não	NR	NR	CEC

NR= Não relatado (indisponível no prontuário).

Na sequência, foi realizado o processo de padronização das reações de imunoistoquímica utilizando o anticorpo LMP-1 (diluição 1:100) (clone CS1-4, DAKO).

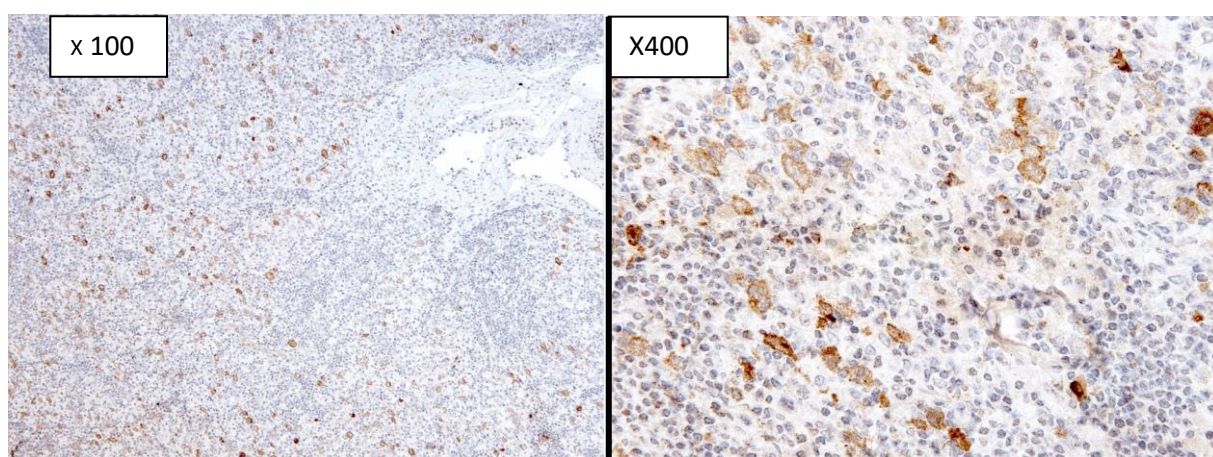


Figura 01. Imagens microscópicas de linfoma de Hodgkin usado como controle positivo para detectar células LMP-1 positivas (cor marrom) em “padrão de membrana” e ocasionalmente

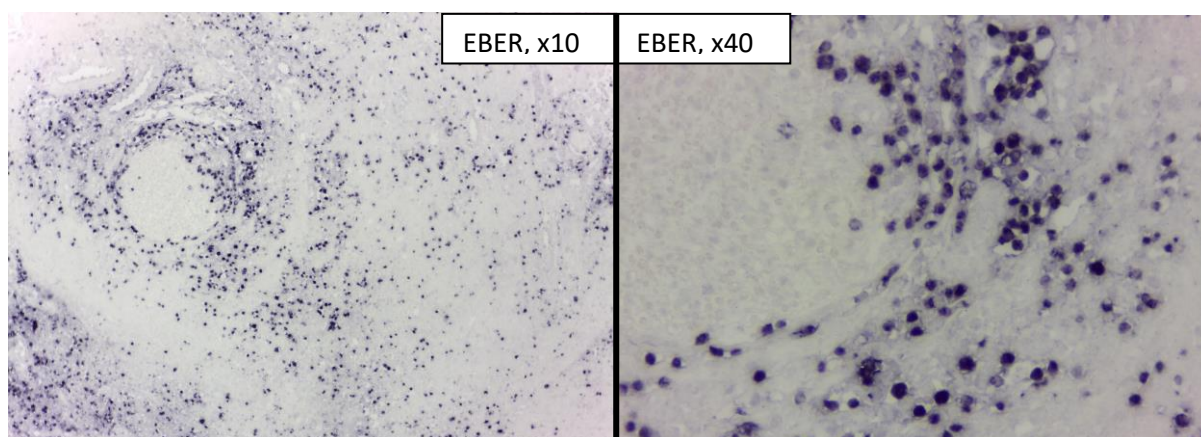


Figura 2. Linfoma NK/T tipo nasal mostrando forte positividade para EBER1/2 por hibridização in situ

4.3 Documentação fotográfica das lâminas de imunoistoquímica

Após a obtenção das lâminas de imunoistoquímica, foi realizado o mapeamento e registro fotográfico das lâminas nos casos diagnosticados com CEC, utilizando o seguinte protocolo: após a avaliação das lâminas em aumento de x100, áreas com maior densidade de imunomarcção foram selecionadas e a densidade e porcentual de células positivas foram registradas em um campo microscópico de x400 (0,785mm²) (células positivas/mm²). O registro foi realizado por meio de um sistema computadorizado, constituído por microscópio de luz (Leica DM500), adaptado a uma câmera de alta resolução (Leica ICC50). As imagens foram obtidas utilizando-se o programa Leica IM50 Imagem Managem.

