

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL**

**MARIANNE DE VASCONCELOS CARVALHO**

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 e -7  
EM DISPLASIA EPITELIAL ORAL**

**NATAL/RN**

**2010**

**MARIANNE DE VASCONCELOS CARVALHO**

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS GALECTINAS -1, -3 e -7  
EM DISPLASIA EPITELIAL ORAL**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral do Departamento de Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Patologia Oral.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lélia Maria Guedes Queiroz

**NATAL/RN**

**2010**

Catálogo na Fonte. UFRN/ Departamento de Odontologia  
Biblioteca Setorial de Odontologia "Profº Alberto Moreira Campos".

Carvalho, Marianne de Vasconcelos

Avaliação imuno-histoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em displasia epitelial oral/ Marianne de Vasconcelos Carvalho. – Natal, RN, 2010.

76f.: il.

Orientador: Profª Drª Lélia Maria Guedes Queiroz

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral.

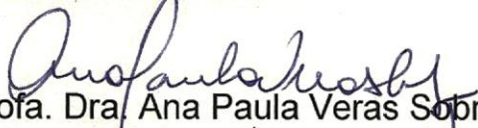
1. Galectinas – Dissertação. 2. Imuno-histoquímica – Dissertação. 3. Neoplasias Bucais – Dissertação. I. Queiroz, Lélia Maria Guedes. II. Título.

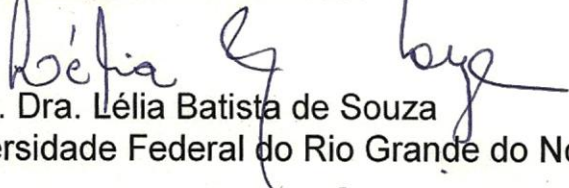
BLACK D65

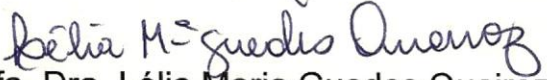
RN/UF/BSO

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 19 de fevereiro de 2010, em Natal/RN, tendo sido aprovada com conceito "A".

**COMISSÃO EXAMINADORA**

  
Profa. Dra. Ana Paula Veras Sobral  
Universidade de Pernambuco

  
Profa. Dra. Lélia Batista de Souza  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

  
Profa. Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

*DEDICATÓRIA*

*A **DEUS**, por tornar possível a realização de mais esta etapa em minha vida.*

*Aos meus pais, **Silvio e Lusiana***

***M**eus queridos genitores, tenho muito a agradecer  
**E**nsinaram-me a falar, a caminhar, a viver  
**U**ngiram-me com amor, me ajudaram a crescer  
**S**anaram minhas dúvidas, fizeram-me entender*

***P**rotegeram minha infância, seguraram minha mão  
**A**pontaram-me o melhor caminho, a melhor direção  
**I**nvestiram no meu sonho... na minha decisão  
**S**er um grande educador....de muitos que virão*

*Às minhas irmãs **Dani e Chris**, minhas melhores amigas. Vocês são essenciais na minha vida, sem nossa união, nada teria conseguido. Somos três em uma.*

*Aos meus cunhados, **Alberto e Marcelo**, por serem os irmãos que não tive.*

*Aos meus sobrinhos **Julliana** (também afilhada), **Marcelinho, Marina, Guto e Betinho** e minha afilhada, **Maria Letícia**. Serão sempre meu incentivo, os amo demais*

*À minha família, avôs e avós (in memoriam), tios e tias, padrinhos e madrinhas, primos e primas que são parte muito importante de minha vida.*

*Aos meus amigos, todos eles, que mesmo de longe, fazem parte dessa conquista.*

*Amo muito tudo isso!*

AGRADECIMENTOS

## AGRADECIMENTOS

À minha amiga e orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lélia Maria Guedes Queiroz**. Exemplo de profissionalismo, dedicação e competência. Seu jeito paciente, calmo e suas palavras me confortam e seu exemplo me dá estímulo para querer buscar novos desafios. Obrigada pelo carinho e amizade!

À amiga **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Veras Sobral**. A primeira a despertar em mim o interesse pela área acadêmica. Desde as aulas na época da graduação até os dias atuais, tenho-na como exemplo de mestre. Obrigada pelos conselhos valiosos, pelo interesse e amizade com que sempre se dispôs a me orientar.

À amiga **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lélia Batista Sousa**. Acredito que Deus nos coloca em alguns lugares para que encontremos pessoas que façam diferença nas nossas vidas. Exemplo de profissionalismo, claro. A experiência é sua marca registrada. Agradeço pelos ensinamentos transmitidos, por momentos de alegrias e de boas risadas que passamos durante esses dois anos.

Aos amigos e professores doutores, **Leão, Roseana, Hébel, Márcia, Ericka, Costa, Ana Miryam e Manuel** pelo constante estímulo no desenvolvimento de minha carreira científica e pela amizade que, com certeza, levarei por toda a vida.

Aos amigos da turma de mestrado, **Emeline, Cyntia e Thaís**, amigas dispostas a ajudar sempre, **Joabe**, pelos maravilhosos momentos de alegria, **Felipe e Maiara**, pelos bons momentos que passamos. Obrigada a todos vocês pelos momentos especiais e pessoais de amizade compartilhados e por outros tão bons momentos que serão sempre recordados.

