

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 E -7
EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

Maria Manuela Rodrigues de Lemos Almeida

SAPIENTIA AEDIFICAT

2014

Maria Manuela Rodrigues de Lemos Almeida

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 E -7
EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Diagnóstico Bucal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marize Raquel Diniz da Rosa

João Pessoa

2014

A447a Almeida, Maria Manuela Rodrigues de Lemos.

Avaliação imunoistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em carcinoma epidermóide de lábio / Maria Manuela Rodrigues de Lemos Almeida.-- João Pessoa, 2014.

78f.

Orientadora: Marize Raquel Diniz da Rosa

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS

1. Odontologia. 2. Diagnóstico bucal. 3. Galectina. 4. Lábio - Carcinoma epidermóide. 5. Imunoistoquímica.

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

Maria Manuela Rodrigues de Lemos Almeida

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 E -7
EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

Banca Examinadora

Prof.^a. Dr.^a Marize Raquel Diniz da Rosa
Orientadora - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Examinador - UFPB

Prof.^a. Dr.^a Patrícia Meira Bento.
Examinadora - UEPB

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação...

*À minha mãe, Maria Mônica, meu exemplo, meu norte, minha amiga, pelo seu
incentivo desde a minha mais tenra idade...*

*Aos meus avós, José Rodrigues e Ana Maria, meus pilares, pelo amor, carinho e
incentivo sempre...*

*Ao meu marido, Marcílio Imbassahy, por estar sempre ao meu lado, pela
cumplicidade, compreensão e apoio...*

*À minha filha amada, Maria Isabel, por ser meu maior estímulo a seguir em
frente...*

*Ao meu pequeno bebê, companheiro inseparável nessa reta final, que já traz
muita alegria antes mesmo de nascer...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ajudar a concluir mais essa etapa na minha vida, sempre abrindo meus caminhos da melhor forma possível. Obrigada Senhor!

À minha amiga e orientadora, Profa. Dra. Marize Raquel Diniz da Rosa, por seu exemplo de dedicação, profissionalismo, competência e fé, sendo um estímulo na busca de novos desafios e um espelho para a formação de um bom Docente.

À Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves, por todo interesse e disponibilidade, por toda boa vontade em nos ajudar desde que essa pesquisa era um projeto. Toda minha admiração e gratidão.

À Nemiuzia, Técnica do Hospital Napoleão Laureano, pela imensa colaboração nos cortes dos blocos e montagem das lâminas. Sem você, este trabalho não teria como ser iniciado.

Ao Dr. Alexandre Rolim da Paz, pela disposição em nos ajudar desde o início desta pesquisa.

Aos funcionários da Patologia Oral, Ângela, Silvana, Giovane, por fazerem parte dessa conquista.

A Hevio Lucena e Dr. Carlos Jatobá, por abrirem as portas do laboratório para a realização da imunistoquímica em todos os casos deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFPB, por todo conhecimento transmitido e pela amizade dispensada a todos nós.

Aos meus queridos amigos da turma de mestrado, em especial aos de Diagnóstico Bucal, pelos momentos especiais de amizade e aprendizagem ao longo desses dois anos. Vocês são inesquecíveis.

À minha mãe, por toda dedicação, por todo amor, por todo apoio, enfim, por existir.

Aos meus avós, por serem parte indispensável da minha vida.

Aos meus tios, tias, primos e primas, por serem minha alegria.

Ao meu marido, por ser melhor do que eu poderia imaginar.

À minha filha, tão linda e querida, por sorrir e me beijar todas as vezes em que eu desanimava.

RESUMO

O câncer oral é uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. No Brasil, são esperados quinze mil novos casos para o ano de 2014. O carcinoma epidermóide de lábio apresenta características semelhantes a lesões de pele e tem como principal agente etiológico a exposição solar crônica. As galectinas -1, -3 e -7 são proteínas envolvidas na tumorigênese e têm sido investigadas devido a mudanças em suas expressões em casos de câncer oral. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão através da imunistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em 30 casos de carcinoma epidermóide de lábio, fazendo a associação com os dados clínicos, gradação histológica de malignidade através dos sistemas propostos por Bryne (1998) e OMS (2005). Os parâmetros analisados e a expressão das galectinas -1, -3 e -7 foram submetidas a análise estatística (teste do qui-quadrado, teste exato de Fisher e teste Binomial para a comparação de proporções). Houve expressão da galectina -1 em 93,3% dos casos, apresentando associação estatisticamente significativa ($p=0,0356$) entre a gradação histológica de malignidade proposta pela OMS e o tipo celular marcado. Não houve associação estatisticamente significativa entre a galectina -3 com nenhum dos parâmetros avaliados. A imunexpressão da galectina -7 esteve presente em todos os casos avaliados e exibiu significância estatística entre o tipo celular marcado e metástase regional ($p=0,0000$) e entre o tipo celular marcado e a gradação histológica proposta por Bryne. Alterações na expressão das galectinas -1, -3 e -7 sugerem a participação dessas proteínas na carcinogênese. Concluímos, através dos resultados da presente pesquisa, que a imunexpressão dessas proteínas em carcinoma epidermóide de lábio possa atuar como marcador do comportamento biológico deste tipo de lesão.

Palavras-chave: Galectina, Carcinoma Epidermóide, Lábio, Imunistoquímica

ABSTRACT

The oral cancer is a major cause of morbidity and mortality worldwide. In Brazil, 15,000 new cases are expected for the year 2014. Lip squamous cell carcinoma features are similar to skin lesions and have as main etiological agent, the chronic sun exposure. The galectins -1, -3 and -7 are proteins involved in tumorigenesis and have been investigated due to changes in their expressions in oral cancer. The objective of this study was to evaluate the expression by Immunohistochemistry of galectins-1, -3 and -7 in 30 cases of lip squamous cell carcinoma, making the correlation with clinical data, histological grading of malignancy through the proposed systems for Bryne (1998) and WHO (2005). The parameters analyzed and expression of galectins -1, -3 and -7 were subjected to statistical analysis (Chi-square, Fisher exact test and test for comparison of Binomial proportions). There was no expression of galectin -1 in 93.3% of cases, showing statistically significant correlation ($p = 0.0356$) between histological grading of malignancy proposal by WHO and the marked cell type. There was no statistically significant correlation between the galectin -3 with none of the evaluated parameters. Expression of galectin-7 was present in all cases evaluated and showed statistical significance between the marked cell type and regional metastasis ($p=0,0000$) and between the marked cell type and histological grading proposal for Bryne. Changes in the expression of galectinas -1, -3 and -7 suggest the participation of these proteins in carcinogenesis. We conclude, through the results of this research, that the expression of these proteins in squamous cell carcinoma of lip can act as a marker of biological behaviour of this type of lesion.

Keywords: Galectin, Squamous Cell Carcinoma, Lip, Immunohistochemistry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE – Carcinoma de Epidermóide

DRC – Domínio de Reconhecimento de Carboidratos

MMP – Matrix Metaloproteinase

OMS – Organização Mundial da Saúde

UV – Ultravioleta

DNA – Ácido desoxirribonucléico

HPV – Papiloma Vírus Humano

TNM – Tumor (T), Linfonodo regional (N), Metástase à distância (M)

EMT – Transição Epitélio-Mesenquimal

JNK – Proteína quinase c-Jun N-terminal envolvida na regulação da apoptose

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação proposta por Bryne (1998)	7
Quadro 2: Especificidade, Clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-galectinas -1, -3 e -7.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura das Galectinas.....	10
Figura 2: Fotomicrografia de CE de lábio bem diferenciado ou de baixo grau exibindo numerosas pérolas de ceratina e escasso pleomorfismo celular (HE 100X).....	26
Figura 3: Fotomicrografia de CE de lábio moderadamente diferenciado exibindo cordões neoplásicos com pleomorfismo celular, nuclear e hiper Cromatismo nuclear com poucas pérolas de ceratina, classificado como de alto grau pelo sistema proposto por Bryne (1998) (HE 100X).....	26
Figura 4: Fotomicrografia de CE em lábio exibindo células neoplásicas pobremente diferenciadas com intenso pleomorfismo e hiper Cromatismo celular, classificado como de alto grau pelo sistema proposto por Bryne (1998) (HE, 40X).....	26
Figura 5: Imunomarcção intensa em fragmento de tonsila palatina (DAB 40X).....	28
Figura 6: Ausência de imunomarcção em fragmento de carcinoma epidermóide após a omissão do anticorpo primário (DAB 40X).....	28
Figura 7: Imunoexpressão da galectina 7 em CE de lábio de baixo grau de malignidade exibindo forte marcação citoplasmática em parênquima (DAB 100X).....	30
Figura 8: Ausência de imunomarcção da galectina-3 em CE de lábio de alto grau de malignidade (DAB 4X).....	30
Figura 9: Imunoexpressão da galectina -7 em CE de lábio de baixo grau de malignidade exibindo forte marcação em parênquima (DAB 4X).....	30
Figura 10: Imunoexpressão da galectina -7 em CE de lábio de alto grau de malignidade exibindo forte marcação nuclear, citoplasmática e membranar (DAB 40X).....	31
Figura 11: Imunoexpressão da galectina -7 em CE de lábio de alto grau de malignidade exibindo forte marcação, citoplasmática e membranar (DAB 40X).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos casos de carcinoma epidermóide de acordo com o gênero, faixa etária, hábitos do pacientes e localização da lesão.....	23
Tabela 2: Distribuição das variáveis TNM e estadiamento em números absolutos (n) e relativos (%).....	24
Tabela 3: Análise comparativa entre os sistemas de gradação histopatológica propostos por Bryne (1998) e OMS (2005) em números absolutos (n) e relativos (%).....	25
Tabela 4: Distribuição da imunexpressão das galectinas -1, -3 e -7 de acordo com a presença ou ausência de marcação, distribuição, intensidade, tipo e localização celular.....	29
Tabela 5: Relação entre o tamanho da lesão (T) e as variáveis das galectinas -1, -3, -7.....	33
Tabela 6: Relação entre a presença ou ausência de metástase regional (N) e as variáveis das galectinas -1, -3 e -7.....	35
Tabela 7: Relação entre a gradação histológica de malignidade proposta pela OMS e as variáveis das galectinas -1, -3 e -7.....	37
Tabela 8: Relação entre a gradação histológica de malignidade proposta por Bryne (1998) e as variáveis das galectinas -1, -3 e -7.....	39
Tabela 9: Relação entre o estadiamento clínico e as variáveis das galectinas -1, -3 e -7.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
	2.1 Considerações gerais	3
	2.2 Carcinoma epidermóide de lábio	4
	2.2.1 Etiopatogenia e Epidemiologia	4
	2.2.2 Características clínicas e histopatológicas	5
	2.3 Marcadores Moleculares	8
	2.4 Galectinas	9
	2.4.1 Galectina -1	11
	2.4.2 Galectina -3	13
	2.4.3 Galectina -7	15
3	OBJETIVOS	18
	3.1 Geral	18
	3.2 Específicos	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
	4.1 Caracterização do Estudo	19
	4.2 Universo	19
	4.3 Amostra	19
	4.4 Critérios de Inclusão	19
	4.5 Critérios de Exclusão	19
	4.6 Estudo Clínico	20
	4.7 Estudo Histomorfológico	20
	4.8 Análise da Expressão Proteica	20
	4.9 Aspectos Éticos	22
	4.10 Análise Estatística	22
5	RESULTADOS	23
	5.1 Análise descritiva dos dados clínicos	23
	5.2 Análise descritiva dos aspectos morfológicos	24
	5.3 Análise descritiva da imunexpressão das galectinas -1, -3 e -7	27
	5.4 Relação entre as variáveis clínicas e a imunexpressão das galectinas -1, -3 e -7	32
	5.4.1 Tamanho da lesão	32
	5.4.2 Metástase Regional	34
	5.4.3 Gradação Histológica OMS	36
	5.4.4 Gradação Histológica - Bryne	38

5.4.5 Estadiamento Clínico.....	40
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE A.....	60
ANEXO A	61
ANEXO B.....	62

1. INTRODUÇÃO

O câncer oral é uma patologia que apresenta elevados números de morbidade e mortalidade em todo o mundo, constituindo uma enfermidade bastante comum em determinadas populações.¹² No Brasil, foi estimado para o ano de 2014, o surgimento de mais de onze mil casos para o gênero masculino e quatro mil para o feminino, sendo as regiões Nordeste e Sudeste mais freqüentemente atingidas, ocupando a quarta posição, entre os homens e a nona entre as mulheres, dentre todos os tipos de câncer.⁴¹ Os subtipos clínicos e as diversas localizações do câncer oral apresentam diferentes etiologias, epidemiologias e taxas de sobrevivência.¹⁰⁰

O carcinoma epidermóide (CE), também denominado de carcinoma espinocelular ou de células escamosas corresponde entre 90% a 95% dos casos de câncer oral e é o segundo mais freqüente na pele.^{19, 27, 52} É uma neoplasia maligna que deriva do epitélio escamoso tanto da mucosa oral como do vermelhão do lábio.⁸

O CE de lábio é uma enfermidade comum, responsável por cerca de 30% de todos os tumores que atingem a cavidade oral.^{5, 82} Apresenta características semelhantes a lesões de pele sendo resultado da exposição excessiva e crônica à radiação solar ultravioleta (UV) que promove danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA) celular e podem levar a mutações oncogênicas.⁵⁶ Alguns autores têm associado a ingestão de álcool, o tabagismo e a presença do Papiloma Vírus Humano (HPV) como coadjuvantes na etiologia do CE de lábio.^{8, 28, 70} Geralmente, pacientes com CE de lábio apresentam características clínicas e microscópicas diferentes dos outros CE intrabucais, que refletem no comportamento biológico e prognóstico.⁸

Marcadores biológicos moleculares podem ser valiosos no diagnóstico e na evolução do prognóstico de lesões com potencial de malignização e malignas.^{59, 75} Alguns mecanismos, como alterações bioquímicas e moleculares nas células precedem o estabelecimento de neoplasias e, neste caso, a desregulação de várias proteínas, tais como as galectinas -1, -3 e -7, podem estar envolvidas. As galectinas têm sido usadas na imunistoquímica para descrever

alterações na superfície das células neoplásicas já que as mesmas são capazes de influenciar várias funções celulares.²³

Vários autores têm estudado a expressão dessas proteínas em carcinomas de cabeça e pescoço,⁸⁰ gástrico,^{22, 47} mucosa cervical,^{49, 55} próstata,^{7, 51} pulmão,⁸² mama,⁴⁴ endométrio,⁴² ovário,³⁰ fígado,⁹⁷ e pâncreas.^{71, 87}

Na cavidade oral alguns estudos da expressão destas proteínas em CE foram realizados,^{4, 20, 23, 40, 99} no entanto, não temos conhecimento de estudos da expressão dessas proteínas em CE de lábio. Diante do exposto, o objetivo dessa pesquisa é avaliar a expressão das galectinas -1, -3 e -7 através da imunistoquímica em CE de lábio e avaliar o papel desses biomarcadores no prognóstico desse tipo de lesão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais

O câncer é resultado de alterações genéticas nas células que ocasionam o surgimento de transformações malignas. Ao longo das últimas décadas, a incidência e a mortalidade por essa doença vêm crescendo mundialmente. No Brasil, o câncer oral ocupa a quinta posição em incidência estimada para o ano de 2014.⁴¹ Em grande parte dos casos, a demora na detecção do câncer oral compromete consideravelmente o prognóstico dos pacientes acometidos por esta patologia.^{43,72}

O CE de cabeça e pescoço constitui um conjunto de doenças que, embora unidos pela localização e aspectos histológicos, envolvem diversos tipos de tumores que diferem na patogênese, sublocalização, tratamento e qualidade de vida.^{33, 37} O CE é o tipo de neoplasia maligna mais comum na cavidade oral, variando a localização de acordo com as características demográficas e culturais de determinadas regiões.^{34, 66}

Apesar de ser mais freqüentemente encontrado em pacientes com idade acima dos 50 anos, o CE também pode acometer pacientes jovens, sendo associado a fatores de risco extrínsecos como o tabaco, o álcool e o HPV e fatores de risco intrínsecos, como predisposição genética para algumas síndromes, como Anemia Fanconi, Hipovitaminoses, Síndrome de Bloom e Xeroderma Pigmentoso.^{39, 64}