5. Resultados

A análise imunohistoquímica utilizando o anticorpo LMP-1 para detecção do VEB mostrou negatividade em todos os casos. Não foram observadas áreas imunocoradas similares com o tecido controle (Figura 01). Pelo fato de detectarmos marcações inespecíficas, foram observadas várias áreas “aparentemente” coradas, porém sem o padrão de marcação conhecido do marcador (identificado no controle positivo utilizado).

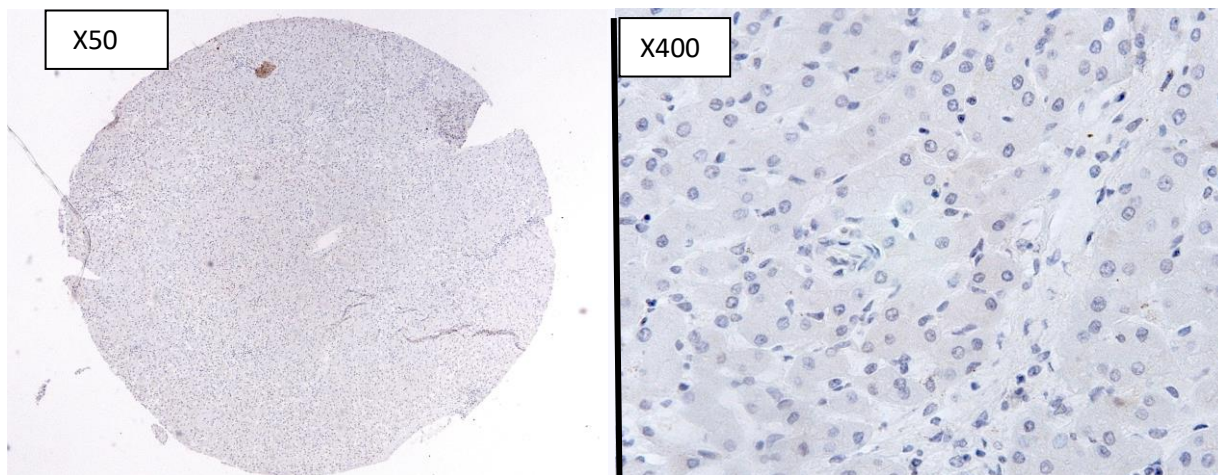


Figura 02. Imagens microscópicas de tecido hepático usado como controle negativo para o marcador LMP-1.