Às amigas, **Aguida e Pollianna**, com quem não só dividi conhecimentos, como também momentos de muitas alegrias, angústias e conquistas durante nossa maravilhosa convivência. Minhas irmãs de coração.

Aos amigos, **George**, que me ajudou mesmo antes de entrar no mestrado e me ajuda sempre, **Valéria**, por ser um porto seguro pra mim, **Pedro**, por inesquecíveis momentos de alegria, **Alessandra e Ana Rafa**, por tão bons momentos no pouco tempo que passamos juntas e **Marcelo e Adriana** pelos ótimos momentos de descontração vividos.

Aos doutorandos e amigos da Patologia Oral, **Alexandre, Betânia, Bruna Rafaela, Bruna Amaral, Cassiano, Cristina, Déborah, Karuza, Marta e Ruth** pelos conhecimentos compartilhados, amizade e carinho.

Aos funcionários e amigos da Patologia Oral e da Estomatologia, **Canindé, Sandrinha, Hévio, Gracinha, Lourdinha, Idelzuíte, Andréa e Francisquinha**, por fazer parte dessa conquista e por tornar mais alegre meus dias. E à bibliotecária, **Cecília**, pela prontidão em servir sempre.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)**, por me ter proporcionado a oportunidade de fazer a minha formação na área da Patologia Oral.

Ao **Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela concessão de bolsa de estudos e pelo financiamento desta pesquisa.



RESUMO

## RESUMO

**Introdução:** A displasia epitelial oral (DEO) é uma lesão potencialmente maligna, cujo diagnóstico e gradação se baseia na histologia das alterações arquiteturais e citológicas, preconizados pela OMS, que divide a lesão em leve, moderada e severa, o qual é subjetivo. Maior concordância é observada no uso do sistema binário (baixo/alto risco), o qual está relacionado ao risco de transformação maligna. As galectinas constituem uma família de lectinas e estão envolvidas na tumorigênese, sendo a -1, -3 e -7 as mais investigadas, devido a expressão alterada em cânceres orais. **Materiais e métodos:** Foi analisada a expressão imuno-histoquímica dessas proteínas em 50 espécimes de DEO (21 baixo/ 29 alto risco) e 5 de mucosa oral normal e relacionamos com a presença/ausência de marcação, padrão de distribuição, intensidade, localização epitelial (estratificação) (1/3 inferior, médio e superior), e localização celular (compartimento) (núcleo, citoplasma e membrana) . **Resultados:** Dos 29 casos de alto e dos 21 de baixo risco, 21 (72,4%) e 12 (57,1%) foram positivos para a galectina -1, respectivamente. Dessa forma, de 50 casos, 33 foram positivos. O núcleo e citoplasma foram positivos em 91,7% nas de baixo risco e em 90,5% nas de alto. Todos os casos de mucosa normal foram negativos. Com relação a galectina -3, dos 21 casos das DEOs de baixo risco, 12 (57,1%) apresentaram expressão e dos 29 casos das DEOs de alto risco, 15 (51,7%) foram positivos, havendo imunoexpressão em um total de 27 casos. O padrão difuso, assim como a fraca intensidade foram os mais frequentes para os 2 graus. O núcleo e o citoplasma foram a localização mais comum tanto nas lesões de baixo (58,3%), quanto nas de alto risco (66,7%). Quatro casos de mucosa normal foram positivos, com marcação membranar e intensidade fraca. Dos 21 casos das DEOs de baixo risco, 17 (81%) apresentaram expressão imuno-histoquímica para a galectina -7 e das 29 DEOs de alto risco, 27 (93,1%) foram positivos. Então, a expressão imuno-histoquímica da galectina -7 foi observada em 44 casos, a maioria com intensidade de moderada a forte. O núcleo e o citoplasma foram a localização mais frequente, nas de baixo (70,6%) e alto risco (66,7%). Quatro espécimes de mucosa normal marcaram membrana em terço médio e superior, com intensidade moderada a forte. **Conclusões:** Alterações na expressão das galectinas -3 e -7 e principalmente da -1 sugerem seu envolvimento na fisiopatologia das displasias, participando do processo de transformação de fenótipo normal para o displásico.