O fumo e a ingestão de bebidas alcoólicas constituem os principais fatores de risco para o surgimento dessa doença.^{6, 64} Diferenças clínicas e histopatológicas podem estar presentes em pacientes portadores de CE de cabeça e pescoço de acordo com seus hábitos. Grande parte dos portadores dessa patologia são usuários de tabaco ou álcool e apresentam com maior freqüência, metástase de linfonodos bem como tumores pouco diferenciados. Entre os não usuários de tabaco ou álcool, tumores bem diferenciados e com melhor prognóstico são mais prevalentes.⁶⁶

Em estudo realizado na região do sudeste Brasileiro, no período de 2005 a 2012, observou-se que, dos 346 casos diagnosticados como CE, 232

(67%) corresponderam ao gênero masculino. A borda lateral da língua (37%), gengiva e mucosa alveolar (20%) e assoalho bucal/superfície ventral da língua (19%), foram os sítios mais freqüentemente afetados. Nesse estudo, também foi possível observar que o consumo do álcool e do tabaco estiveram presentes em 80% e 70% da amostra, respectivamente.⁷² No entanto, em se tratando do carcinoma epidermóide de lábio, a radiação UV é considerada a principal causa desse tipo de lesão.⁷⁷

2.2 Carcinoma epidermóide de lábio

2.2.1 Etiopatogenia e Epidemiologia

O CE tem sido relatado como o tipo de câncer mais freqüente do lábio, sendo que 90% a 95% dos casos acometem o lábio inferior.⁶⁸ A elevada ocorrência nessa localização tem sido atribuída à sua posição, já que é uma região normalmente mais exposta à radiação solar.⁶² No Brasil, por ser um país que apresenta regiões com altos níveis de radiação UV, torna-se um problema particularmente maior. Além disso, em muitos locais, a economia é baseada na agricultura, pesca, construção civil, ocupações que levam os trabalhadores a longos períodos de exposição solar.^{1, 19, 29, 38, 41}

É provável que o tabaco e o álcool possam contribuir para o surgimento dessa patologia, já que em estudo retrospectivo, realizado pela Universidade Estadual de Montes Claros entre os anos de 1996 a 2008, em 30 casos de CE de lábio, observou-se que 80% (n=24) dos pacientes portadores de CE de lábio eram tabagistas e 60% (n=18) etilistas. Além disso, 70% (n=21) apresentavam histórico de exposição solar crônica.⁹⁰

Entre 240 trabalhadores rurais do semiárido do Nordeste Brasileiro com histórico de exposição solar crônica, foi observado que 27,5% dos homens apresentavam lesões displásicas no lábio contra apenas 10,1% das mulheres. Essas lesões foram mais prevalentes entre fumantes e ex-fumantes. Além disso, entre os pacientes portadores de displasia submetidos à biópsia, 10% foram diagnosticados como CE microinvasivo. Os resultados desse estudo demonstram que, trabalhadores rurais do semiárido Brasileiro, apresentam alto risco para o

desenvolvimento do câncer de lábio e que programas educacionais de prevenção e detecção precoce devem ser implementados.⁶³

O CE de lábio representa 10,8% dos casos de CE da cavidade oral e região perioral, sendo 83,3% localizados em lábio inferior. Hábitos como o tabagismo e a ingestão de álcool foram significativos e estiveram presentes, respectivamente, em 80% e 60% dos casos. Foi observado também que pacientes com CE de lábio exibiram estadiamento clínico TNM precoce (76,7%) e ausência de metástase cervical (73,3%).⁹⁰ Dessa forma, o CE de lábio apresenta bom prognóstico quando comparado a outros sítios orais.

2.2.2 Características clínicas e histopatológicas

O CE de lábio afeta principalmente o gênero masculino, de etnia branca e acima dos 50 anos. A localização do CE na cavidade oral varia de acordo com os hábitos populacionais, sendo o de lábio prevalente em populações com histórico de atividade ocupacional relacionada à exposição solar.^{34, 83, 100}

Alguns estudos demonstram que o lábio está entre as localizações mais frequentes do CE oral. Além disso, está associado a uma elevada taxa de sobrevivência, o mesmo não ocorrendo nos casos de CE de língua, assoalho bucal e gengiva.^{34, 43, 88}

Em um estudo comparativo entre o CE de lábio e CE oral, observou-se que, apenas 12,5% dos casos de CE de lábio apresentavam envolvimento de linfonodos, contra 59,37% dos casos de CE oral. Além disso, todos os casos de CE de lábio eram classificados como bem diferenciados e apenas 10,81% da amostra de CE oral receberam essa classificação. Esses resultados demonstram que as características clínicas e histopatológicas dessas lesões podem refletir diferentes prognósticos, sendo mais favorável em casos de CE de lábio.⁸

A metástase de linfonodos constitui um importante fator prognóstico em casos de carcinoma epidermóide oral. Sua presença está diretamente relacionada a um pior prognóstico, sendo a dificuldade na sua detecção precoce, responsável

pela elaboração de tratamentos inapropriados com conseqüente piora no prognóstico.⁴⁶

Em estudo realizado através da análise de 173 prontuários, observaram que o carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado (79,76%), com localização no lábio inferior (78,61%), com até 2 cm de diâmetro e estadiamento clínico precoce (42,74%) foram as características mais freqüentemente encontradas. Esses dados demonstram a possibilidade de um prognóstico favorável desse tipo de neoplasia.⁸³

Em relação aos aspectos clinicopatológicos do CE de lábio, as lesões podem ter o aspecto de úlceras com bordas elevadas e endurecidas associadas ou não a manchas avermelhadas ou esbranquiçadas.⁸⁶ Em uma população brasileira, observou-se que o tipo ulcerativo foi o mais prevalente. No entanto, o tipo úlcero-vegetante apresentou o maior número de casos de metástase e recidiva, provavelmente por apresentar lesões de maior tamanho, acima de 1,5cm.¹

O CE é representado histologicamente por intensa proliferação de células epiteliais neoplásicas oriundas de um epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado, que invadem a lâmina própria subjacente e formam ilhas ou cordões. As células neoplásicas apresentam citoplasma abundante, eosinofílico, hipercormatismo nuclear, nucléolos evidentes, mitoses atípicas e aumento da relação núcleo-citoplasma. A formação de pérolas de ceratina depende do grau de diferenciação tumoral, sendo abundante em tumores bem diferenciados. Vasos sangüíneos neoformados, infiltrado inflamatório mononuclear, áreas de hemorragia e necrose completam o quadro histopatológico.^{91, 96}

O sistema de estadiamento clínico de tumores TNM é baseado na avaliação do tamanho da lesão primária (T), no número de metástases de linfonodos regionais (N) e na presença de metástases à distância (M). Tem sido a classificação adotada para caracterizar tumores, propor terapias e estimar a sobrevida dos pacientes. No entanto, tumores com estadiamento clínico semelhantes podem apresentar diferentes padrões de crescimento e características clínicas. Dessa forma, foram criadas classificações

histopatológicas para o CE oral, com o intuito de proporcionar um melhor entendimento acerca do comportamento biológico discrepante dos tumores.^{61, 84}

No sistema de gradação histológica de malignidade para o carcinoma epidermóide proposto por Bryne et al.¹⁵ são avaliadas regiões mais invasivas onde devem ser levados em consideração o grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, o padrão de invasão e o infiltrado linfo-plasmocitário. Para cada característica histopatológica analisada, são atribuídos escores de 1 a 4, que são somados a fim de indicar o prognóstico do tumor. Altos escores indicam um pior prognóstico (Quadro 1).

SISTEMA DE GRADAÇÃO DAS MARGENS INVASIVAS				
Pontuação				
Característica Morfológica	1	2	3	4
Grau de Ceratinização	Altamente ceratinizado(> 50% das células)	Moderadamente ceratinizado (20-50% das células)	Ceratinização mínima (5-20% das células)	Sem ceratinização (0-5% das células)
Pleomorfismo Nuclear	Pouco pleomorfismo nuclear (>75% das células maduras)	Moderadamente abundante pleomorfismo nuclear (50-75% das células maduras)	Abundante pleomorfismo nuclear (25-50% das células maduras)	Extremo pleomorfismo nuclear (0-25% das células maduras)
Padrão de Invasão	Compressivo, bordas infiltrantes bem delineadas	Infiltrante, cordões sólidos, bandas ou fios	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes (n>15)	Marcante e disseminada dissociação em grupos pequenos e/ou em células individuais
Infiltrado Linfo-Plasmocitário	Marcante	Moderado	Leve	Ausente

Quadro 1: Classificação proposta por Bryne (1998).

A OMS, em 2005, propôs uma classificação histopatológica de malignidade que se baseia no grau de diferenciação celular permitindo o agrupamento desta lesão em três categorias: pouco, moderadamente e bem diferenciados. Os pouco diferenciados exibem células bem indiferenciadas, com

intenso pleomorfismo celular e nuclear e pouca ou nenhuma produção de ceratina. Os moderadamente diferenciados exibem pouca ceratinização e células neoplásicas com certo grau de pleomorfismo celular e nuclear, ainda que seja possível o reconhecimento de sua origem epitelial. Já os bem diferenciados apresentam arquitetura tecidual semelhante a um padrão normal de epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado, com presença de células epiteliais displásicas que invadem o tecido conjuntivo subjacente formando ilhas e/ou cordões de células com a produção de pérolas de ceratina.⁹⁶

Muitas características histopatológicas do CE podem ser identificadas como fatores prognósticos. No entanto, tumores com estadiamento clínico e histopatológico semelhantes podem apresentar diferentes padrões de comportamento e crescimento. Eventos moleculares estão presentes durante o desenvolvimento tumoral, dentre estes, podemos citar: perda ou ganho de moléculas de adesão, secreção de enzimas proteolíticas, aumento da proliferação celular e angiogênese.⁸⁴ Dessa forma, observa-se a necessidade de marcadores prognósticos confiáveis que possam contribuir para a escolha do tratamento mais adequado.

2.3 Marcadores Moleculares

Marcadores biológicos são componentes celulares, estruturais e bioquímicos, que podem definir alterações celulares e moleculares tanto em células normais quanto em células associadas à transformação maligna.¹⁸ São macromoléculas cujo aparecimento ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas. Além disso, a literatura demonstra que, pacientes inicialmente com níveis elevados de determinado marcador tumoral, normalizando com a intervenção terapêutica, apresentam prognóstico mais favorável do que aqueles com marcador persistentemente elevado ou em ascensão.²

A detecção de alterações moleculares favorece o diagnóstico e o tratamento de neoplasias, o que tem estimulado a busca por biomarcadores com

potenciais aplicações clínicas.⁷⁶ As galectinas têm sido utilizadas como marcadores biológicos moleculares em carcinomas epidermóide oral. A análise dessas proteínas tem facilitado a identificação de diversas alterações biomoleculares nesse tipo de lesão.^{4, 20, 23, 37, 40, 99}

2.4 Galectinas

As galectinas são uma família de proteínas, presentes tanto em células normais como tumorais, com capacidade de unir-se ao seu ligante mediante um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) com afinidade por β -galactosídeos e estão envolvidas em diversos fenômenos celulares, tais como: imunomodulação, adesão celular, regulação do crescimento, inflamação, apoptose, desenvolvimento e progressão de neoplasias.⁶⁵ A seqüência de domínio de reconhecimento de carboidratos possui aproximadamente 130 aminoácidos.⁹

Aproximadamente 15 tipos foram identificados em mamíferos e classificados de acordo com a quantidade e disposição dos DRCs, em três tipos: prototípicas, com 1 DRC (galectina -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15); galectina tipo tandem repetido, com 2 DRCs homólogos em uma única cadeia polipeptídica (galectina -4, -6, -8, -9, -12); e a galectina tipo quimera, com uma região N-terminal não lectina (que consiste de resíduos de prolina, glicina e tirosina) conectada a 1 DRC (galectina -3) como mostra a figura 1.^{53, 58}

As galectinas são secretada através de uma via secretora não clássica, faltando a seqüência de sinal necessária para a secreção de proteínas através da via tradicional Retículo Endoplasmático – Complexo de Golgi. Esse tipo de exportação não clássica, tem sido explorada de diversas maneiras, mas o mecanismo básico ainda é desconhecido. Vários outros fatores de crescimento, por exemplo, fatores de crescimento dos fibroblastos FGF - 1 e FGF - 2 e de interleucina IL - 1 β , também são secretados por uma via não clássica, mas se a via secretora converge com a das galectinas não é possível afirmar.⁹³

Essas proteínas estão presentes em vários compartimentos celulares de acordo com a condição da célula em questão.⁵⁷ No entanto, podem ser secretadas para o meio extracelular onde interagem com ligantes presentes na superfície de outras células ou na matriz extracelular.⁹⁴ Parecem interagir seletivamente com alguns ligantes da superfície celular e da matriz extracelular. Entretanto, os papéis fisiológicos exatos destas interações com cada galectina não são bem compreendidos. Entre ligantes potenciais para as galectinas -1 e -3, por exemplo, estão as proteínas de membrana (como a laminina e fibronectina), receptores de membrana (como as integrinas), proteínas de membrana associadas ao lisossoma, vitronectina e fibronectina.⁹³

As galectinas têm recebido cada vez mais atenção por seu envolvimento em mecanismos fisiológicos e patológicos e nos processos neoplásicos, principalmente em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.^{31, 81}

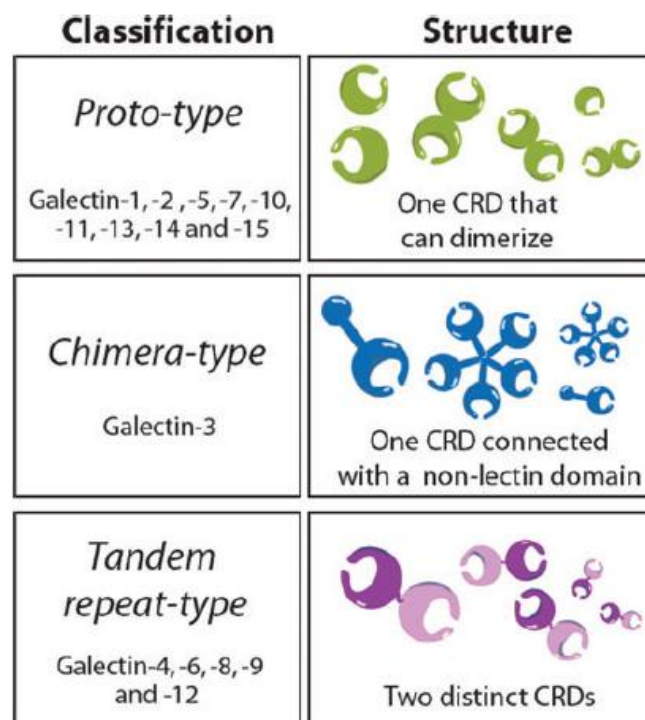


Figura 1: Estrutura das Galectinas. Galectinas monovalentes (-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15) possuem um único DRC e podem formar homodímeros tornando-se bivalentes. Galectina tipo quimera com um único DRC e uma região N-terminal não lectina (Galectina -3). Galectinas com sequência de repetição *tandem*, portanto bivalentes com dois DRCs (galectinas -4, -6, -8, -9, -12).
 Fonte: Liu & Rabinovich 2010⁵⁸

2.4.1 Galectina -1

A galectina -1 é uma proteína não-covalente homodimérica com um DRC. Está presente intra e extracelularmente e também é encontrada na superfície celular.¹⁶ É conhecida por estar profundamente envolvida na iniciação, amplificação e resolução de respostas inflamatórias.³ Além disso, está relacionada a vários eventos imunológicos, sendo responsável por promover apoptose das células T e bloqueio da ação de células T efetoras. Além disso, inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias.^{54, 58, 74}

Tem sido considerado um biomarcador de pior prognóstico em uma variedade de tipos de câncer, tais como: gástrico, cervical, oral, língua e fígado.^{4, 22, 23, 49, 97} A expressão ou super expressão da galectina -1 em um tumor ou tecido circundante (estroma) pode ser considerado como um sinal de progressão maligna com conseqüente prognóstico desfavorável.^{16, 81} Expressão alterada da galectina -1 também pode ser vista em lesões potencialmente malignas, o que sugere seu envolvimento no processo de transformação neoplásica.^{49, 71}

Em estudo *in vitro*, através da análise proteômica, foi observada uma elevada expressão da galectina -1 nas células HB96 cancerosas. No teste *in vivo* observaram um aumento significativo da expressão da galectina -1 em carcinoma epidermóide oral e também uma correlação negativa entre a expressão da galectina -1 e o grau de diferenciação patológica, onde maior expressão dessa proteína indica um grau mais pobre de diferenciação em tecidos afetados pela malignidade.⁹⁹