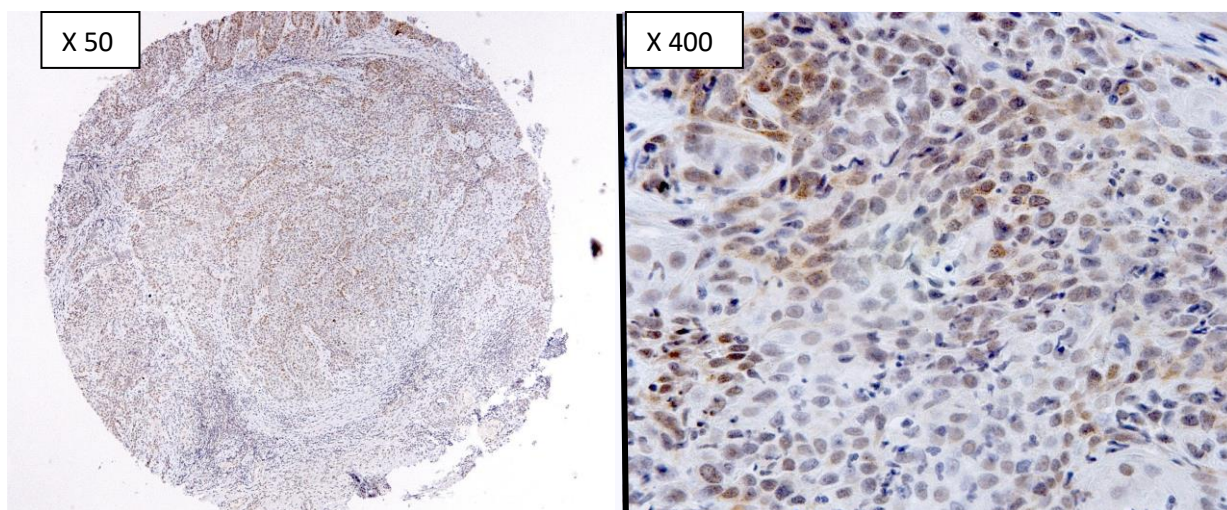


Figura 03. Imagens microscópicas de CEC mostrando negatividade para marcador LMP-1. Note a marcação inespecífica (cor marrom). A marcação seria em padrão de membrana e não nuclear.

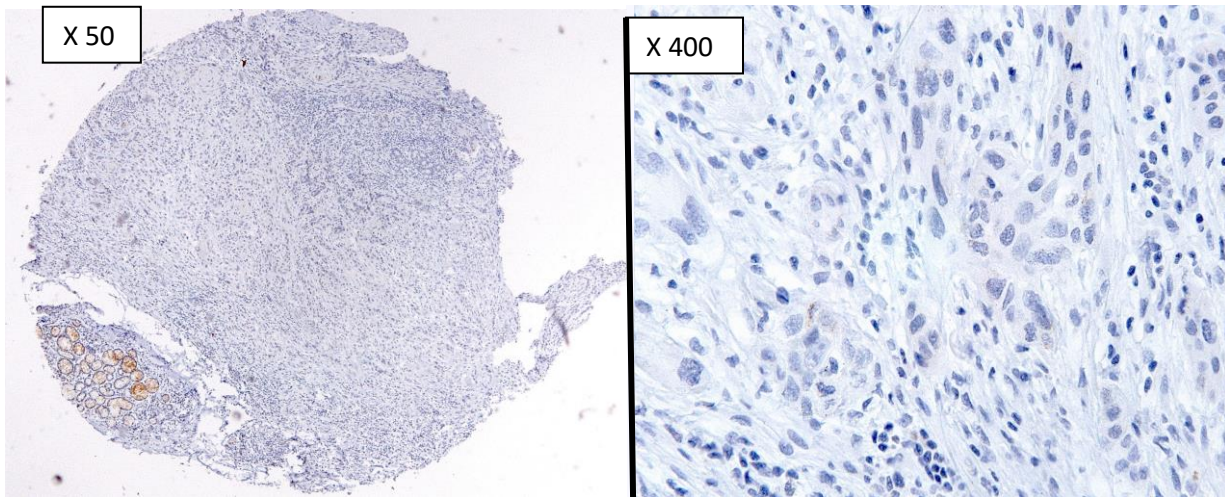


Figura 03. Imagens microscópicas de CEC mostrando negatividade para o marcador LMP-1.

6- Discussão

De acordo com a literatura científica, podemos encontrar trabalhos nos quais foi relatada uma relação entre a infecção pelo VEB e o câncer bucal. Além disso, é observada relação entre o VEB e inúmeros carcinomas, como o de nasofaringe, de estômago (Iizasa et al., 2012), glândulas salivares (Herbst et al., 2006), mama (Fawzy et al., 2008), rim, pulmão (Castro et al., 2001), entre outros. O VEB é transmitido por via oral e infecta células B e células epiteliais. Atualmente se discute o papel do VEB em neoplasias, quanto aos mecanismos patogênicos e valor prognóstico (Almangush et al., 2014, Aaro et al., 2017). A detecção destes vírus é comumente realizada por meio da técnica de hibridização in situ, imunistoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR). Nosso estudo se propôs a avaliar a presença do VEB utilizando o anticorpo LMP-1. Os resultados obtidos mostram que a pesquisa do VEB utilizando o método imunistoquímico, por meio do anticorpo LMP-1, foram negativas em todos os casos analisados. Ainda, podemos observar marcação inespecífica nos tecidos, porém sem o padrão de marcação conhecido para o LMP-1 quando comparados com o controle positivo, onde o padrão de marcação se dá em “membrana”. Outros estudos também têm verificado a falta uniforme de expressão de LMP-1 em células tumorais do CEC (Kis et al., 2009) e carcinomas in situ (Horiuchi et al., 1995). Embora os casos estudados não tenham mostrado positividade para LMP-1, isso não permite concluir ausência do VEB intratumoral. Outro modo de análise do VEB seria pela técnica de hibridização in situ (HIS) (*EBER- complementary to the two nuclear EBER RNAs encoded by Epstein-Barr virus*), considerada uma técnica mais sensível. EBER foi descrito em 1986 por Howe and Steitz, e sua técnica consistia na detecção de pequenos RNA não codificantes do VEB em células infectadas pelo vírus. Atualmente inúmeros estudos têm utilizado esta técnica nas mais diversas neoplasias (Terada, 2013; Shet et al., 2016; Chan, 2017). Assim, uma maneira interessante para avaliação do VEB seria através de complementação com a metodologia do EBER, por meio de HIS. Tal como mostrado neste estudo, todos os casos foram negativos para o VEB avaliados através de HIS.