**Palavras-chave:** galectinas. imuno-histoquímica. neoplasias bucais

***ABSTRACT***

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Oral epithelial dysplasia (OED) is a potentially malignant disorder whose microscopical diagnosis and histological grading depend on the architectural and cytological alterations, which according to the WHO, it may be classified as mild, moderate and severe. However, this classification is very subjective due the high diagnostic variability and a simple binary classification of OEDs in low and high risk seems to be more related to their predisposition to malignant transformation. The galectins belongs to a large family of lectins involved in the development of oral squamous cell carcinomas. **Material and methods:** In our research was analyzed the immunohistochemical expression pattern of the galectins -1, -3, and -7 in 50 OEDs (21 low risk and 29 high risk) and 5 samples of normal oral mucosa considering its presence/absence, distribution, intensity, and tissue and cellular location. **Results:** Of the 21 cases of OEDs of low risk, 12 (57.1%) cases were positive for galectina -1, and of the 29 cases of OEDs of high risk, 21 (72.4%) cases were positive. Thus, galectin-1 was immunostained in 33 cases of OEDs and all cases of normal tissue were negative. Moreover, the nucleus and cytoplasm of epithelial dysplastic cells were positive in 91.7% and 90.5% of the OEDs of low and high risk respectively. With regard to galectina -3, of the 21 cases of OEDs of low risk, 12 (57.1%) cases were positive, and of the 29 cases of OEDs of high risk, 15 (51.7%) cases also were positive. Diffuse, weak, nuclear, and cytoplasmic immunoexpression of galectin-3 was observed in 27 of the OEDs without difference between the low and high risk cases, but 4 control cases exhibited weak positivity in the cytoplasmic membrane. Of the 21 cases of OEDs of low risk, 17 (81%) cases were positive for galectina -7, and of the 29 cases of OEDs of high risk, 27 (93.1%) cases also were positive. Thus, galectin-7 was immunoexpressed in 44 cases being the moderately/strongly intensity. Four cases of normal oral mucosa showed moderately/strongly positivity in the middle and upper third of the cytoplasmic membrane. For this galectin, nuclear and cytoplasmic staining was more observed in 70.6% of low risk dysplasias and in 66.7% of high risk dysplasias. **Conclusions:** we suggest that alterations in the expression of galectins -7 and -3, and particularly of galectin -1 are involved in the physiopathology of OEDs that in the majority of cases, participating in the process of transformation of normal phenotype for the dysplastic. **Key words:** galectins. immunohistochemistry. oral neoplasms

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Membros da família das galectinas.....	29
<b>Figura 2.</b> Displasia epitelial de baixo risco exibindo alterações como perda de polaridade das células da camada basal, hiperplasia basilar, anisocitose, anisonucleose e pleomorfismo celular e nuclear, confinadas no terço inferior do epitélio (Hematoxilina e eosina, x400).....	44
<b>Figura 3.</b> Displasia epitelial de alto risco exibindo alterações como estratificação epitelial irregular, perda da polaridade da camada basal, anisocitose, anisonucleose, intenso pleomorfismo celular e nuclear, aumento da relação núcleo/citoplasma, presentes em mais de 2/3 do epitélio (Hematoxilina e eosina, x400).....	44
<b>Figura 4a.</b> Expressão imuno-histoquímica nuclear e citoplasmática da galectina -1 em displasia epitelial de baixo risco, localizada nos terços inferior e médio (LSAB, x400) .....	52
<b>Figura 4b.</b> Expressão imuno-histoquímica nuclear e citoplasmática da galectina -3, em displasia epitelial de alto risco, localizada nos terços médio e superior (LSAB, x400).....	52
<b>Figura 4c.</b> Expressão imuno-histoquímica membranar da galectina -3 em espécime de mucosa oral normal, localizada nos terços médio e inferior (LSAB, x400).....	52
<b>Figura 4d.</b> Expressão imuno-histoquímica nuclear e citoplasmática da galectina -7, em displasia epitelial de alto risco, localizada nos terços médio e superior do epitélio (LSAB, x400).....	52
<b>Figura 4e.</b> Expressão imuno-histoquímica membranar da galectina -7 em espécime de mucosa oral normal, localizada no terço superior (LSAB, x400).....	52

## QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Critérios arquiteturais e citológicos preconizados pela OMS para o diagnóstico da displasia epitelial oral.....	26
<b>Quadro 2.</b> Critérios preconizados pela OMS para classificar do grau da displasia epitelial oral.....	27
<b>Quadro 3.</b> Especificidade, clone, recuperação antigênica, diluição e tempo de incubação dos anticorpos anti-galectinas -1, -3 e -7.....	39

## LISTA DE TABELAS



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a expressão imuno-histoquímica da galectina-1. Natal, RN. 2010.....	45
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação ao padrão da expressão imuno-histoquímica da galectina-1. Natal, RN. 2010.....	45
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação com a intensidade da expressão imuno-histoquímica da galectina-1. Natal, RN. 2010.....	45
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização epitelial da expressão imuno-histoquímica da galectina-1. Natal, RN. 2010.....	46
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização celular da expressão imuno-histoquímica da galectina-1. Natal, RN. 2010.....	46
<b>Tabela 6.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a expressão imuno-histoquímica da galectina-3. Natal, RN. 2010.....	47
<b>Tabela 7.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação ao padrão da expressão imuno-histoquímica da galectina-3. Natal, RN. 2010.....	47
<b>Tabela 8.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a intensidade da expressão imuno-histoquímica da galectina-3. Natal, RN. 2010.....	48
<b>Tabela 9.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização epitelial da expressão imuno-histoquímica da galectina-3. Natal, RN. 2010.....	48
<b>Tabela 10.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização celular da expressão imuno-histoquímica da galectina-3. Natal, RN. 2010.....	48
<b>Tabela 11.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a expressão imuno-histoquímica da galectina-7. Natal, RN. 2010.....	49
<b>Tabela 12.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação ao padrão da expressão imuno-histoquímica da galectina-7. Natal, RN. 2010.....	50

<b>Tabela 13.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a intensidade da expressão imuno-histoquímica da galectina-7. Natal, RN. 2010.....	50
<b>Tabela 14.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização epitelial da expressão imuno-histoquímica da galectina-7. Natal, RN. 2010.....	50
<b>Tabela 15.</b> Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização celular da expressão imuno-histoquímica da galectina-7. Natal, RN. 2010.....	51

*LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DRC** - Domínio de reconhecimento de carboidratos
- DEO** - Displasia epitelial oral
- JNK** - Proteína quinase c-Jun N-terminal envolvida na regulação da apoptose
- MAPK1** - Proteína quinase mitogênica ativada que regula a divisão, crescimento e diferenciação celular
- MMP** - Metaloproteinase de matriz
- OED** - Oral epithelial dysplasia
- OMS** - Organização Mundial da Saúde
- p53** - Gene supressor de tumor. Regula a apoptose e o ciclo celular
- RAS/RAF** - Proteínas que regulam a divisão, crescimento e diferenciação celular.
- WHO** - World Health Organization

## SUMÁRIO

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Displasia epitelial oral.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Galectinas .....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Galectina -1.....	30
2.2.2 Galectina -3.....	32
2.2.3 Galectina -7.....	33
<b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Considerações éticas.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Caracterização do estudo.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3 Universo e População.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 Amostra.....</b>	<b>38</b>
4.4.1 Critérios de inclusão.....	38
<b>4.5 Estudo morfológico.....</b>	<b>39</b>
<b>4.6 Estudo imuno-histoquímico.....</b>	<b>39</b>
4.6.1 Método imuno-histoquímico.....	39
4.6.2 Análise do perfil imuno-histoquímico.....	41
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1 Análise morfológica das displasias epiteliais orais.....</b>	<b>43</b>
<b>5.2 Análise descritiva da imunoreatividade das galectinas -1, -3 e -7 em displasia epitelial oral e mucosa oral normal.....</b>	<b>43</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>76</b>

## INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

A displasia epitelial oral é uma lesão potencialmente maligna que exhibe uma combinação de anormalidades citológicas e distúrbios arquiteturais que conjuntamente compreendem os critérios imprescindíveis para o seu diagnóstico histopatológico (GALE et al., 2005; BRENNAN et al., 2007), o qual é considerado um importante indicativo de uma possível transformação maligna (DANTAS et al., 2003). Dessa forma, as displasias epiteliais orais podem constituir o primeiro passo para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral (WARNAKULASURIYA, 2001; BROTHWELL et al., 2003; WARNAKULASURIYA et al., 2008).

Apesar da maioria dos patologistas orais reconhecerem e aceitarem os critérios para o diagnóstico preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (2005), que divide a displasia epitelial oral em 3 categorias (leve, moderada e severa), há uma grande variabilidade na interpretação inter e intra examinadores quanto a presença ou ausência de displasia epitelial oral, bem como com ao seu grau e aos critérios arquiteturais e citológicos individuais (BRENNAN et al., 2007; KUJAN et al., 2007). Segundo Brennan et al. (2007) e Warnakulasuriya et al. (2008) essa variabilidade é atribuída, principalmente, à subjetividade inerente aos critérios utilizados na gradação da lesão.

No entanto, concordância substancial tem sido vista quando o grau de displasia é determinado por meio do sistema binário de gradação, o qual está fundamentado no risco de transformação maligna da displasia epitelial oral. Nesse sistema, as lesões são incluídas em 2 categorias: baixo risco e alto risco (KUJAN et al., 2006), diminuindo a subjetividade observada em outros sistemas que empregam categorias intermediárias.

Entretanto, para avaliar de forma mais precisa o risco de transformação maligna da displasia epitelial oral de alto risco e baixo risco, conhecer a fisiopatologia da lesão é de suma importância. Isto requer a identificação de marcadores moleculares relacionados a essas lesões, os quais podem ajudar a identificar precoces alterações no tecido (CARINCI et al., 2004), além de futuramente, serem utilizados como possíveis alvos terapêuticos (BRENNAN et al., 2007).



Alterações bioquímicas e moleculares nas células precedem o estabelecimento de neoplasias, neste processo pode estar envolvida a desregulação de diversas proteínas, dentre estas, as galectinas -1, -3 e -7, já que as mesmas influenciam diversas funções celulares. As galectinas vêm sendo utilizadas na imuno-histoquímica, para descrever alterações na superfície das células neoplásicas (CHIANG et al., 2008).

Vários autores vêm estudando a expressão destas proteínas em linfomas (MOISAN et al., 2003), tumores de tireóide (XU et al., 1995; RORIVE et al., 2002), carcinoma de próstata (VAN DEN BRÛLE et al., 2001), de pulmão (SZÖKE et al., 2007), gástrico (CHEN et al., 2006), de cólon (SANJUÁN et al., 1997), de mama (JUNG et al., 2007), renal (FRANCOIS et al., 1999) e de cabeça e pescoço (DELORGE et al., 2000; CHEN et al., 2004).

Poucos estudos, no entanto, têm pesquisado a expressão destas proteínas em lesões potencialmente malignas, especialmente em displasias epiteliais orais. Portanto o objetivo do presente trabalho foi analisar através da imuno-histoquímica a expressão das galectinas -1, -3 e -7 em diferentes graus de displasia epitelial oral e em mucosa oral normal, com o intuito de verificar se há alguma relação desta expressão com as alterações sofridas pelo epitélio na progressão da displasia epitelial oral de baixo risco e alto risco.