No carcinoma epidermóide oral, foi observada uma forte imunomarcagem nas células do estroma tumoral e no front de invasão nos estágios iniciais da doença. Além disso, a expressão da galectina-1 em células tumorais foi maior nos casos que apresentavam metástase de linfonodos.²³

Ao se analisar pelo método da imunoistoquímica, a expressão da galectina -1 em casos de mucosa cervical normal, lesão intraepitelial de baixo e alto grau e em carcinoma cervical, foi observado um aumento da intensidade de expressão da galectina -1 nas células do estroma adjacentes ao tecido alterado durante a progressão da neoplasia.⁴⁹

Uma elevada expressão da galectina-1 foi associada a altas taxas de metástases de linfonodos bem como a invasão de células tumorais no estroma em pacientes portadores de câncer cervical. Além disso, através de estudo *in vitro*, foi demonstrado que a baixa regulação da expressão da galectina-1 foi capaz de inibir a proliferação e invasão de células tumorais, demonstrando que a galectina-1 pode estar envolvida nesses mecanismos celulares.⁴⁵

Acredita-se que a neoplasia pancreática intraepitelial seja precursora do adenocarcinoma pancreático. Na neoplasia pancreática intraepitelial, cerca de 200 proteínas mostram-se desreguladas e dentre elas a galectina -1, que mostrou-se super expressa no estroma da neoplasia intraepitelial pancreática de alto grau (70%), assim como no câncer pancreático (95%). Não houve expressão dessa proteína na amostra de tecido normal, o que sugere a associação entre o aumento da expressão da galectina -1 ao avanço da lesão precursora para o câncer de pâncreas.⁷¹

Ao se avaliar o valor prognóstico da galectina-1 em pacientes portadores de carcinoma hepatocelular, observou-se que a elevada expressão da galectina-1 foi relacionada à alta taxa de recorrência, baixa sobrevida, invasão vascular, encapsulação incompleta e pobre diferenciação. Os resultados demonstraram que a galectina-1 pode ser considerada um preditor independente para recorrência e taxa de sobrevida em pacientes portadores desse tipo de neoplasia.⁹⁷

Ao se realizar a análise imunoistoquímica em 105 casos de câncer de mama, observaram uma significativa expressão da galectina-1 em células do estroma do carcinoma invasivo em relação ao carcinoma *in situ*, sendo significativamente mais elevado em pacientes com metástases de linfonodos.⁴⁴

Na tentativa de esclarecer o mecanismo molecular da galectina-1 durante a metástase tumoral, foi observado em um estudo ⁹⁷ que a galectina-1 está envolvida na invasão tumoral e metástase pelo aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9 bem como de suas atividades enzimáticas. As MMP são enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular associadas à metástase tumoral e progressão das neoplasias. A galectina-1 foi melhor detectada nas linhagens de células que apresentavam maior potencial de invasão

com conseqüente aumento da expressão das MMP-2 e MMP-9 e de suas atividades enzimáticas. Dessa forma, a galectina-1 é responsável pelo aumento da invasão tumoral, promovendo metástases.

Salienta-se, dessa forma, a importância clínica da expressão da galectina-1 no estroma da lesão como um potencial biomarcador, com a possibilidade de trazer benefícios para o tratamento de pacientes de alto risco e poupando pacientes de baixo risco de tratamentos desnecessários.

2.4.2 Galectina -3

A galectina -3 possui uma região N-terminal não lectina conectada a 1 DRC. É encontrada principalmente no citoplasma das células. Entretanto, uma quantidade significativa dessa proteína pode estar presente no núcleo, o que sugere uma alternância entre esses dois locais.²⁶ Além do núcleo e citoplasma celular, uma quantidade significativa de galectina -3 pode ser encontrada na membrana ou matriz extracelular.⁴⁸ A localização dessa proteína parece estar diretamente relacionada às suas funções, já que alguns autores sugerem que a localização citoplasmática influencia em sua função anti-apoptotática, enquanto a localização nuclear desempenha um papel inverso.³⁵

É uma proteína envolvida em diversos fenômenos biológicos, tais como crescimento celular, adesão, diferenciação, angiogênese e apoptose.⁴⁸ O envolvimento da galectina -3 na tumorigênese parece estar diretamente relacionado à origem histológica do tecido.⁸⁰

Alguns estudos têm demonstrado uma relação próxima entre a expressão da galectina-3 e a agressividade de vários tipos de carcinomas epidermóide de cabeça e pescoço.^{40, 73, 95} A avaliação da expressão da galectina -3 em 54 casos de CE de língua e em 23 de mucosa oral normal demonstrou que a expressão nuclear da galectina-3 diminuiu durante a progressão do epitélio normal para o carcinoma com o inverso ocorrendo em relação à expressão citoplasmática. A expressão aumentada da galectina-3 no citoplasma foi associada a um nível reduzido de sobrevida dos pacientes com carcinoma epidermóide de língua.⁴⁰

Com o objetivo de elucidar o significado clinicopatológico da galectina -3 em carcinoma epidermóide de língua, foi realizada a análise imunoistoquímica da galectina -3 onde foi observada elevada imunoexpressão dessa proteína quando comparada aos tecidos adjacentes normais. Houve uma correlação positiva entre essa expressão e a metástase de linfonodos. No estudo *in vitro*, a superexpressão da galectina -3 promoveu proliferação, migração e invasão celular, aumentando a expressão da proteína Wnt, ativando a B-catenina e induzindo a EMT (transição epitélio-mesenquimal). Dessa forma, a galectina -3 desempenha um importante papel no início e na progressão do carcinoma epidermóide de língua via ativação da Wnt/B-catenina.⁹⁵

A análise da expressão da galectina -3 em 53 casos de CE em estágio avançado de laringe e orofaringe e demonstrou que, em 23 casos (43%) a expressão da galectina -3 foi considerada positiva e em 30 casos (57%), negativa. Os autores sugeriram que uma diminuição nos níveis da expressão da galectina -3 estão associados a um prognóstico desfavorável em carcinoma de orofaringe e laringe.⁷³

Após análise da expressão imunoistoquímica da galectina-3 em lesões melanocíticas e sua correlação com fatores clinicopatológicos, foi observado um aumento da sua expressão dessa proteína quando se comparou nevo e melanoma primário de pequena espessura tanto no núcleo como no citoplasma. No entanto, houve uma diminuição progressiva dessa expressão quando se comparou melanoma primário de pequena espessura com melanomas primários de espessura maior e com o tipo metastático, principalmente no compartimento nuclear. Além disso, os dados da pesquisa revelaram que uma elevada expressão da galectina-3 foi associada a uma melhora na sobrevida em pacientes com melanoma primário. Os autores sugerem que essa proteína possa ter um importante papel na patogênese do melanoma, sendo importante marcador prognóstico para essa patologia.¹⁴

2.4.3 Galectina -7

É uma proteína não-covalente homodimérica com um DRC. Presente principalmente no epitélio escamoso estratificado de várias regiões, como pele, esôfago, língua, tem sua expressão associada à diferenciação e desenvolvimento dos ceratinócitos.^{50, 79, 98} Pode ser encontrada no meio intracelular, tanto no núcleo como no citoplasma, ou no meio extracelular, exercendo diferentes funções de acordo com sua localização.⁵⁰

A galectina -7 contribui para diferentes eventos de diferenciação e desenvolvimento de epitélios estratificados e também é associada à migração das células epiteliais, desempenhando um importante papel na reepitelização de feridas da epiderme e da córnea.^{78, 79}

A expressão da galectina -7 é uma característica inerente ao epitélio estratificado de diversas naturezas. Foi observada a expressão positiva da galectina -7 na epiderme, córnea, laringe, e em carcinomas de células epidermóide da pele, laringe e laringe com metástase de linfonodo. Entretanto, a expressão da galectina -7 foi negativa na amostra de carcinoma de células basais utilizada neste estudo.²⁵

A galectina -7 é abundante em carcinomas epidermóide oral quando comparada com o epitélio normal.²¹ Entretanto, podem haver mudanças na localização da expressão celular dessas proteínas em relação ao núcleo e citoplasma de acordo com a progressão da doença.⁸¹

Os defeitos de apoptose constituem uma das principais características do câncer humano e a galectina -7 pode atuar como um fator regulatório positivo ou negativo em relação ao desenvolvimento tumoral, de acordo com seu tipo histológico.^{78, 79} A galectina -7 tem sua expressão aumentada após ceratinócitos da epiderme sofrerem exposição à radiação ultravioleta B, com conseqüente estabilização da p53, inibição da apoptose e formação de carcinoma epidermóide na região da pele exposta¹¹. No entanto, através da ativação da JNK e liberação do citocromo c mitocondrial após exposição à radiação ultravioleta B, a galectina -7 pode desempenhar papel pró-apotótico.⁴⁴

Ao se comparar a expressão da galectina -7 em 81 casos de carcinoma epidermóide de hipofaringe estágio IV com as expressões das galectinas -1 e -3, foram observados altos níveis de expressão da galectina -7 neste tipo de tumor, principalmente em relação às galectinas -1 e -3 sendo, portanto, associada a um pior prognóstico e alta taxa de recorrência neste tipo de tumor. Dessa forma, a determinação imunistoquímica da expressão da galectina -7 pode ser uma ferramenta útil na identificação de pacientes de alto risco.⁷⁸

Quando amostras de epitélio normal, displasia de baixo e alto grau e carcinoma de células epidermóide de hipofaringe e laringe foram utilizadas e comparadas as expressões das galectinas -1 e -7, foi observado um aumento da expressão da galectina -1 na progressão tumoral bem como mudança de localização do citoplasma para o núcleo. No caso da galectina -7, a expressão aumentou do núcleo para o citoplasma. Esses dados sugerem que o aumento da expressão e a diferente localização dessas proteínas podem estar relacionadas com a carcinogênese inicial, assim como com a progressão neoplásica do carcinoma epidermóide de hipofaringe e laringe.⁸¹

Após análise imunistoquímica da expressão das galectinas -1, -3, -4 e -7 em 65 casos de carcinoma epidermóide de língua, a imunoexpressão da galectina -1 esteve presente em 87,7% dos casos, da galectina -3 em 87,7% e da galectina -7 em 78,3% dos casos. A galectina -1 foi observada intracelularmente principalmente no citoplasma de células do estroma e sua expressão foi relacionada à presença de metástases e estadiamento clínico do tumor. A galectina -3 foi relacionada à presença de metástases e lesões com alto grau de malignidade, sendo expressa principalmente no citoplasma dos ninhos de células neoplásicas. E, por fim, a galectina -7 foi expressa exclusivamente em células neoplásicas, sendo na maioria dos casos, encontrada na membrana e no citoplasma de células tumorais de alto grau de malignidade. Estes autores sugerem o envolvimento dessas proteínas na carcinogênese oral, bem como o uso dessas proteínas como marcadores do comportamento biológico e da progressão tumoral em carcinoma epidermóide de língua.⁴

Em estudo onde a expressão imunistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em 50 espécimes de displasia epitelial oral e em 5 casos de mucosa oral

normal, 33 casos de displasia foram positivos para a galectina -1 e todos os casos de mucosa normal foram negativos. Quanto à galectina -3, houve imunexpressão em 27 casos de displasia e em quatro casos de mucosa normal. Em relação à galectina -7, 44 casos de displasia e quatro casos de mucosa normal apresentaram expressão positiva. Em todos os casos de displasia, o núcleo e o citoplasma foram as localizações mais freqüentes da imunexpressão. Estes autores sugerem que alterações na expressão das galectinas -3 e -7 e em especial a -1, estão envolvidas no processo de transformação do epitélio normal para o displásico.²⁰

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Analisar a expressão das galectinas -1, -3 e -7 através da imunistoquímica, em amostras de carcinoma epidermóide de lábio.

3.2 Específicos

- Relacionar os dados clínicos relativos ao gênero, faixa etária, fatores de risco, estadiamento clínico, tamanho da lesão, bem como dados histomorfológicos dos casos de carcinoma epidermóide de lábio selecionados.
- Avaliar a expressão das galectinas -1, -3 e -7 segundo a intensidade, localização, distribuição e tipo celular nos casos de carcinoma epidermóide de lábio selecionados.
- Correlacionar a expressão imunistoquímica com os dados clínicos: estadiamento clínico, tamanho da lesão (T), metástase regional (N), gradação histológica de malignidade através dos sistemas propostos por Bryne (1998) e OMS (2005), a fim de analisar a imunolocalização dessas proteínas em CE de lábio

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do Estudo

Tratou-se de um estudo transversal, observacional e laboratorial. Esta pesquisa foi caracterizada como uma análise quantitativa da expressão das galectinas -1, -3 e -7 por imunistoquímica no CE de lábio.

4.2 Universo

O universo constou de 150 casos diagnosticados como Carcinoma Epidermóide (CE), localizados em lábio, pesquisados dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de referência do câncer, localizado em João Pessoa - PB, no período de 2008 a 2012 (ANEXO A).

4.3 Amostra

Constou de amostra não probabilística por julgamento. Selecionou-se 30 casos clínicos de CE com localização em lábio, emblocados em parafina, recuperados dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica no Hospital supracitado.

4.4. Critérios de inclusão

Foram incluídos os casos de carcinoma epidermóide de lábio com comprovação diagnóstica microscópica, cujos prontuários continham os dados necessários para a realização do estudo clínico e cujas lâminas histológicas coradas em H/E, bem como os blocos em parafinas estivessem disponíveis.

4.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos os casos de carcinoma epidermóide intra-bucalis e casos com dados clínicos incompletos, ou que os blocos de parafina e as lâminas histológicas coradas em H/E não estivessem disponíveis.

4.6. Estudo Clínico

A partir do livro de registro, foram obtidas informações como: idade, gênero, localização anatômica, número da lâmina e do prontuário. A partir deste, foram coletados os fatores de risco, ocupação, procedência e estadiamento clínico (TNM). Nos casos em que não constavam fatores de risco, ocupações normalmente realizadas sob exposição solar foram levadas em consideração em relação à radiação ultravioleta. Foi garantida a privacidade dos dados de identificação dos pacientes sendo os mesmos mantidos em caráter confidencial. Os dados obtidos foram transcritos para uma ficha confeccionada para esta pesquisa, elaborada pela examinadora (APÊNDICE A).

4.7 Estudo Histomorfológico

As lâminas coradas pela técnica de hematoxilina e eosina de cada caso selecionado foram reavaliadas histopatologicamente por dois patologistas independentes para confirmação do diagnóstico de carcinoma epidermóide e classificados de acordo com os critérios descritos pela Organização Mundial da Saúde (OMS - 2005) e por Bryne (1998).

4.8 Análise da Expressão Proteica

O método da imunistoquímica foi realizado no laboratório Rudolf Virchow, Natal – RN, a fim de detectar a expressão das galectinas -1, -3 e -7.

Os espécimes de CE de lábio fixados em formol a 10% e emblocados em parafina, referentes aos 30 casos, foram submetidos a cortes histológicos de 3 µm de espessura, para cada galectina, os quais foram estendidos em lâminas de vidro silanizadas previamente limpas e desengorduradas. Posteriormente, em cada um dos 30 cortes, foram utilizados os anticorpos primários anti-galectina -1, anti-galectina -3 e anti galectina -7 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), pelo método da streptavidina biotina peroxidase, de acordo com os seguintes passos laboratoriais: Desparafinização, hidratação e recuperação dos sítios antigênicos, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de Hidrogênio 10 vol, 10' a temperatura ambiente, recuperação antigênica (Quadro 2), incubação com os anticorpos primários por 30' a temperatura ambiente e lavagem com TRIS/Tween,

pH 7,4, revelação das reações com cromógeno DAB – (Diaminobenzidine) e contracolorados com Hematoxilina de Mayer, 5' a temperatura ambiente. Lavagem, desidratação, diafanização e montagem.

Como controles positivos foram utilizadas três amostras de tonsilas palatinas, sendo uma para cada reação. Para controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos pela solução diluente dos mesmos

Ao final da fase laboratorial do método imunistoquímico, as lâminas foram submetidas à análise em microscópio de luz em aumentos de 40X e 100X. As células que exibiram coloração acastanhada tanto na membrana como no meio intracelular foram consideradas positivas. Dois patologistas independentes realizaram a análise das galectinas -1, -3 e -7 através da microscopia de luz onde avaliaram a presença ou ausência de marcação e a intensidade, sendo atribuídos os escores 0 para ausência de marcação, escore 1 para fraca marcação, escore 2 para moderada marcação e escore 3 para forte marcação. Foi avaliado também o tipo celular marcado (estroma ou parênquima).⁴⁵ O padrão de distribuição da marcação, conforme a disposição da expressão imunistoquímica, foi classificada em focal ($\leq 30\%$ do epitélio) e difusa ($> 30\%$ do epitélio), adaptado de Sheehan et al.⁸⁵

Quadro 2. Especificidade, Clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-galectinas -1, -3 e -7.