7- Conclusões

7.1- Os dados epidemiológicos deste estudo mostram uma maior frequência de acometimento do CEC em homens, quando comparados com as mulheres;

7.2- Os locais mais comumente afetados pelo CEC são soalho, língua e palato mole;

7.3- Nossos resultados mostram ausência de positividade para o VEB quando realizado a técnica de imunistoquímica, através do marcador LMP-1 (proteína de membrana latente de vírus);

7.4- Similar aos achados imunistoquímicos, a hibridização in situ (HIS), por possuir uma maior sensibilidade, é importante para uma análise mais eficiente sobre a associação do VEB no CEC oral e seus mecanismos tumorigênicos.

Referências

1. Aaro T, Jaana R, Reidar G, et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNAs (EBERs) associated with poor prognosis of head and neck carcinomas. *Oncotarget*. 2017 Apr 18; 8(16): 27328–27338.
2. Almangush A, Salo T, Hagström J et al. Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. *Histopathology*. 2014(65):587–94.
3. Al Moustafa AE, Chen D, Ghabreau L et al. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. *Med Hypotheses* 2009;73(2):184-6.
4. Castro CY, Ostrowski ML, Barrios R et al. Relationship between Epstein-Barr virus and lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of 6 cases and review of the literature. *Hum Pathol*. 2001;32: 863–72.
5. Chan JK. Virus-associated neoplasms of the nasopharynx and sinonasal tract: diagnostic problems. *Mod Pathol*. 2017 Jan;30(s1):S68-S83.
6. Dolcetti R, Masucci MG. Epstein-Barr virus: induction and control of cell transformation. *J Cell Physiol* 2003; 196(2):207-18.
7. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, et al. World Health Organization classification of tumours. *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press; 2017. p.105-131.
8. Fawzy S, Sallam M, Awad NM. Detection of Epstein-Barr virus in breast carcinoma in Egyptian women. *Clin Biochem*. 2008;41:486– 92.
9. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1989; 43:992-1000.
10. Herbst H, Niedobitek G. Sporadic EBV-associated lymphoepithelial salivary gland carcinoma with EBV-positive low-grade myoepithelial component. *Virchows Arch*. 2006;448: 648–54.

11. Horiuchi K, Mishima K, Ichijima K, et al. Epstein-Barr virus in the proliferative diseases of squamous epithelium in the oral cavity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995 Jan;79(1):57-63.
12. Howe JG, Steitz JA. Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83: 9006-9010.
13. Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J et al. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses.* 2012;4: 3420–36.
14. Kis A, Fehér E, Gáll T et al. Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population. *Eur J Oral Sci.* 2009 Oct;117(5):536-40.
15. Shah KM, Young LS. Epstein-Barr virus and carcinogenesis: beyond Burkitt's lymphoma. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(11):982-8.
16. Shet T, Pai T, Shetty O, Desai S. Lymphoepithelioma-like carcinoma of breast-evaluation for Epstein-Barr virus-encoded RNA, human papillomavirus, and markers of basal cell differentiation. *Ann Diagn Pathol.* 2016 Dec;25:42-47
17. Shimakage M, Kawahara K, Harada S et al. Expression of Epstein-Barr virus in renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2007;18:41–6.
18. Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein-Barr virus in oral diseases. *J Periodontol Res* 2006;41(4):235-44.
19. Takacs M, Banati F, Koroknai A, et al. Epigenetic regulation of latent Epstein-Barr virus promoters. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799(3-4):228-35.
20. Terada T. Epstein-Barr virus associated lymphoepithelial carcinoma of the esophagus. *Int J Clin Exp Med.* 2013;6(3):219-26.