REVISÃO DA LITERATURA

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Displasia Epitelial Oral

Lesões potencialmente malignas são definidas como lesões que tem maior probabilidade de progredir para o câncer. O tecido epitelial pode apresentar alterações morfológicas, caracterizando a displasia, a qual demonstra maior tendência a sofrer transformação maligna para o carcinoma epidermóide quando comparado com o epitélio normal (GALE et al., 2005).

Alguns autores como Johnson, Ranasinghe e Warnakulasuriya (1993) e Warnakulasuriya et al. (2008) comentam a utilização do termo “pré-cancer” ou “pré-maligna” para lesões com potencial de transformação maligna, porém este termo indica que eventos moleculares irreversíveis já ocorreram, podendo ou não resultar em câncer. Devido a não obrigatoriedade dessa transformação, o termo lesão potencialmente maligna é preferencialmente utilizado (WARNAKULASURIYA et al., 2008; VAN DER WAAL et al., 2008).

A displasia epitelial oral é uma lesão potencialmente maligna, cuja combinação de anormalidades citológicas e distúrbios arquiteturais compreendem os critérios histopatológicos para o seu diagnóstico (GALE et al., 2005; BRENNAN et al., 2007). O diagnóstico histopatológico desta lesão é considerado um importante indicativo de transformação para o carcinoma epidermóide oral, que representa a neoplasia maligna oral mais comum e sua freqüência está associada com alta morbidade e mortalidade, uma vez que o diagnóstico é quase sempre tardio (DANTAS et al., 2003). Por outro lado, como citado anteriormente, nem todas as lesões displásicas progridem para o câncer (WARNAKULASURIYA, 2001; BROTHWELL et al., 2003; BRENNAN et al., 2007; WARNAKULASURIYA et al., 2008), além disso, regressão espontânea tem sido relatada, especialmente após a cessação dos hábitos associados a sua etiologia como o etilismo e tabagismo (JABER et al., 2003; BRENNAN et al., 2007). Dessa forma, as displasias epiteliais orais podem constituir o primeiro passo para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral (WARNAKULASURIYA, 2001; BROTHWELL et al., 2003; WARNAKULASURIYA et al., 2008).

A displasia epitelial oral pode se apresentar clinicamente como uma placa branca (leucoplasia), vermelha (eritroplasia) ou vermelha e branca (eritroleucoplasia/leucoplasia salpicada) (JABER et al., 2003; BRENNAN et al., 2007). As lesões

leucoplásicas geralmente correspondem histologicamente a hiperplasia epitelial ou hiperqueratose, enquanto que as eritroplásicas e as eritroleucoplásicas apresentam com maior frequência alterações displásicas, especialmente de alto grau (GALE et al., 2005; BRENNAN et al., 2007).

Para Brothwell et al. (2003), se a displasia epitelial oral é identificada, intervenções apropriadas podem ser aplicadas, as quais podem prevenir a progressão dessas alterações potencialmente malignas para o carcinoma epidermóide oral. Então, um pré-requisito necessário para instituir essa prevenção é o diagnóstico precoce e acurado da lesão.

Os critérios utilizados para o diagnóstico de displasia são baseados nas alterações arquiteturais e citológicas presentes no epitélio (Quadro 1) definidas pela OMS a qual divide a lesão em 3 graus: leve, moderada e severa (Quadro 2). O risco de transformação maligna da displasia epitelial oral é baseado nessa graduação histológica (KUJAN et al., 2007), uma vez que apresenta uma maior chance de sofrer transformação maligna quanto mais alto o grau (WARNAKULASURIYA, 2001; BROTHWELL et al., 2003; CARINCI et al., 2004; WARNAKULASURIYA et al., 2008).

**Quadro 1.** Critérios arquiteturais e citológicos preconizados pela OMS para o diagnóstico da displasia epitelial oral

<b>Alterações Arquiteturais</b>	<b>Alterações Citológicas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estratificação epitelial irregular</li> <li>• Perda da polaridade da camada basal</li> <li>• Hiperplasia da camada basal</li> <li>• Projeção em forma de gota</li> <li>• Aumento do número de mitoses típicas</li> <li>• Mitoses típicas superficiais</li> <li>• Ceratinização prematura individual (disqueratose)</li> <li>• Pérolas de ceratina nas projeções epiteliais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variação anormal no tamanho do núcleo (anisonucleose)</li> <li>• Variação anormal no forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)</li> <li>• Variação anormal no tamanho da célula (anisocitose)</li> <li>• Variação anormal na forma da célula (pleomorfismo celular)</li> <li>• Aumento da relação núcleo-citoplasma</li> <li>• Aumento do tamanho nuclear</li> <li>• Figuras de mitose atípicas</li> <li>• Aumento do número e tamanho dos nucléolos</li> </ul>

\*Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2005

**Quadro 2.** Critérios preconizados pela OMS para classificar do grau da displasia epitelial oral

Grau da DEO	Critérios
Leve	Distúrbios arquiteturais limitados ao terço inferior do epitélio acompanhado por mínima atipia citológica.
Moderada	Distúrbios arquiteturais se estendendo até o terço médio do epitélio acompanhado por atipia citológica
Severa	Distúrbios arquiteturais se estendendo por mais de dois terços do epitélio acompanhado por atipia citológica. Distúrbios arquiteturais que se estendem até o terço médio com intensa atipia citológica também é classificado como displasia epitelial severa.