Especificidade	Clone	Tratamento	Diluição	Tempo de Incubação
Galectina-1*	E-2	Citrato 3 x 1	1:3000	30´
Galectina-3*	policlonal	Citrato 3 x 1	1:1000	30´
Galectina-7*	H-8	Sem tratamento	1:3000	30´

FONTE:

*Santa Cruz Biotechnology

4.9 Aspectos Éticos

Esta pesquisa seguiu a resolução 466/12 do CNS (Conselho Nacional de Saúde) que regulamenta a pesquisa em humanos. Para que este estudo fosse realizado, o presente projeto foi encaminhado à Plataforma Brasil, para apreciação do Conselho de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba e aprovado sob Protocolo nº 0481/12, CAAE: 09897112.1.0000.5188 (Anexo B).

4.10 Análise Estatística

Para as variáveis clínicas, uma análise descritiva foi realizada em relação ao gênero, faixa etária, hábitos e localização das lesões.

O software estatístico utilizado foi o Predictive Analytics Software – PASW, versão 18.0.

Nesse trabalho o teste de qui-quadrado (Q^2) foi utilizado para medir as associações entre estadiamento clínico, tamanho da lesão (T), metástase regional (N) e gradação histológica de malignidade através dos sistemas propostos por Bryne (1998) e OMS (2005) do carcinoma epidermóide de lábio e as imunexpressões da galectinas -1, -3 e -7. Para aqueles casos em que o teste binomial é inapropriado (frequências abaixo de 5 ou nulas), o teste exato de Fisher foi aplicado.

Além disso, para avaliar aquelas situações em que existiam apenas duas categorias, um teste para a comparação de duas proporções foi empregado. O nível de significância adotado para os casos estudados foi de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise descritiva dos dados clínicos

Após a análise descritiva dos dados clínicos de 30 casos de carcinoma epidermóide de lábio avaliados, observou-se que o gênero masculino correspondeu à maioria dos casos (60%), sendo as faixas etárias entre 61 a 70 anos e entre 71 a 80 anos as mais prevalentes apresentando o mesmo percentual da amostra (26,7%). Entre os hábitos analisados, a exposição solar predominou correspondendo a 33,3%, seguida pela exposição solar associada ao tabagismo (20%). Em relação à localização, as lesões em lábio inferior foram maioria, correspondendo a 83,3% da amostra total (Tabela 1).

Tabela 1: Relação dos casos de carcinoma epidermóide de acordo com o gênero, faixa etária, hábitos do pacientes e localização da lesão.

		N (%)
Gênero	Masculino	18 (60%)
	Feminino	12 (40%)
Faixa Etária	20 a 30 anos	03 (10%)
	41 a 50 anos	01 (3,3%)
	51 a 60 anos	06 (20%)
	61 a 70 anos	08 (26,7%)
	71 a 80 anos	08 (26,7%)
	81 a 90 anos	03 (10%)
	91 a 100 anos	01 (3,3%)
Hábitos	Exposição solar	10 (33,3%)
	Tabagismo	01 (3,4%)
	Exposição solar +Tabagismo	06 (20%)
	Exposição solar+Tabagismo+Etilismo	03 (10%)
	Não Relatado	10 (33,3%)
Localização da Lesão	Lábio Superior	05 (16,7%)
	Lábio Inferior	25 (83,3%)

Houve um predomínio de lesões pequenas, com 2 cm ou menos em sua maior dimensão (T1), correspondendo a 60% dos casos avaliados. Observou-se ausência de metástase em linfonodos regionais (No) na grande maioria dos casos (93,3%), não sendo detectada metástase à distância em nenhum dos casos avaliados. O Estádio I foi predominante (56,7%) (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição das variáveis TNM e estadiamento em números absolutos (n) e relativos (%)

	N (%)
T1	18 (60%)
T>2	12 (40%)
No	28 (93,3%)
N>1	02 (6,7%)
Mo	30 (100%)
Estadio I	17 (56,7%)
Estádios II/III/IV	13 (43,3%)

5.2 Análise descritiva dos aspectos morfológicos

Evidenciou-se a presença de numerosas pérolas de ceratina, escasso pleomorfismo celular e intenso infiltrado inflamatório nos casos bem diferenciados ou de baixo grau de malignidade (Figura 2). Os casos classificados como moderadamente diferenciados exibiam pouca ceratinização, pleomorfismo celular e nuclear além de hiperchromatismo nuclear (Figura 3). Casos que apresentavam intenso pleomorfismo celular e nuclear, pouca ou nenhuma ceratinização além de escasso infiltrado inflamatório foram considerados pobremente diferenciados ou de alto grau de malignidade (Figura 4). Dos 30 casos de CE de lábio avaliados, 24 (80%) foram, de acordo com o sistema de gradação histopatológica proposto por

Bryne (1998), classificados como de alto grau de malignidade. Pela classificação da OMS (2005), a maioria dos casos foi classificada como moderadamente e pouco diferenciados (56,7%) (Tabela 3).

Tabela 3: Análise comparativa entre os sistemas de gradação histopatológica propostos por Bryne (1998) e OMS (2005) em números absolutos (n) e relativos (%).

		N (%)
Bryne	Baixo Grau	06 (20%)
	Alto Grau	24 (80%)
OMS	Bem diferenciado	13 (43,3%)
	Moderadamente e pouco diferenciados	17 (56,7%)

Todos os casos com localização em lábio superior foram, de acordo com o sistema proposto por Bryne, classificados como de alto grau de malignidade, o mesmo ocorrendo em 19 (76%) dos 25 casos localizados em lábio inferior. De acordo com o sistema proposto pela OMS, todas as lesões em lábio superior foram classificadas como moderadamente a pouco diferenciadas. Entretanto, as lesões localizadas em lábio inferior foram, em 13 (52%) casos, classificadas como bem diferenciadas.

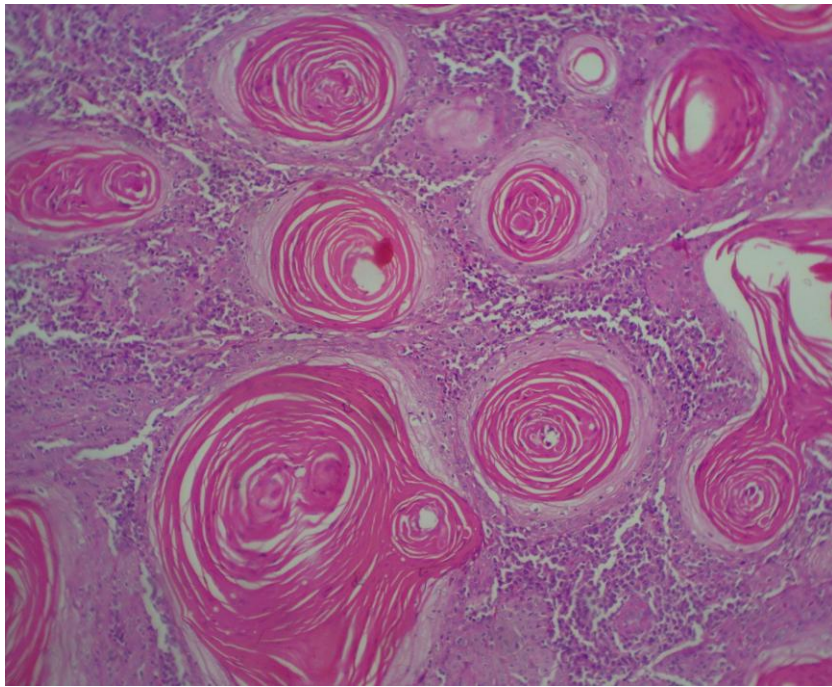


Figura 2: Fotomicrografia de CE de lábio bem diferenciado ou de baixo grau exibindo numerosas pérolas de ceratina e escasso pleomorfismo celular (HE 100X).

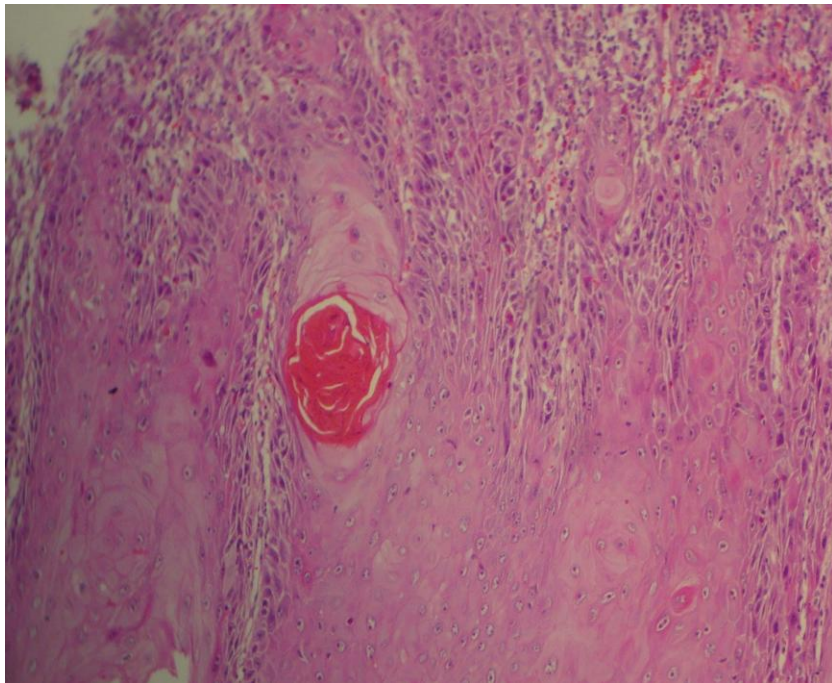


Figura 3: Fotomicrografia de CE de lábio moderadamente diferenciado exibindo cordões neoplásicos com pleomorfismo celular, nuclear e hiper cromatismo nuclear com poucas pérolas de ceratina, classificado como de alto grau pelo sistema proposto por Bryne (1998) (HE 100X).

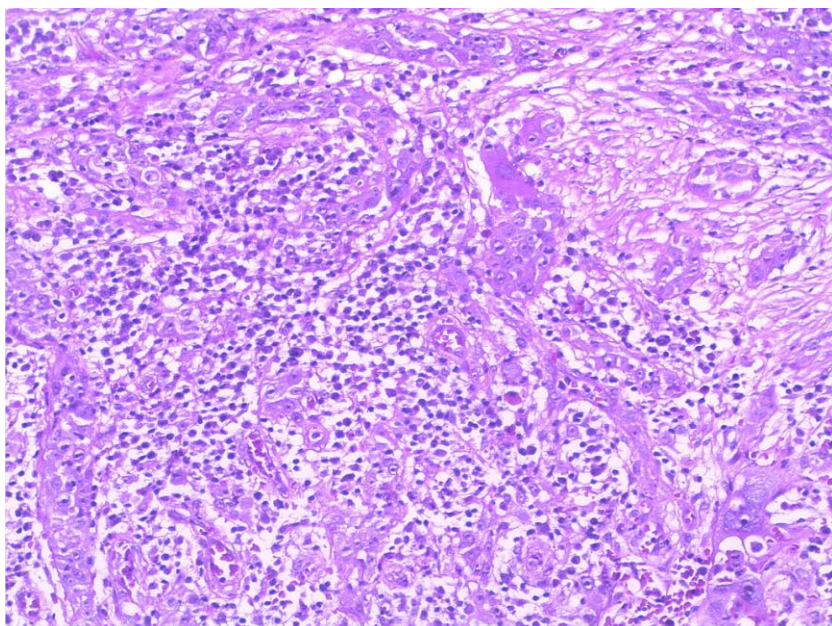


Figura 4: Fotomicrografia de CE em lábio exibindo células neoplásicas pobremente diferenciadas com intenso pleomorfismo e hiper cromatismo celular, classificado como de alto grau pelo sistema proposto por Bryne (1998) (HE, 40X)

5.3 Análise descritiva da imunoposição das galectinas -1, -3 e -7

As imunoposições das galectinas foram avaliadas em relação à presença ou ausência de marcação, distribuição, intensidade, tipo (parênquima ou estroma) e localização celular (núcleo, citoplasma, membrana). O controle positivo, representado por fragmento de tonsila palatina, e o negativo, com ausência do anticorpo primário, foram úteis na demonstração da eficácia da reação (Figuras 5 e 6).

Dos 30 casos avaliados, 28 (93,3%) apresentaram marcação positiva para a galectina -1, tanto no parênquima como nas células do estroma em 57,2% dos casos. No parênquima da lesão, ninhos de epitélio neoplásico exibiam marcação positiva, sendo essa positividade presente também no estroma da lesão, principalmente em fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais (Figura 7). A intensidade de marcação foi de moderada a forte em 22 (78,6%) casos, com padrão de distribuição difuso (60,7%). A localização citoplasmática foi predominante, estando presente em 27 casos (96,4%) (Tabela 4).

A galectina -3 mostrou-se negativa em 17 (56,7%) casos (Figura 8). Nos casos em que a marcação foi considerada positiva, o padrão de distribuição predominante foi o difuso (76,9%) e a intensidade moderada a forte (53,8%). A imunoposição tanto no parênquima como no estroma ocorreu em 61,5% dos casos. No estroma, ocorreu principalmente em células inflamatórias e em fibroblastos. A localização celular da imunomarcação foi mais freqüentemente observada no compartimento citoplasmático (92,3%) (Tabela 4).

Expressão positiva para a galectina -7 esteve presente em todos os 30 (100%) casos analisados. O padrão de distribuição focal foi predominante (53,3%), bem como, a intensidade de marcação de moderada a forte em 28 (93,3%) casos. Houve imunoposição em células do parênquima em 96,7% dos casos, tanto nos ninhos neoplásicos como também no epitélio adjacente à lesão (Figura 9). Em relação à localização celular, o núcleo, citoplasma e a membrana exibiram marcação positiva, sendo a localização nuclear e citoplasmática a mais prevalente (36,7%) (Figuras 10 e 11) (Tabela 4).