\*Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2005

Apesar da maioria dos patologistas orais reconhecerem e aceitarem os critérios para o diagnóstico preconizados pela OMS, há uma grande variabilidade na interpretação inter e intra examinadores, demonstrada por uma pobre a moderada concordância quanto a presença ou ausência e ao grau da displasia epitelial oral, assim como aos critérios arquiteturais e citológicos individuais (BRENNAN et al., 2007; KUJAN et al., 2007). Resultados do estudo de Abbey et al. (1998) mostraram que o maior conhecimento dos aspectos clínicos não influencia a taxa de concordância entre os examinadores para o diagnóstico dos diversos graus de displasia epitelial. Segundo Brennan et al. (2007) e Warnakulasuriya et al. (2008) essa variabilidade é atribuída, principalmente, à subjetividade inerente aos critérios utilizados na gradação da lesão.

No entanto, concordância substancial tem sido vista quando o grau de displasia é determinado por meio do sistema binário de gradação, o qual está relacionado ao risco de transformação maligna da displasia epitelial oral. Nesse sistema, as lesões são incluídas em 2 categorias: baixo risco e alto risco (KUJAN et al., 2006). A redução no número de graus da displasia epitelial oral de 3 (leve, moderada e severa) para 2 (baixo e alto risco) aumenta a probabilidade de concordância entre patologistas (KUJAN et al., 2006; WARNAKULASURIYA et al., 2008).

Está bem estabelecido que as displasias leves, devido a uma menor probabilidade de transformação maligna, muitas vezes requerem apenas o acompanhamento do paciente como tratamento, sem necessidade de remoção da lesão. Para as displasias severas, a excisão da lesão é preconizada, uma vez que

podem apresentar um risco maior de desenvolver um câncer. No caso das displasias moderadas, a opção de acompanhamento algumas vezes é escolhida pelo profissional, entretanto alguns estudos mostram que a displasia moderada tem um significativo potencial de transformação maligna (KUJAN et al., 2006). Dessa forma, o sistema binário inclui as displasias leves no grupo do baixo risco, e as moderadas e severas no grupo de alto risco (KUJAN et al., 2006; WARNAKULASURIYA et al., 2008).

Apesar do sistema binário parecer prover maior segurança na análise do risco de malignização da displasia, este tema precisa ser mais estabelecido. Para avaliar de forma mais acurada este, conhecer a fisiopatologia da lesão é um aspecto de relevante importância. Isto requer a identificação de marcadores moleculares relacionados a essas lesões, os quais podem ajudar a identificar precoces alterações no tecido (CARINCI et al., 2004), além disso ser utilizados futuramente como possíveis alvos terapêuticos (BRENNAN et al., 2007).

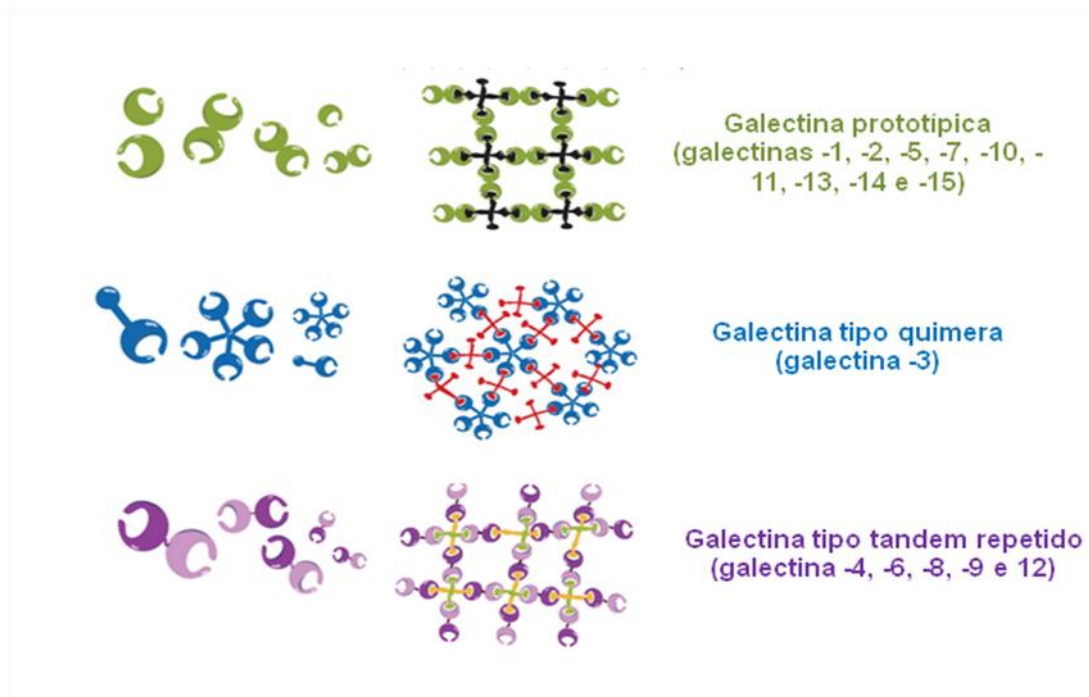
Smith et al. (2009) realizaram uma revisão sistemática de marcadores utilizados, assim como de anormalidades genéticas presentes na displasia epitelial oral. Eles observaram que a perda de heterozigotidade e instabilidade alélica presentes nos cromossomos 3p e 9p e a positividade de marcadores como survivina e MMP 9 podem estar relacionados com o aumento do risco transformação maligna desta lesão.

De acordo com Grandis et al. (2004) a análise de proteínas, como por exemplo das galectinas, tem facilitado a identificação de alterações biomoleculares em carcinoma epidermóide oral, sendo demonstradas por várias pesquisas relacionadas (HE et al., 2004; CHIANG et al., 2008; ALVES, 2009)

## **2.2 Galectinas**

As galectinas constituem uma família de lectinas animais e atualmente 15 tipos têm sido identificadas em humanos. Todas elas possuem domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) constituído com cerca de 130 aminoácidos, com afinidade por  $\beta$ -galactosídeos. A quantidade e a disposição desses DRCs classificam essas proteínas em 3 tipos: galectinas prototípicas, que possuem 1 DRC (galectina -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15); galectina tipo tandem repetido que contém 2 DRCs homólogos em uma única cadeia polipeptídica (galectina -4, -6, -8, -

9 e -12); e a galectina tipo químera que possui uma região N-terminal não-lectina (o qual consiste de resíduos de prolina, glicina e tirosina) conectada a 1 DRC (galectina -3) (Figura 1) (SUZUKI et al., 2008; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008; DELACOUR; KOCH; JACOB, 2009).



**Figura 1.** Membros da família das galectinas. \*Fonte: Yang, Rabinovich e Liu (2008)

Essas proteínas estão presentes em células normais e tumorais e estão envolvidas na modulação de diversas funções celulares, tais como o ciclo, adesão e diferenciação celular, apoptose, resposta imune, como também no desenvolvimento e na progressão de neoplasias (LANGBEIN et al., 2007; SUZUKI et al., 2008; DELACOUR; KOCH; JACOB, 2009; DHIRAPONG et al., 2009).

As galectinas localizam-se principalmente no citoplasma e no núcleo das células (ELOLA et al., 2007) e alguns estudos mostram sua participação na regulação da transdução de sinais quando acumuladas no meio intracelular (LIU et al., 2002). Entretanto, essas proteínas podem ser secretadas e estar presentes extracelularmente, interagindo com ligantes presentes na superfície de outras células ou na matriz extracelular (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008), estando dessa forma, envolvidas em interações célula-célula e célula-matriz, porém o seu papel preciso ainda precisa ser elucidado (MAGNALDO; FOWLIS; DARMON, 1998).

Variados estudos demonstraram o envolvimento das lectinas na tumorigênese e enfatizam o valor diagnóstico e prognóstico em inúmeras neoplasias (SZÖKE et al., 2007; DEMERS; MAGNALDO; ST-PIERRE, 2005), especialmente em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (SAUSSEZ et al., 2008). As galectinas-1 e -3 são as lectinas mais investigadas, demonstrada pela alteração da expressão em um grande número nesse tipo de neoplasia (PLZAK et al., 2004; HE et al., 2004). Recentemente, uma análise proteômica em carcinomas epidermóides de cavidade oral, demonstrou que a galectina-7 teve grande participação no desenvolvimento desta lesão (CHEN et al., 2004).

### **2.2.1 Galectina -1**

A galectina -1 está relacionada a uma série de eventos biológicos como no sistema imune, no qual a galectina -1 altera a homeostase das células T modulando a produção de citocinas, proliferação celular e apoptose. Está relacionada também com o desenvolvimento do sistema muscular e neural. (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008)

Seu papel no desenvolvimento e progressão tumoral está bem estabelecido (HE et al., 2004; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008). A galectina -1 também está envolvida na iniciação do fenótipo maligno de algumas neoplasias e sugere-se que ela se liga a o oncogene H-RAS, promovendo sua ancoragem na membrana plasmática e a ativação da Raf-1 e da proteína quinase mitogênica 1 (MAPK1), cujo mecanismo está envolvido no processo da transformação neoplásica (CAMBY et al., 2002; RABINOVICH, 2005).

A super expressão galectina -1 pode ser observada em diferentes tipos de tumores, localizada intra ou extracelularmente (núcleo, citoplasma, membrana e matriz extracelular) (CAMBY et al., 2006), podendo ser encontrada, tanto no parênquima quanto no componente estromal (LIU, RABINOVICH, 2005; VAN DEN BRÛLE et al., 2001; SZÖKE et al., 2007; CHEN et al., 2006; SANJUÁN et al., 1997; JUNG et al., 2007; DEMYDENKO; BEREST, 2009).