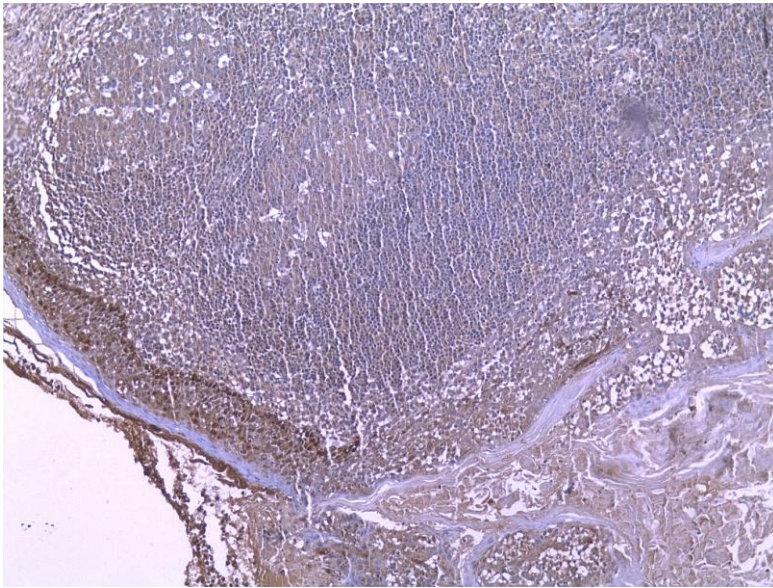


Figura 5: Imunomarcção intensa em fragmento de tonsila palatina (DAB 40X)

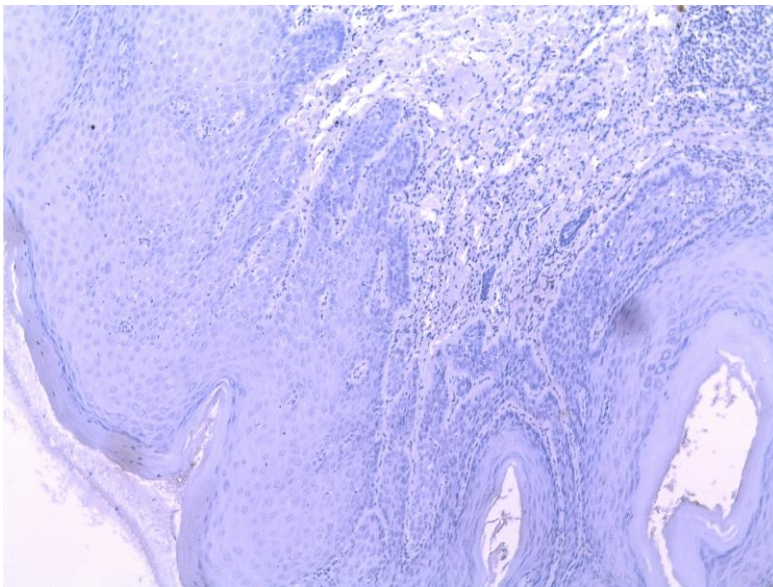


Figura 6: Ausência de imunomarcção em fragmento de carcinoma epidermóide após a omissão do anticorpo primário (DAB 40X)

Tabela 4: Distribuição da imunopressão das Galectinas -1, -3 e -7 de acordo com a presença ou ausência de marcação, distribuição, intensidade, tipo e localização celular

		GALECTINA -1	GALECTINA -3	GALECTINA -7
		N (%)	N (%)	N (%)
Marcação	Positiva	28 (93,3%)	13 (43,3%)	30 (100%)
	Negativa	02 (6,7%)	17 (56,7%)	-
Distribuição	Focal	11 (39,3%)	03 (23,1%)	16 (53,3%)
	Difusa	17 (60,7%)	10 (76,9%)	14 (46,7%)
Intensidade	Fraca	06 (21,4%)	06 (46,2%)	02 (6,7%)
	Moderada/Forte	22 (78,6%)	07 (53,8%)	28 (93,3%)
Tipo celular	Parênquima	02 (7,1%)	03 (23,1%)	29 (96,7%)
	Estroma	10 (35,7%)	02 (15,4%)	01 (3,3%)
	Ambos	16 (57,2%)	08 (61,5%)	-
Localização	Citoplasma	27 (96,4%)	12 (92,3%)	10 (33,3%)
	Núcleo + Citoplasma	01 (3,6%)	01 (7,7%)	11 (36,7%)
	Citoplasma+Membrana	-	-	02 (6,7%)
	Núcleo+Citoplasma+Membrana	-	-	07 (23,3%)

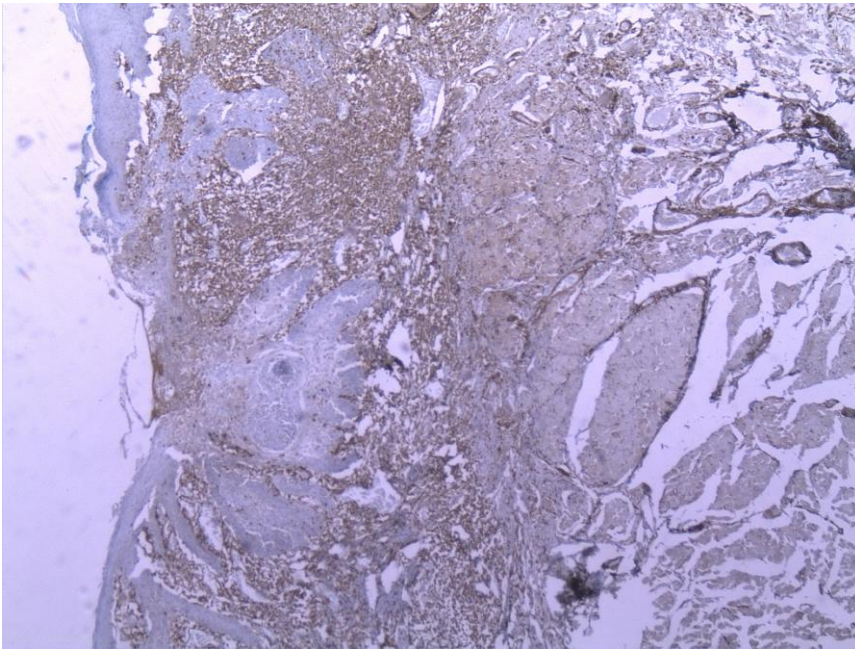


Figura 7: Imunoexpressão da galectina 1 em CE de lábio de alto grau de malignidade exibindo moderada marcação em estroma (DAB 40X).

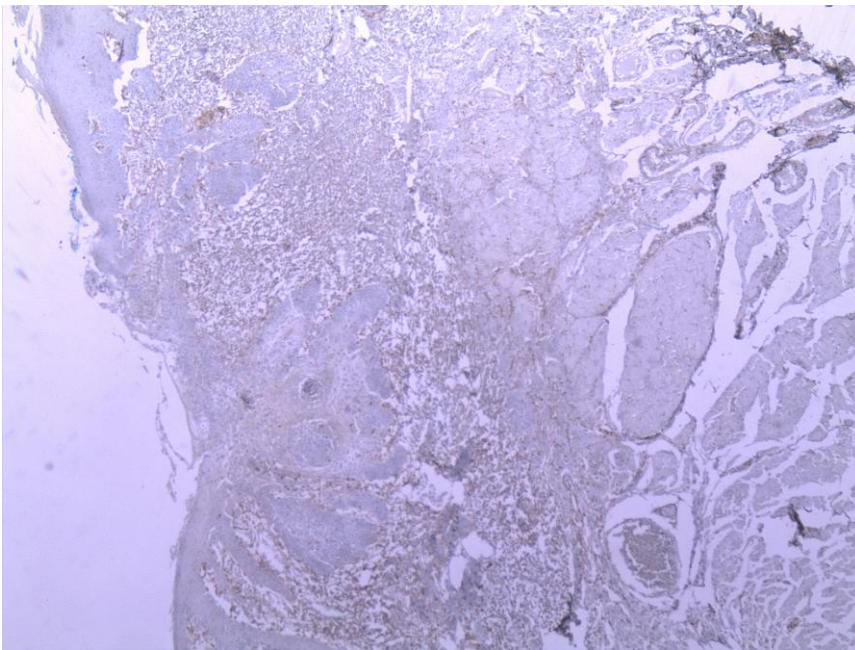


Figura 8: Ausência de imunomarcção da galectina-3 em CE de lábio de alto grau de malignidade (DAB 40X).

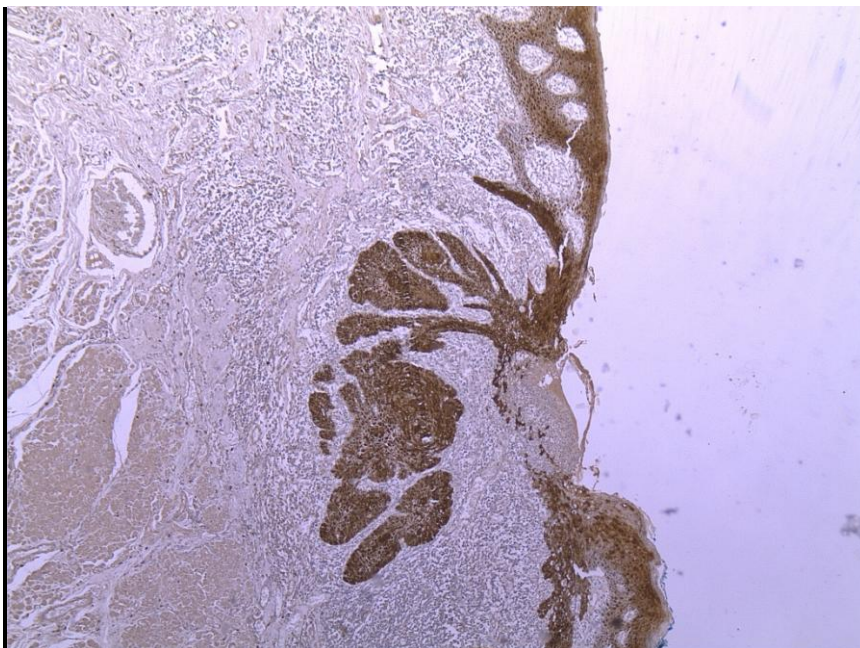


Figura 9: Imunoexpressão da galectina -7 em CE de lábio de baixo grau de malignidade exibindo forte marcação em parênquima (DAB 40X)

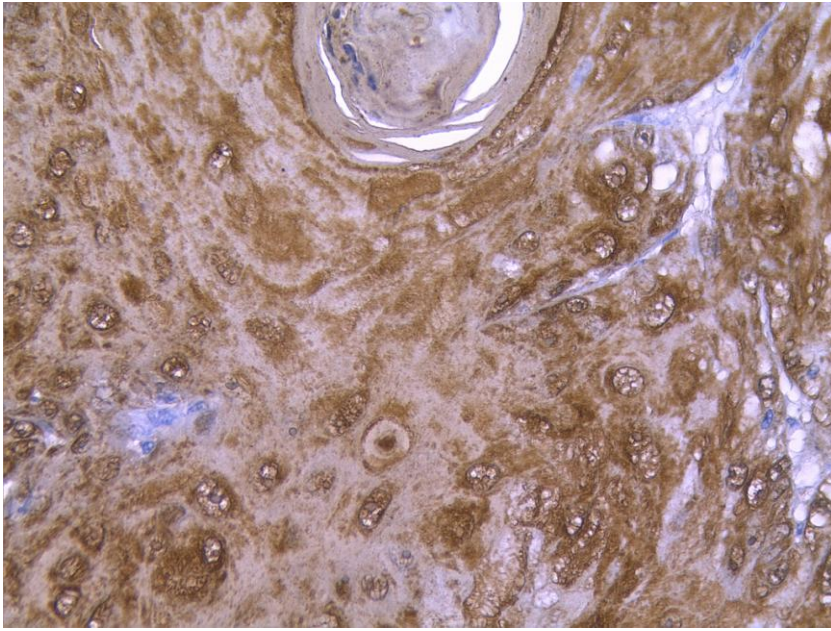


Figura 10: Imunoexpressão da galectina -7 em CE de lábio de alto grau de malignidade exibindo forte marcação nuclear, citoplasmática e membranar (DAB 100X)

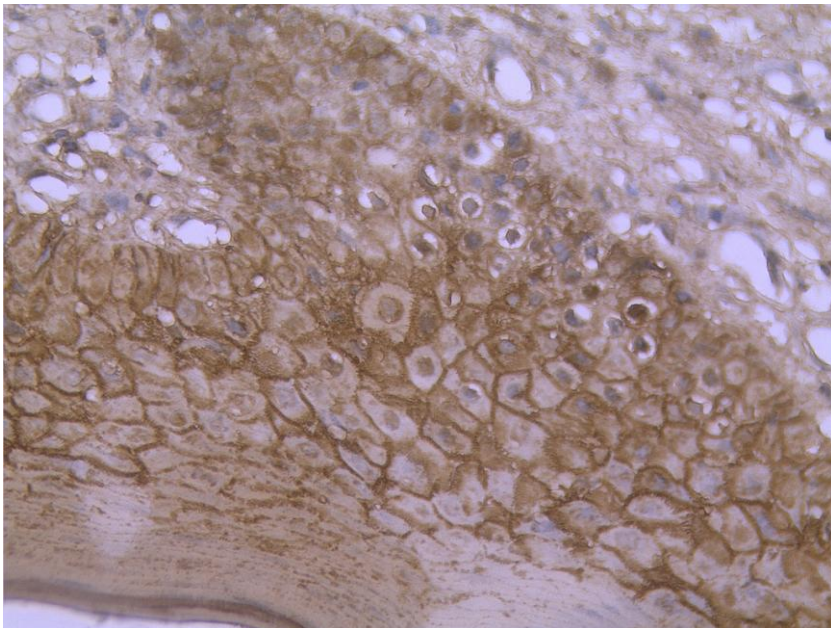


Figura 11: Imunoexpressão da galectina -7 em CE de lábio de alto grau de malignidade exibindo forte marcação, citoplasmática e membranar (DAB 100X)

5.4 Relação entre as variáveis clínicas e a imunexpressão das galectinas -1, -3 e -7

No presente estudo, foi avaliada a imunexpressão das galectinas -1, -3 e -7 quanto à sua marcação positiva ou negativa, distribuição, intensidade, tipo e localização celular. A partir desses dados, foi feita a associação entre estas variáveis e o tamanho da lesão (T), metástase regional (N), gradações histológicas propostas por Bryne (1998) e OMS (2005), além do estadiamento clínico, conforme demonstrado a seguir.

5.4.1 Tamanho da lesão (T)

Conforme demonstra a TABELA 5, não foi verificada nenhuma associação estatisticamente significativa entre as imunexpressões das galectinas -1, -3 e -7 e o tamanho da lesão.

Mesmo não havendo a significância estatística, ainda é possível avaliar a significância clínica dos resultados. Considerando a imunexpressão da galectina -1, nota-se que dos 28 casos que apresentaram marcação positiva, quase 40% (11/28) estão relacionados com lesões de mais de 2 cm em sua maior dimensão; dos 17 casos de galectinas -1 com distribuição difusa, 8 (47,06%) estão relacionados com lesões T>2; em relação à intensidade, 40,91% (9/22) dos casos de galectinas -1 de intensidade moderada ou forte estão associados às lesões com mais de 2 cm; metade dos 10 casos de galectinas -1 que apresentaram imunexpressão em células do estroma estão relacionados às lesões com mais de 2 cm e, por fim, dos 27 casos de galectinas -1 localizadas no citoplasma 11 (40,74%) casos estão associados a lesões com mais de 2 cm em sua maior dimensão.

A imunexpressão da galectina -3 foi considerada negativa em 17 do total de 30 casos, sendo 12 em lesões T1. A marcação positiva foi predominante nos casos T>2 (7 dos 13 casos). Assim como na galectina -1, o padrão de distribuição predominante foi o difuso, bem como a intensidade de marcação moderada a forte. Tanto células do parênquima como do estroma exibiram marcação positiva em ambas as variáveis. Quanto à localização celular, a

imunoexpressão nuclear e citoplasmática foi evidente em 1 caso com T>2, prevalecendo, portanto, a localização citoplasmática, essa ocorrendo em 6 casos nas duas situações (Tabela 5).

Já para os resultados referentes à galectina -7, observa-se que as lesões com mais de 2 cm estão associadas a 40% (12 dos 30 casos) das marcações positivas e em células do parênquima; com padrão de distribuição difuso 57,14% (8 dos 14 casos), intensidade moderada/forte em 39,29% (11 dos 28 casos) e com imunoexpressão citoplasmática 36,36% (4 dos 11 casos).

TABELA 5: Associação entre o tamanho da lesão (T) e as variáveis das galectinas -1, -3 e -7.

Características	GALECTINA -1				GALECTINA -3				GALECTINA -7			
	T1	T>2	Total	Significância (Valor-p)	T1	T>2	Total	Significância (Valor-p)	T1	T>2	Total	Significância (Valor-p)
Marcação												
Positiva	17	11	28	$p^{(2)} = 1,0000$	6	7	13	$p^{(1)} = 0,1758$	18	12	30	$p^{(3)} = 0,3616$
Negativa	1	1	2		12	5	17		-	-	-	
Distribuição												
Focal	8	3	11	$p^{(1)} = 0,4349$	2	1	3	$p^{(2)} = 0,5594$	12	4	16	$p^{(1)} = 0,0730$
Difusa	9	8	17		4	6	10		6	8	14	
Intensidade												
Fraca	4	2	6	$p^{(2)} = 1,0000$	2	4	6	$p^{(2)} = 0,5921$	1	1	2	$p^{(2)} = 1,0000$
Moderada/Forte	13	9	22		4	3	7		17	11	28	
Tipo celular												
Parênquima	2	0	2	$p^{(2)} = 0,5011$	1	2	3	$p^{(2)} = 1,0000$	18	12	30	$p^{(3)} = 0,3616$
Estroma	5	5	10		1	1	2		-	-	-	
Ambos	10	6	16		4	4	8		-	-	-	
Localização												
Citoplasma	16	11	27	$p^{(2)} = 1,0000$	6	6	12	$p^{(2)} = 1,0000$	7	4	11	$p^{(2)} = 0,7817$
Núcleo/Cito	1	0	1		0	1	1		6	5	11	
Cito/Memb	-	-	-		-	-	-		4	1	5	
Núcleo/Cito/Mem	-	-	-		-	-	-		1	2	3	

⁽¹⁾ Teste de associação de qui-quadrado

⁽²⁾ Teste exato de Fisher

⁽³⁾ Teste Binomial para a comparação de proporções

5.4.2 Metástase Regional (N)

De acordo com a TABELA 6, as imunorexpressões das galectinas -1 e -3 não estão associadas significativamente com a presença de metástases regionais. Nos dois casos com metástase regional, houve expressão positiva para a galectina -1 com localização celular citoplasmática. Entre os 17 casos distribuição difusa, 15 apresentavam ausência de metástase regional, sendo predominante também a intensidade de marcação moderada a forte nesses casos (Tabela 6).

Dos 30 casos analisados, 16 com ausência de metástase regional (No) exibiram expressão negativa para a galectina -3. Entre os casos com ausência de metástase regional (No) que exibiram imunorexpressão positiva, o padrão de distribuição difuso foi predominante em 90% dos casos, com intensidade moderada a forte em e com localização citoplasmática (Tabela 6).

Observou-se que houve associação estatisticamente significativa entre a marcação positiva da galectina -7 ($p = 0,0000$) e a expressão desta proteína em células do parênquima ($p = 0,0000$), com os casos em que houve ausência de metástase regional (No). Apesar de não ter havido significância estatística, a intensidade de marcação moderada a forte foi predominante tanto nos casos com ausência de metástase regional (No), como nos casos $N>1$ (Tabela 6).

TABELA 6: Associação entre a presença de metástase regional (N) e as variáveis das galectinas -1, -3 e -7.

Características	GALECTINA -1				GALECTINA -3				GALECTINA -7			
	No	N≥1	Total	Significância (Valor-p)	No	N≥1	Total	Significância (Valor-p)	No	N≥1	Total	Significância (Valor-p)
Marcação												
Positiva	26	2	28	$p^{(2)} = 1,0000$	12	1	13	$p^{(2)} = 1,0000$	28	2	30	$p^{(3)} = 0,0000^*$
Negativa	2	0	2		16	1	17		-	-	-	
Distribuição												
Focal	11	0	11	$p^{(2)} = 0,5053$	3	0	3	$p^{(2)} = 1,0000$	16	0	16	$p^{(2)} = 0,2092$
Difusa	15	2	17		9	1	10		12	2	14	
Intensidade												
Fraca	6	0	6	$p^{(2)} = 1,0000$	6	0	6	$p^{(2)} = 1,0000$	2	0	2	$p^{(2)} = 1,0000$
Moderada/Forte	20	2	22		6	1	7		26	2	28	
Tipo celular												
Parênquima	2	0	2	$p^{(2)} = 0,5767$	3	0	3	$p^{(2)} = 1,0000$	28	2	30	$p^{(3)} = 0,0000^*$
Estroma	10	0	10		2	0	2		-	-	-	
Ambos	14	2	16		7	1	8		-	-	-	
Localização												
					-	-	-		-	-	-	
Citoplasma	25	2	27	$p^{(2)} = 1,0000$	11	1	12	$p^{(2)} = 1,0000$	9	0	9	$p^{(2)} = 0,4506$
Núcleo/Cito	1	0	1		1	0	1		9	2	11	
Cito/Memb	-	-	-		-	-	-		7	0	7	
Núcleo/Cito/Mem	-	-	-		-	-	-		3	0	3	

⁽¹⁾ Teste de associação de qui-quadrado

⁽²⁾ Teste exato de Fisher

⁽³⁾ Teste Binomial para a comparação de proporções

* Resultado significativo ao nível de 5%

5.4.3 Gradação Histológica – OMS (2005)

Em relação à gradação histológica de malignidade proposta pela OMS, os resultados apresentados na TABELA 7 mostram que apenas a galectina -1 demonstrou significância estatística entre a gradação histológica da OMS e uma das variáveis analisadas, o mesmo não ocorrendo com as galectinas -3 e -7.

Existe uma associação significativa ($p=0,0356$) entre tal gradação e a expressão da galectina -1 com tipo celular marcado. Observa-se que a imunopresão em células do estroma estão mais associadas com a gradação bem diferenciada (BD) de malignidade, enquanto que 75% (12/16) dos casos que apresentaram imunopresão positiva para a galectina -1, tanto no parênquima quanto no estroma, estão essencialmente associadas com as gradações de malignidade de moderadamente e pouco diferenciadas.

Apesar de não haver significância estatística, quanto à galectina -3 observou-se, entre os casos que apresentaram expressão negativa, 58,8% (10/17) eram moderadamente a pouco diferenciados. Entre os casos moderadamente a pouco diferenciados que exibiram expressão positiva, a intensidade de marcação moderada a forte foi evidente em 71,4% (5/7) dos casos registrados, com predominância da localização citoplasmática em 58,3% (7/12) (Tabela 7).

Em relação à galectina -7 observou-se intensidade de marcação moderada a forte nas células parenquimatosas em todos os casos. O padrão de distribuição focal foi predominante entre os casos bem diferenciados e a localização citoplasmática e nuclear mais prevalente entre os moderadamente e pouco diferenciados (Tabela 7).

TABELA 7: Associação entre a gradação histológica de malignidade proposta pela OMS e as variáveis das galectinas -1, -3 e -7.

Características	GALECTINA -1				GALECTINA -3				GALECTINA -7			
	BD	MD/PD	Total	Significância (Valor-p)	BD	MD/PD	Total	Significância (Valor-p)	BD	MD/PD	Total	Significância (Valor-p)
Marcação												
Positiva	11	17	28	$p^{(2)} = 1,0000$	5	8	13	$p^{(1)} = 0,8804$	12	18	30	$p^{(3)} = 0,3616$
Negativa	1	1	2		7	10	17		-	-	-	
Distribuição												
Focal	5	6	11	$p^{(1)} = 0,5908$	0	3	3	$p^{(2)} = 0,2308$	7	9	16	$p^{(1)} = 0,6540$
Difusa	6	11	17		5	5	10		5	9	14	
Intensidade												
Fraca	1	5	6	$p^{(2)} = 0,3547$	3	3	6	$p^{(2)} = 0,5921$	0	2	2	$p^{(2)} = 0,5034$
Moderada/Forte	10	12	22		2	5	7		12	16	28	
Tipo celular												
Parênquima	0	2	2	$p^{(2)} = 0,0356^*$	1	2	3	$p^{(2)} = 1,0000$	12	18	30	$p^{(3)} = 0,3616$
Estroma	7	3	10		1	1	2		-	-	-	
Ambos	4	12	16		3	5	8		-	-	-	
Localização												
Citoplasma	11	16	27	$p^{(2)} = 1,0000$	5	7	12	$p^{(2)} = 1,0000$	5	4	9	$p^{(2)} = 0,2645$
Núcleo/Cito	0	1	1		0	1	1		2	9	11	
Cito/Memb	-	-	-		-	-	-		3	4	7	
Núcleo/Cito/Mem	-	-	-		-	-	-		2	1	3	

⁽¹⁾ Teste de associação de qui-quadrado

⁽²⁾ Teste exato de Fisher

⁽³⁾ Teste Binomial para a comparação de proporções

* Resultado significativo ao nível de 5%

5.4.4 Gradação Histológica – Bryne (1998)

Os resultados expostos na TABELA 8 revelam que, no que concerne ao sistema de gradação histológica proposta por Bryne, não houve associação estatisticamente significativa com as galectinas -1 e -3.

Ainda assim, em relação à galectina-1, entre os 28 casos que exibiram marcação positiva, 23 (82,1%) foram classificados como de alto grau de malignidade. A intensidade de marcação moderada a forte e localização citoplasmática também foram mais prevalentes em casos classificados como de alto grau, com 86,4% e 81,5% respectivamente. Quanto à galectina -3, dos 17 casos com expressão negativa, 14 apresentavam alto grau de malignidade (Tabela 8).

Houve associação significativa ($p=0,0014$) entre a marcação positiva para a galectina -7 e sua expressão em células do parênquima, com a gradação histológica proposta por Bryne, principalmente em casos classificados como de alto grau de malignidade (Tabela 8).

TABELA 8: Associação entre a gradação histológica de malignidade proposta por Bryne e as variáveis das galectinas -1, -3 e -7.

Características	GALECTINA -1				GALECTINA -3				GALECTINA -7			
	Baixo Grau	Alto Grau	Total	Significância (Valor-p)	Baixo Grau	Alto Grau	Total	Significância (Valor-p)	Baixo Grau	Alto Grau	Total	Significância (Valor-p)
Marcação												
Positiva	5	23	28	$p^{(2)} = 0,3655$	3	10	13	$p^{(2)} = 1,0000$	6	24	30	$p^{(3)} = 0,0014^*$
Negativa	1	1	2		3	14	17		-	-	-	
Distribuição												
Focal	2	9	11	$p^{(2)} = 1,0000$	2	1	3	$p^{(2)} = 0,1084$	2	14	16	$p^{(2)} = 0,3778$
Difusa	3	14	17		1	9	10		4	10	14	
Intensidade												
Fraca	2	4	6	$p^{(2)} = 0,2855$	2	4	6	$p^{(2)} = 0,5594$	0	2	2	$p^{(2)} = 1,0000$
Moderada/Forte	3	19	22		1	6	8		6	22	28	
Tipo celular												
Parênquima	0	2	2	$p^{(2)} = 0,5584$	2	1	3	$p^{(2)} = 0,1469$	6	24	30	$p^{(3)} = 0,0014^*$
Estroma	3	7	10		0	2	2		-	-	-	
Ambos	2	14	16		1	7	8		-	-	-	
Localização												
Citoplasma	5	22	27	$p^{(2)} = 1,0000$	3	9	12	$p^{(2)} = 1,0000$	2	8	10	$p^{(2)} = 0,7833$
Núcleo/Cito	0	1	1		0	1	1		2	9	11	
Cito/Memb	-	-	-		-	-	-		2	4	6	
Núcleo/Cito/Mem	-	-	-		-	-	-		0	3	3	

⁽¹⁾ Teste de associação de qui-quadrado

⁽²⁾ Teste exato de Fisher

⁽³⁾ Teste Binomial para a comparação de proporções

* Resultado significativo ao nível de 5%

5.4.5 Estadiamento clínico

Para os dados experimentais coletados no estudo, não houve evidências estatísticas de associação entre as imunoexpressões das galectinas -1, -3 e -7 e o grau de estadiamento clínico das lesões, segundo os resultados apresentados na TABELA 9. Ainda assim, é possível inferir que, em relação à galectina -1, as lesões com estadiamentos II/III/IV estão associadas à distribuição difusa, intensidade moderada a forte, em células do parênquima e estroma, com localização citoplasmática. Quanto à galectina -3, a maior parte das lesões com estadiamento I, apresentaram marcação negativa. Todos os casos exibiram expressão positiva para a galectina -7, sendo a maioria lesões com estadiamento I, distribuição focal, intensidade moderada a severa em células do parênquima (Tabela 9).

TABELA 9: Associação entre o estadiamento clínico e as variáveis das galectinas -1, -3 e -7.

Características	GALECTINA -1				GALECTINA -3				GALECTINA -7			
	I	II/III/IV	Total	Significância (Valor-p)	I	II/III/IV	Total	Significância (Valor-p)	I	II/III/IV	Total	Significância (Valor-p)
Marcação												
Positiva	16	12	28	$p^{(2)} = 1,0000$	6	7	13	$p^{(1)} = 0,3096$	17	13	30	$p^{(3)} = 0,5847$
Negativa	1	1	2		11	6	17		-	-	-	
Distribuição												
Focal	8	3	11	$p^{(2)} = 0,2530$	2	1	3	$p^{(2)} = 0,5594$	12	4	16	$p^{(2)} = 0,0634$
Difusa	8	9	17		4	6	10		5	9	14	
Intensidade												
Fraca	4	2	6	$p^{(2)} = 0,6730$	2	4	6	$p^{(2)} = 0,5921$	1	1	2	$p^{(2)} = 1,0000$
Moderada/Forte	12	10	22		4	3	7		16	12	28	
Tipo celular												
Parênquima	2	0	2	$p^{(2)} = 0,4988$	1	2	3	$p^{(2)} = 1,0000$	17	13	30	$p^{(3)} = 0,5847$
Estroma	5	5	10		1	1	2		-	-	-	
Ambos	9	7	16		4	4	8		-	-	-	
Localização												
Citoplasma	15	12	27	$p^{(2)} = 1,0000$	6	6	12	$p^{(2)} = 1,0000$	5	4	9	$p^{(2)} = 0,3284$
Núcleo/Cito	1	0	1		0	1	1		5	6	11	
Cito/Memb	-	-	-		-	-	-		6	1	7	
Núcleo/Cito/Mem	-	-	-		-	-	-		1	2	3	

⁽¹⁾ Teste de associação de qui-quadrado

⁽²⁾ Teste exato de Fisher

⁽³⁾ Teste Binomial para a comparação de proporções

6 DISCUSSÃO

A etiopatogenia do carcinoma epidermóide de lábio está relacionada a vários fatores: a exposição solar ultravioleta, o tabaco e o álcool em associação com o tabagismo.^{6, 29, 63, 64, 72, 77, 83, 88} Dos 30 casos avaliados no presente estudo, foi observado que 10 pacientes (33,3%) apresentaram histórico de exposição solar e 6 (20%), exposição solar associada a tabagismo. Apesar do grande número de casos com informações insuficientes 10 (33,3%), é possível observar a importância desses fatores na carcinogênese labial. Em concordância com o presente estudo, uma pesquisa realizada na Espanha observou relação direta entre a exposição solar e o uso do tabaco com o surgimento de CE de lábio. Os autores afirmam que o hábito de deixar o cigarro apoiado no lábio é um fator de risco para o surgimento desta lesão, independentemente do efeito cumulativo do tabaco.⁶⁰

As informações de 30 casos de carcinoma epidermóide de lábio referentes ao gênero, faixa etária, fatores de exposição e localização da lesão, foram analisadas. Concordando com a literatura, no presente estudo, foi observado que pacientes do gênero masculino, com idade média acima dos 50 anos foram os mais freqüentemente acometidos.^{8, 41, 67, 83, 100} Desses casos, 60% pertenciam ao gênero masculino. Tal fato pode ser explicado pelo uso de cosméticos no lábio (batom), que pode apresentar um efeito protetor, como também por participarem com menos freqüência de atividades ocupacionais relacionadas à exposição solar.⁶²

Em relação à faixa etária acometida, constatou-se uma maior prevalência em pacientes com idade entre 61 a 80 anos, provavelmente em razão do efeito cumulativo à exposição prolongada a fatores de risco, tais como a exposição solar, o tabaco e o álcool.^{10, 29, 43, 62, 83, 100} Entretanto, o número de pacientes jovens acometidos por essa patologia vem aumentando consideravelmente, sendo esta incidência explicada pela exposição ao vírus HPV além de influências hereditárias para o desenvolvimento de fatores intrínsecos que facilitam o surgimento desta condição.⁶⁴

A carcinogênese envolve várias etapas de alterações genéticas e mudanças fenotípicas. Pesquisas têm sido realizadas a fim de conhecer o que pode influenciar no prognóstico dos pacientes portadores do CE. Fatores como a localização do tumor, estadiamento clínico e gradação histológica de malignidade são levados em consideração. No entanto, tumores com características clínicas e histopatológicas semelhantes podem apresentar diferentes padrões de comportamento e crescimento. Dessa forma, ferramentas que facilitem o conhecimento do comportamento do CE são importantes para a escolha do tratamento mais adequado em cada caso.

Em relação ao tamanho da lesão (T), foi constatada uma predominância de lesões com até 2 cm em sua maior dimensão (60%). Além disso, evidenciou-se ausência de metástases regionais (N) em 93,3% dos casos e de metástase à distância todos eles. O estágio I, no qual se observam lesões de até 2 cm, ausência de linfonodos regionais e de metástase à distância, foi o mais observado (56,7%), demonstrando que pacientes com CE de lábio, no momento do diagnóstico, apresentam estadiamento clínico precoce e ausência de metástase cervical, provavelmente pela facilidade de visualização dessas lesões, especialmente quando comparadas a lesões intraorais.^{8, 76, 90, 100}

Na presente pesquisa, as características morfológicas dos casos de CE de lábio foram estudadas através de dois sistemas de gradação histológica de malignidade: o sistema proposto por Bryne (1998), em que o “front” de invasão tumoral é avaliado em relação à vários aspectos morfológicos, sendo atribuídos scores aos mesmos, e o recomendado pela OMS (2005), baseado no grau de diferenciação celular, por ser amplamente utilizado.

Tumores classificados de acordo com Bryne (1998) como de alto grau foram predominantes (80%), assim como tumores classificados pela OMS como moderadamente a pouco diferenciados (60%). Esses dados divergem de alguns trabalhos na literatura, em que tumores bem diferenciados foram mais prevalentes.^{5, 8, 90} No entanto, em estudo realizado por Sena, Costa, Ferreira,⁸³ também no Nordeste brasileiro, em carcinoma epidermóide de lábio, o tipo moderadamente diferenciado foi o mais prevalente, concordando, portanto, com os resultados desta pesquisa.

Analisando as lesões de CE de lábio, separando-as de acordo com a localização, foi observado que a maioria das lesões ocorreu em lábio inferior (83,3%). Entre as lesões localizadas em lábio superior, todas foram classificadas como moderadamente a pouco diferenciadas ou de alto grau. As lesões localizadas em lábio inferior, foram em 52% dos casos, classificadas como bem diferenciadas, sendo esses resultados concordantes com os encontrados na literatura ²⁴. Entretanto, de acordo com a classificação proposta por Bryne, 76% das lesões em lábio inferior foram classificadas como de alto grau, divergindo, portanto, do estudo de Souza, Freitas, Miranda,⁸⁹ em que todos os casos localizados em lábio inferior foram classificados como de baixo grau de malignidade.

Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de identificar biomarcadores que ajudem na compreensão do comportamento tumoral, contribuindo, dessa forma, para o tratamento clínico. As galectinas têm sido utilizadas nos estudos de vários tipos de patologias, bem como, em tumores da cavidade oral. ^{4, 17, 20, 22, 23, 37, 40, 42, 99}

Em relação à galectina -1, os resultados encontrados no presente estudo demonstram que esta proteína esteve expressa em 28 (93,3%) casos, marcando células do parênquima e do estroma em 16 (57,2%) casos, com intensidade moderada a forte em 22 (78,6%) casos. Embora grande parte dos autores relatem ausência da expressão da galectina -1 no parênquima, ^{23, 49, 71, 97} os achados do presente estudo corroboram os resultados encontrados por Jung et al. ⁴⁴ em que houve expressão positiva da galectina -1 tanto no parênquima e quanto no estroma em casos de câncer de mama.

Utilizando análises estatísticas, associamos a expressão da galectina -1 ao tamanho da lesão (T), metástase regional (N), gradação histológica de malignidade utilizando dois sistemas, Bryne e OMS, e estadiamento clínico.

Em estudo realizado em amostras de tecido sadio e câncer de mama, foi observado que houve um significativo aumento da expressão da galectina -1 em todos os cortes afetados pela neoplasia quando comparados com amostras de tecido sadio, havendo uma associação estatisticamente positiva entre a expressão da galectina -1 em células do estroma e a invasão tumoral,

estadiamento TNM, tamanho da lesão (T) e metástase de linfonodos. Os autores sugerem que a galectina -1 desempenha um importante papel na progressão tumoral através de interações no estroma da lesão.⁴⁴

Constatou-se que houve associação estatística ($p=0,0356$) apenas entre a expressão da galectina -1 e o tipo celular marcado ao se utilizar o sistema de gradação histológica proposta pela OMS. Foi observado que a imunexpressão em células do estroma estão relacionadas aos casos classificados como bem diferenciados. Entretanto, os casos que foram classificados como moderadamente a pouco diferenciados, exibiram expressão tanto no parênquima quanto no estroma. Apesar de não ter associação estatística, observamos que a maioria dos casos classificados como de alto grau, de acordo com Bryne, também exibiram expressão tanto no parênquima quanto no estroma. Esses dados concordam com a pesquisa realizada por Chiang et al.²³, em que o autor observa a imunexpressão dessa proteína em células do epitélio e estroma durante a progressão do câncer oral. A expressão dessa proteína em células do estroma pode ser resultado da secreção das células neoplásicas, provavelmente mediadas por fatores tumorais.⁴

No presente estudo, em relação à localização celular de marcação, observou-se que dos 28 (93,3%) casos positivos para a galectina -1, a expressão exclusivamente citoplasmática esteve presente em 27 (96,4%) casos, sem, entretanto, apresentar diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros utilizados. Zhong et al.⁹⁹ observaram, através da imunistoquímica em amostras de carcinoma epidermóide oral, observaram que a imunomarcação da galectina -1 ocorreu fortemente no citoplasma dessas células. Além disso, tumores classificados como moderadamente e pouco diferenciados, exibiram uma forte expressão para essa proteína, com o oposto ocorrendo nos tumores classificados como bem diferenciados. Semelhante aos nossos resultados, não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão da galectina -1 e a presença de metástases regionais. Ainda assim, podemos inferir que essa proteína exerce importante participação na carcinogênese oral.

A galectina -3 é expressa em uma variedade de tecidos e tipos celulares, sendo amplamente encontrada no citoplasma. No entanto, pode

também estar presente no núcleo, dependendo do tipo celular ou do estágio proliferativo da célula.⁴⁸ A galectina -3 desempenha um importante papel na adesão, proliferação, diferenciação, angiogênese e apoptose.^{14,53}

Nesta pesquisa não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa da expressão da galectina -3 com os parâmetros utilizados (tamanho da lesão, metástase de linfonodos, gradação histológica de malignidade estadiamento clínico). Além disso, no presente estudo, a imunoexpressão negativa da galectina-3 foi observada em 17 (56,7%) dos 30 casos analisados, divergindo de diversos estudos na literatura realizados em outras localizações.^{4, 32, 36, 40} Entretanto, nossos resultados concordam com estudo realizado em amostras de adenocarcinoma prostático, hiperplasia benigna da próstata e próstata normal, em que foi observado uma diminuição da expressão imunoistoquímica da galectina -3 com a progressão da neoplasia.⁷

Em estudo realizado em amostras de tecido cervical normal, lesões intra-epiteliais de baixo grau, lesões intra-epiteliais de alto grau e carcinoma epidermóide cervical, foi observado, através da imunoistoquímica, que a expressão da galectina-3 foi forte em todas as amostras de tecido normal, com uma diminuição progressiva de acordo com a progressão da neoplasia. Diante do exposto, podemos sugerir que a galectina -3 parece exercer diferentes funções de acordo com o tipo celular onde se encontra expressa.⁵⁵

Nos casos em que a imunoexpressão foi positiva, a localização citoplasmática foi predominante, presente em 92,3% dos casos, distribuição difusa (76,9%), com intensidade de marcação moderada a forte (53,8%).

A avaliação imunoistoquímica da galectina -3 em casos de carcinoma epidermóide de língua demonstrou que esta proteína esteve presente em 87,7% dos casos avaliados, havendo associação estatisticamente positiva com a presença de metástase e o grau histológico de malignidade. No presente estudo, os casos com imunoexpressão negativa foram classificados como moderadamente a pouco diferenciados (58,3%), de acordo com a OMS ou de alto grau de malignidade (82,3%), de acordo com o sistema proposto por Bryne.

Entre os 13 casos que exibiram expressão positiva para a galectina -3 12 apresentaram marcação citoplasmática. Em amostras de CE de língua, a expressão nuclear da galectina -3 diminui durante a transformação do epitélio normal para o neoplásico, com o inverso ocorrendo na expressão citoplasmática.⁴⁰ Tais resultados sugerem que a mudança de compartimento celular da galectina-3 do núcleo para o citoplasma durante a progressão tumoral possa servir como fator prognóstico também em casos de CE de lábio.

A galectina -7 contribui para diferentes eventos associados à diferenciação e desenvolvimento de epitélio estratificado.⁷⁹ Entre as galectinas estudadas, a -7 foi a única presente em todos os casos de CE de lábio. Além disso, a imunoexpressão dessa proteína ocorreu em células parenquimatosas em 29 (96,7%) casos, com intensidade moderada a forte (93,3%). Esses resultados podem ser justificados pelo fato da galectina -7 estar profundamente envolvida com a fisiologia do tecido epitelial.

Após a utilização dos testes estatísticos, foi possível demonstrar no presente estudo uma associação estatisticamente positiva da expressão da galectina -7 em células do parênquima com metástase regional ($p=0,0000$) e com a gradação histológica proposta por Bryne ($p=0,0014$), principalmente nos casos classificados como de alto grau, concordando com outros estudo.⁴ Dos 30 casos positivos para esta proteína, 24 apresentaram imunoexpressão em células do parênquima, sendo em alguns casos, expressa tanto nos ninhos neoplásicos como no epitélio adjacente. Apesar da localização nuclear e citoplasmática estar presente na maioria dos casos, foi possível observar imunoexpressão membranar dessa proteína, o que não ocorreu com as demais galectinas estudadas.

De acordo com Carvalho et al.²⁰ o deslocamento da galectina -7 da membrana para o meio intracelular sugere seu envolvimento com a progressão do epitélio normal para as displasias de baixo e alto graus. Saussez et al.⁸¹ observaram uma deslocamento da expressão da galectina -7 do citoplasma para o núcleo, durante a progressão tumoral, em casos de carcinoma epidermóide de laringe e hipofaringe. Esses dados demonstram que a mudança de localização dessa proteína pode estar relacionada à progressão tumoral.

Como foi demonstrado por alguns autores,^{11, 50} há um aumento da expressão da galectina -7 nos ceratinócitos após a exposição à radiação ultravioleta B. Tal fato pode explicar a freqüente expressão dessa proteína em casos de CE de lábio, servindo, dessa maneira, como um marcador desse tipo de lesão.

Em contrapartida, a expressão da galectina -7 pode diminuir com a progressão tumoral, como por exemplo, no câncer gástrico, em que se observou uma diminuição da expressão da galectina -7 em pacientes com estadiamento clínico avançado.⁴⁷ Dessa forma, a galectina -7 pode representar um alvo promissor para pesquisas relacionadas ao diagnóstico e prognóstico do câncer.

Novos estudos são necessários a fim de detalhar a participação dessas proteínas durante a transformação neoplásica a fim de utilizá-las como marcador preditivo da invasão tumoral e metástase. Portanto, sugerimos a possibilidade de utilização dessas proteínas como marcadores do comportamento biológico em casos de carcinoma epidermóide de lábio.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados desta pesquisa, podemos concluir que:

1. Em relação ao gênero, faixa etária acometida e hábitos, os nossos achados corroboram os dados encontrados na literatura, prevalecendo os tumores classificados de acordo com o sistema proposto por Bryne como de alto grau de malignidade e, de acordo com a OMS, como moderadamente a pouco diferenciados.
2. As galectinas -1 e -7 tiveram imunexpressão positiva, intensidade de marcação moderada a forte, na maioria dos casos, o mesmo não ocorrendo com a galectina -3, que demonstrou imunexpressão negativa na maioria dos casos analisados.
3. A expressão das galectinas -1 e -7 é bem evidente em casos de CE de lábio, havendo associação estatisticamente positiva entre a imunexpressão da galectina -1 e a gradação histológica de malignidade proposta pela OMS, assim como entre a imunexpressão da galectina -7, metástase regional e gradação histológica de malignidade proposta por Bryne. Apesar de não ter havido associação estatisticamente significativa entre a galectina -3 e as variáveis estudadas, observamos que houve imunexpressão positiva dessa proteína em alguns casos analisados. Dessa forma, sugerimos que as galectinas -1, -3 e -7 possam servir como marcadores do comportamento biológico em casos de carcinoma epidermóide de lábio.

REFERÊNCIAS*

1. ABREU MAMM, PIMENTEL DRN, SILVA OMP, BLACHMAN IT, MICHALANY N, HIRATA CH et al. Carcinoma espinocelular do lábio: avaliação de fatores prognósticos. Rev Bras Otorrinolaringol 2004, 70(6):765-770.
2. ALMEIDA JRC, PEDROSA NL, LEITE JB, FLEMING TRP, CARVALHO VH, CARDOSO AAA. Marcadores tumorais: Revisão de literatura. Revista Brasileira de Cancerologia 2007, 53(3): 305-316.
3. ALMKVIST J, KARLSSON A. Galectins as inflammatory mediators. Glycoconjugate Journal 2004, 19:575-581.
4. ALVES PM, GODOY GP, GOMES DQ, MEDEIROS AMC, SOUZA LB, SILVEIRA EJD. Significance of galectins -1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. Pathology-Research and Practice 2011, 207:236-240.
5. ANTUNES AA, ANTUNES AP. Estudo retrospectivo e revisão de literatura dos tumores dos lábios: experiência de 28 anos. Revista Brasileira de Cancerologia 2004; 50(4): 295-300.
6. ANTUNES JLF, TOPORCOV TN, BIAZEVIC MGH, BOING AF, SCULLY C, PETTI S. Joint and independent effects of alcohol drinking and tobacco smoking on oral cancer: A large case-control study. PLOS ONE 2013, 8(7):1-7.
7. ARAÚJO-FILHO JLS, MELO-JUNIOR MR, LINS CAB, LINS RAB, MACHADO MCFP, CARVALHO JUNIOR LB et al. Galectina-3 em tumores de próstata: imuno-histoquímica e análise digital de imagens. J Bras Patol Med Lab 2006, 42(6):469-475.
8. BATISTA AC, COSTA NL, LEITE AFO, MENDONÇA EF, ALENCAR RC, SILVA TAI. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010; 109: e74-e79.
9. BARONDES SH, COOPER DNW, GITT MA, LEFFLER H. Galectins: Structure and functions of a large family of animal lectins. The Journal of Biological Chemistry 1994, 269(33): 20807-20810.
10. BARZAGA HOV, CABRERA AR, ATENCIO JCV, VEJA DN. Carcinoma epidermóide infiltrante. Reporte de um caso. Archivo Médico de Camagirey 2007, 11(5): 1-7.

11. BERNERD F, SARASIN A, MAGNALDO T. Galectin -7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced subburn keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 11329-11334.
12. BRAY F, REN JS, M E, FERLAY J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2013; 132: 1133-1145.
13. BREUNINGER H, SCHAUMBURG-LEVER G, HOLZSCHUH J, HORN Y HP. Desmoplastic Squamous Cell Carcinoma of Skin and Vermilion Surface. *Cancer* 1997,79(5): 915-919.
14. BROWN ER, DOIG T, ANDERSON N, BRENN T, DOHERTY V, XU Y et al. Association of galectin -3 expression with melanoma progression and prognosis. *European Journal of Cancer* 2012, 48: 865-874.
15. BRYNE M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral diseases* 1998, 4: 70-77.
16. CAMBY I, LE MERCIER M, LEFRANC F, KISS R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 2006, 16(11):137R – 157R.
17. CAMPION CG, LABRIE M, LAVOIE G, ST-PIERRE Y. Expression of galectin-7 in breast cancer cells by mutant p53. *PLOS ONE* 2013, 8(8): 1-10.
18. CAPELOZZI VL. Entendendo o papel dos marcadores biológicos no câncer de pulmão. *J Pneumol* 2001, 27(6): 321-328.
19. CARVALHO MB, LENZI J, LEHN CN, FAVA AS, AMAR A, KANDA JL et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. *Rev Ass Med Brasil* 2001; 47 (3): 208-14.
20. CARVALHO MV, PEREIRA JS, ALVES PM, SILVEIRA EJD, SOUZA LB, QUEIROZ LMG. Alterations in the immunoexpression of galectins - 1, -3 e -7 between different grades of oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med* 2013, 42: 174-179.
21. CHEN J, HE QY, YUEN APW, CHIU JF. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: The involvement of multiple pathways in tumorigenesis. *Proteomics* 2004, 4:2465-2475.
22. CHEN YR, J HF, HUANG HC, HUANG HH, LEE YJ, LIAO MY et al. Quantitative proteomic and genomic profiling reveals metastasis – related protein expression patterns in gastric cancer cells. *Journal of Proteome Research* 2006, 5(10): 2727-2742.

23. CHIANG W F, LIU SY, FANG LY, LIN CN, WU MH, CHEN YC et al. Overexpression of galectin -1 at the tumor invasion front is associated with poor prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2008, 44: 325-334.
24. CHIDZONGA MM, MAHOMVA L. Squamous cell carcinoma of the oral cavity maxillary antrum and lip in a Zimbabwean population: A descriptive epidemiological study. *Oral Oncology* 2006, 42:184-189.
25. CHOVANEC M, SMETANA K, PLZÁK J, BETKA J, PLZAKOVA Z, STORK J et al. Detection of New Diagnostic Markers in Pathology by Focus on Growth-regulatory Endogenous Lectins. The case study of Galectin-7 in Squamous Epithelia. *Prague Medical Report* 2005, 106(2): 209-216.
26. DAVIDSON PJ, DAVIS MJ, PATTERSON RJ, RIPOCHE MA, POIRIER F, WANG JL. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology* 2002, 12(5):329-337.
27. DEDIVITIS RA, FRANÇA CM, MAFRA ACB, GUIMARÃES FT, GUIMARÃES AVI. Características clinic-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 2004; 70(1): 35-40.
28. DEMATHE A, GARCIA JF, MATTAR NJ, SIMONATO LE, MIYAHARA GI. Detecção do papilomavírus humano (HPV) em carcinoma espinocelular de lábio: correlação com aspectos clínicos e fatores de risco. *Rev Bras Epidemiol* 2011; 14 (1): 98-105.
29. DIAZ JCQ, GIRALT MQ. *Acta Odontológica Venezolana* 2009; 47(1):1-8.
30. ELIAZ I. The role of galectin -3 as a marker of câncer and inflammation in a stage IV ovarian câncer patient with underlying pro-inflammatory comorbidities. *Case Rep Oncol* 2013, 6: 343-349.
31. ELOLA M T, CHIESA ME, ALBERTI AF, MORDOH J, FINK NE. Galectin-1 receptors in different cell types. *Journal of Biomedical Science* 2005, 12:13-29.
32. FARIA PR, MELO TL, CHAMMAS R, SOUZA KCN, CARDOSO SV, LOYOLA AM. Estudo da expressão de galectina -3 em carcinomas de língua de camundongos. *J Bras Patol Med Lab* 2008, 44(3): 221-226.
33. FERRIS RL Progress in Head and Neck Cancer Immunotherapy: Can tolerance and Immune Suppression be reversed? *ORL* 2004, 66:332-340.

34. FRONIE A, BUNGET A, AFREM E, PREOTESCU LL, PUSCU DC, STREBA L et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. *Rom J Morphol Embryol* 2013, 54(2): 343-348.
35. FUKUMORI T, KANAYAMA H, RAZ A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. *Drug Resistance Updates* 2007, 10:101-108.
36. GILLENWATER A, XU XC, EL NAGGAR AK, CLAYMAN GL, LOTAN R. Expression of galectins in Head and Neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 1996, 18: 422-432.
37. GRANDIS JR, PIETENPOL JA, GREENBERGER JS, PELROY RA, MOHLA S. Head and Neck Cancer: Meeting Summary and Research opportunities. *Cancer Research* 2004, 64: 8126-8129.
38. HERNÁNDEZ-GUERREIRO JC, JACINTO-ALEMÁN LF, JIMÉNEZ-FARFÁN MD, MACARIO-HERNÁNDEZ A, HERNÁNDEZ-FLORES F, ALCÁNTARA-VÁZQUEZ A. Prevalence trends of oral squamous cell carcinoma. Mexico City's General Hospital experience. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013, 18(2): e306-11.
39. HILLY O, SHKEDY Y, HOD R, SOUDRY E, MIZRACHI A, HAMZANY Y et al. Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: Comparison with patients older than 60 years. *Oral Oncology* 2013, 49: 987-990.
40. HONJO Y, INOHARA H, AKAHANIS S, YOSHI T, TAKENAKA Y, YOSHIDA J et al. Expression of Cytoplasmic Galectin-3 as a Prognostic Marker in Tongue Carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2000, 6:4635-4640.
41. Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Incidência de Câncer no Brasil. Estimativa 2014. [Citado em dezembro 2]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa>.
42. JESCHKE U, HUTTER S, HEUBLEIN S, VREKOUSSIS T, ANDERGASSEN U, UNVERDORBEN L et al. Expression and function of galectins in the endometrium and at the human fetomaternal interface. *Placenta* 2013, 34: 863-872.
43. JOHNSON NW, JAYASEKARA P, AMARASINGHE AAHK. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontology* 2000 2011, 57: 19-37.
44. JUNG EJ, MOON HG, CHO BI, JEONG CY, JOO YT, LEE YJ et al. Galectin-1 expression in cancer associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. *International Journal of Cancer* 2007, 120(11): 2331-2338.

45. KIM HJ, DO IG, JEON HK, CHO YJ, PARK YA, CHOI JJ, SUNG CO et al. Galectin 1 expression is associated with tumor invasion and metastasis in stage IB to IIA cervical cancer. *Human Pathology* 2013, 44: 62-68.
46. KIM KY, LEE GY, CHA IH. Biomarker detection for the diagnosis of lymph node metastasis from oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2012, 48:311-319.
47. KIM SJ, HWANG JA, RO JY, LEE YS, CHUN KH. Galectin -7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer. *Oncotarget* 2013, 4(9): 1461-1471.
48. KRZESLAK A, LIPINSKA A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett* 2004, 9(2): 305-328.
49. KOHRENHAGEN N, VOLKER HU, KAPP M, DIETIL J, KAMMERER U. Increased expression of galectin-1 during the progression of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006,16: 2018-2022.
50. KUWABARA I, KUWABARA Y, YANG RY, SCHULER M, GREEN DR, ZURAW BL et al. Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277(5): 3487-3497.
51. LADERACH DJ, GENTILINI L, JAWORSKI FM, COMPAGNO D. Galectins as new prognostic markers and potential therapeutic targets for advanced prostate cancers. *Prostate Cancer* 2013, 1-15.
52. LAPOUGE G, YOUSSEF KK, VOKAER B, ACHOURI Y, MICHAUX C, SOTIROPOULOU PA et al. Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. *PNAS*. 2011; 108(18): 7431-7436.
53. LARSEN L, CHEN HY, SAEGUSA J, LIU FT. Galectin-3 and the skin. *Journal of Dermatological Science* 2011, 64: 85-91.
54. LE QT, SHI G, CAO H, N DW, WANG Y, CHEN E. Galectin -1: A link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23(35): 8932-8941.
55. LEE JW, SONG SY, CHOI JJ, CHOI CH, KIM TJ, KIM J et al. Decreased galectin-3 expression during the progression of cervical neoplasia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006, 132: 241-247.
56. LEFFELL D J. The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42 (1): S18-S22.

57. LIU FT, RABINOVICH GA. Galectins as modulators of tumor progression. *Nature Reviews* 2005, 5: 29-41.
58. LIU FT, YANG RY, HSU DK. Galectins in acute and chronic inflammation. *Ann. NY, Acad. Sci* 2012, 1253: 80-91.
59. LOPES PSD, SANTOS MA. Carcinoma de células escamosas labial em paciente jovem. *Ver HCPA* 2012, 32(1): 82-86.
60. LÓPEZ EPM, MORAL RMM, GARCIA CM, ZANETTI R, ROSSO S, SERRANO S. Lifestyles, environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case-control study in southern Spain. *British Journal of Cancer* 2003, 88: 1702-1707.
61. LOURENÇO SQC, SCHUELER AF, CAMISASCA DR, LINDENBLATT RC, BERNARDO VG. Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: Revisão de sistemas propostos. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007, 53(3): 325-333.
62. LUNA-ORTIZ K, GÜEMEZ-MEZA A, VILLAVICENCIO-VALENCIA V, MOSQUEDA-TAYLOR A. Lip câncer experience in Mexico. Na 11-year retrospective study. *Oral Oncology* 2004, 40:992-994.
63. MARTINS-FILHO PRS, SILVA LCF, PIVA MR. The prevalence of actinic cheilitis in farmers in a semi-arid northeastern region of Brazil. *International Journal of Dermatology* 2011, 50: 1109-1114.
64. MONSJOU HS, WREESMANN VB, BREKEL MWM, BALM AJM. Head and Neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oral Oncology* 2013, 49: 1097-1102.
65. MORRIS S, AHMAD N, ANDRÉ S, KALTNER H, GABIUS HJ, BRENOWITZ M et al. Quaternary solution structures of galectin -1, -3, and -7. *Glycobiology* 2004, 14(3): 293-300.
66. MOYSES RA, LÓPEZ RV, CURY PM, SIQUEIRA SAC, CURIONI OA, GOIS FILHO JF et al. Significant differences in demographic, clinical, and pathological features in relation to smoking and alcohol consumption among 1,633 head and neck câncer patients. *Clinics* 2013, 68(6):738-744.
67. NARDI CE, CASTRO MAF, DEDIVITIS RA. Tratamento cirúrgico do câncer de lábio. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço* 2010; 35(1): 33-37.
68. OGURA I, AMAGASSA T, IWAKI H, KIJIMA T, KURABAYASHI T, YOSHIMASU H. Clinicopathological study of carcinomas of the lips and the mucosa of the upper and lower lips. *Int J Clin Oncol* 2001, 6:123-127.

69. ÖNERCI M, YILMAZ T, GEDIKOGLU G. Tumor thickness as a predictor of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the lower lip. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery* 2000, 122(1): 139-142.
70. PACCA FOT, MARCUCCI G, NUNES FD, SILVA CEXSR, CERRI A. Aspectos clínicos e histológicos en la queilitis actínica crônica, su relación com el Vírus del Papiloma Humano. *Odontoestomatología* 2011, 8 (17): 98-105.
71. PAN S, CHEN R, REIMEL BA, CRISPIN DA, MIRZAEI H, COOKE K et al. Quantitative proteomics investigation of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Electrophoresis* 2009, 30: 1132-1144.
72. PIRES FR, RAMOS AB, OLIVEIRA JBC, TAVARES AS, LUZ PSR, SANTOS TCRB. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during na 8-year period. *J Appl Oral Sci* 2013, 21(5):460-7.
73. PLZÁK J, BETKA J, SMETANA JR K, CHOVANEC M, KALTNER H, ANDRÉ S et al. Galectin -3 – an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *European Journal of Cancer* 2004, 40: 2324-2330.
74. RABINOVICH GA, BAUM LG, TINARI N, PAGANELLI R, NATOLI C, LIU FT et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *T Immunology* 2002, 23(6): 313-320.
75. REIBEL J. Prognosis of Oral Pre-Malignant Lesions: Significance of Clinical, Histopathological, and Molecular Biological Characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003, 14(1):47-62.
76. RUIZ MT, PAVARINO-BERTELLI E, MANIGLIA JV, RUBACK MJC, GOLONI-BERTOLLO EM. Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço. *Arq Ciênc Saúde* 2006, 13(1):34-8.
77. SARMENTO DJS, ALMEIDA WL, MIGUEL MCC, QUEIROZ LMG, GODOY GP, CRUZ MCFN et al. Immunohistochemical analysis of mismatch proteins in carcinogenesis of the lower lip. *Histopathology* 2013, 63:371-377.
78. SAUSSEZ S, CUCU DR, DECAESTECKER C, CHEVALIER D, KALTNER H, ANDRÉ S et al. Galectin-7 (p-53 Induced Gene 1): A New Prognostic Predictor of Recurrence and Survival in Stage IV Hypopharyngeal Cancer. *Annals of Surgical Oncology* 2006, 13(7):p. 999-1009.
79. SAUSSEZ S, KISS R. Galectin -7. *Cell Mol Life Sci* 2006, 63:686-697.

80. SAUSSEZ S, CAMBY I, TOUBEAU G, KISS R. Galectins as modulators of tumor progression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Head & Neck* 2007, 29: 874-884.
81. SAUSSEZ S, DECAESTECKER C, LORFEVRE F, CHEVALLIER D, MORTUAIRE G, KALTNER H et al. Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumor progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. *Histopathology* 2008, 52: 483-493.
82. SENA MF, COSTA APS, NÓBREGA AGS, COSTA ALL, FERREIRA MAF. Avaliação dos fatores prognósticos relacionados ao câncer de lábio: Revisão sistemática. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2010; 56(1):93-102.
83. SENA MF, COSTA APS, FERREIRA MAF. Características sociodemográficas, clínicas e histopatológicas de pacientes com carcinoma epidermóide de lábio: uma análise retrospectiva (1997-2004). *Medicina (Ribeirão Preto)* 2013, 46(2): 128-34.
84. SHARMA M, SAH P, SHARMA SS, RADHAKRISHNEN R. Molecular changes in invasive front of oral cancer. *J Oral Maxillofac Pathol* 2013, 17(2): 240-247.
85. SHEEHAN GM, KALLAKURY BVS, SHEEHAN CE, FISHER HAG, KAUFMAN Jr RP, JEFFREY SR. Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins -3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Human Pathology* 2007, 38: 564-569.
86. SLOAN P. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: clinical presentation. *Periodontology* 2000 2011, 57:10-18.
87. SONG S, JI B, RAMACHANDRAN V, WANG H, HAFLEY M, LOGSDON C et al. Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding Ras and activating Ras signaling. *PLOS ONE* 2012, 7(8): 1-11
88. SOUSA FACG, PARADELLA TC, ROSA LEB, FAIG LEITE H. Estudo epidemiológico descritivo do carcinoma epidermóide bucal em uma população brasileira. *Cienc Odontol Bras* 2008, 11(4):24-29.
89. SOUZA GFM, FREITAS RA, MIRANDA JL. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. *Cienc Odontol Bras* 2007, 10(1):12-18.
90. SOUZA LR, FONSECA-FONSECA T, OLIVEIRA-SANTOS CC, CORRÊA GTB, SANTOS FBG, CARDOSO CM et al. Lip squamous cell

carcinoma in a Brazilian population: Epidemiological study and clinicopathological associations. *Med Oral Pat Oral Cir Bucal* 2011,16(6):e757-62.

91. SPERANDIO FF, GIUDICE FS. *Atlas de Histopatologia Oral Básica*. Editora Santos, 2013.
92. SZÖKE T, KAYSER K, KAYSER G, FURAK J, TISZLAVICZ L, BAUMHAKEL JD et al. The role of microvascularization and growth/adhesion-regulatory lectins in the prognosis of non-small cell lung cancer in stage II. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2007, 31:783-787.
93. VARKI A, CUMMINAS RD, ESKO JD et al. *Essentials of Glycobiology* 2009. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Laboratory Press, 2nd edition.
94. VON WOLFF M, WANG X, GABIUS HJ, STROWITZKI T. Galectin fingerprinting in human endometrium and deciduas during the menstrual cycle and in early gestation. *Molecular Human Reproduction* 2005, 11(3): 189-194.
95. WANG LP, CHEN SW, ZHUANG SM, LI H, SONG M. Galectin -3 accelerates the progression of oral tongue squamous cell carcinoma via Wnt/ β -catenin-dependent pathway. *Pathol Oncol Res* 2013, 19: 461-474.
96. WEEDON D, MORGAN MB, GROSS C, NAGORE E, YU LL. *WHO Classification – Pathology and Genetics of Skin Tumours*. Lyon: IARC press, 2006.
97. WU H, CHEN P, LIAO R, LI YW, YI Y, WANG JX et al. Overexpression of galectin -1 is associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma following resection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2012, 27: 1312-1319.
98. YANG RY, RABINOVICH GA, LIU FT Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2008, 10(17):1-24..
99. ZHONG LP, WEI K, YANG X, PAN H, YE D, WANG L et al. Overexpression of Galectin-1 in negatively correlated with pathologic differentiation grad in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010,136: 1527-1535.
100. ZINI A, CZERNINSKI R, SGAN-COHEN H. Oral câncer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *J Oral Pathol Med* 2010; 39: 299-305.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

APÊNDICE A – FICHA PARA COLETA DE DADOS

Avaliação imunohistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em carcinoma de células epidermóide de lábio

Prontuário: _____ Ano: _____ Nº Biópsia: _____

Gênero: () F () M Idade: _____ Etnia: _____

Ocupação: _____

Hábitos:

Exposição solar: () Aguda () Crônica

Tabagismo: () Sim

() Não

Etilismo: () Sim () Não

Estadiamento Clínico: _____

Análise Proteica:

Marcação: () Positiva () Negativa

Distribuição: () Focal () Difusa

Intensidade de marcação: () 0 – ausente () 1 – fraca

() 2 – moderada () 3 – forte

Localização celular: () núcleo () citoplasma () membrana

Tipo celular: () Parênquima () Estroma



João Pessoa, 26 de setembro de 2012

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o Hospital Dr. Napoleão Laureano participará, como instituição colaboradora, do Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação imunistoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em carcinoma de células escamosas de lábio" das pesquisadoras Prof^a. Dr^a. Marize Raquel Diniz da Rosa (Orientadora) e Maria Manuela R. de Lemos Almeida (Mestranda em Diagnóstico Bucal) do Departamento de Clínica e Odontologia Social do CCS – da Universidade Federal da Paraíba. Confirmamos ter ciência dos seus objetivos e metodologia, estando de acordo em disponibilizar os dados solicitados às pesquisadoras para a realização da técnica de imunistoquímica.

Atenciosamente,


Dr^o Alexandre Rolim da Paz
Responsável pelo Laboratório de Anatomia Patológica




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 1ª Reunião realizada no dia 28/01/2013, o projeto de pesquisa intitulado: “AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 E -7 EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO” da Pesquisadora Maria Manuela Rodrigues de Lemos Almeida. Prot. nº 0481/12, CAAE: 09897112.1.0000.5188.

Igualmente, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andrea Márcia da C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP-CCS-UFPB