Forte imunopositividade da galectina -1 em células do parênquima de gliomas e no estroma da neoplasia esteve correlacionada com uma baixa taxa de sobrevida (YAMAOKA et al., 2000). Um aumento da expressão também foi observado nas células neoplásicas de carcinoma de tireóide (XU; EL-NAGGAR; LOTAN, 1995). Van den Brule et al.(1996) e Cindolo et al. (1999) mostraram uma alta expressão da



galectina -1 nas células cancerosas de neoplasias de bexiga e endométrio. Por outro lado, alguns estudos mostram a expressão da galectina -1 restrita ao estroma de algumas lesões. Van den Brule, Waltregny e Castronovo (2001) observaram o aumento da expressão da galectina -1 no estroma do carcinoma de próstata. Dessa forma, essa proteína possui padrões distintos de expressão em diferentes tipos de neoplasias. Alguns autores sugerem que a expressão dessa proteína pode ser influenciada por fatores específicos de cada tumor (DANGUY; CAMBY; KISS, 2002).

Em um estudo onde se avaliou a expressão da galectina -1 em carcinoma epidermóide de língua foi observada expressão elevada desta proteína, quando comparada a mucosa oral normal. Os autores sugerem o papel dessa proteína na progressão maligna promovendo a invasão e migração celular (HE et al., 2004).

Chiang et al. (2008) avaliaram a expressão da galectina -1 em carcinoma epidermóide oral e em mucosa oral normal. Neste último, observaram que apenas algumas células da camada basal expressaram a galectina -1, mas a maior parte do epitélio tinha imunexpressão negativa. Uma super expressão foi observada no estroma da neoplasia relacionada ao *front* de invasão nos estágios iniciais da carcinogênese e durante a metástase. Neste estudo, a galectina -1 pode servir como um indicador de metástase na carcinogênese oral sendo dessa forma utilizado como fator prognóstico para o carcinoma epidermóide oral.

Estudos direcionados na inibição da expressão da galectina -1 têm sido desenvolvidos, buscando dessa forma uma nova terapêutica promissora contra a progressão do câncer (CAMBY et al., 2006).

A expressão das galectina -1 também está desregulada em lesões potencialmente malignas (KOHRENHAGEN et al., 2006; PAN et al., 2009), sugerindo seu envolvimento no processo da iniciação de transformação neoplásica (YAMAOKA et al., 2000), como já citado anteriormente.

Kohrenhagen et al, (2006) avaliaram a expressão da galectina -1 em casos de mucosa cervical normal, lesão intraepitelial de baixo e alto grau e carcinoma cervical. A análise imuno-histoquímica mostrou que intensidade de expressão, nas células do estroma próximo ao epitélio alterado, aumentou durante progressão da lesão.

A neoplasia intraepitelial pancreática, é uma lesão precursora, e cerca de 200 proteínas estão desreguladas nesse tipo de lesão. Dentre estas, merece destaque a galectina -1, a qual esteve superexpressa no estroma da neoplasia intraepitelial

pancreática de alto grau (displasia de alto grau), assim como no câncer pancreático. Em tecido normal, esta proteína não foi expressa. Os autores sugerem que o aumento da expressão estromal da galectina -1 está associado com o avanço da lesão precursora para o câncer de pâncreas (PAN et al., 2009).

### **2.2.2 Galectina -3**

A galectina-3 está envolvida em uma série de eventos fisiológicos e patológicos. Alguns estudos têm mostrado que a galectina -3 é uma proteína envolvida em diversas funções como a regulação do crescimento, adesão e proliferação celular, inflamação, bem como angiogênese e apoptose (LEE et al., 2006; CHIANG et al., 2008).

A maioria dos estudos se concentra na função da galectina -3 envolvida na progressão tumoral e inibição da apoptose (LIU; RABINOVICH, 2005; NAKAHARA et al., 2005). O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está totalmente elucidado, e sugere-se que a galectina -3 é capaz de interagir com a proteína quinase Ras/Raf mitogênica ativada e fosfatidilinositol-3 quinase podendo ativar inúmeras cascatas de transdução de sinais intracelulares (ASHERY et al., 2006).

A galectina -3 está localizada no meio intracelular, no núcleo e no citoplasma das células, sugerindo uma alternância nesses dois locais, porém predominando no citoplasma (DAVIDSON et al., 2002). A localização citoplásmica dessa proteína tem um papel importante na função anti-apoptótica, e alguns autores sugerem que tem um efeito oposto quando presente no núcleo (FUKUMORI; KANAYAMA; AVRAHAM, 2007). Apesar da galectina-3 ser encontrada principalmente no citoplasma das células, uma significativa quantidade de proteína pode ser observada no núcleo, membrana ou matriz extracelular, sugerindo uma multifuncionalidade dessa proteína (KRZEŚLAK; ANNA LIPIŃSKA, 2004).

Honjo et al. (2000) analisaram a expressão da galectina -3 em carcinoma epidermóide localizado em língua e em mucosa oral normal. Neste último, houve expressão nuclear na camada basal e parabasal, e citoplasmática na camada parabasal e superficial. Durante a progressão do epitélio normal para o carcinoma, houve redução da expressão nuclear e aumento da expressão no citoplasma. Este último esteve associado com a recorrência do tumor, podendo servir como um importante fator prognóstico para o carcinoma epidermóide de língua.

Califice et al. (2004) demonstraram uma mudança de localização da galectina-3 intracelular nas células de carcinoma de próstata quando comparado com células não neoplásicas. Eles observaram que em células não tumorais da próstata, a expressão esteve presente no núcleo e no citoplasma, enquanto que na neoplasia, a expressão foi apenas citoplasmática.

Assim como a galectina -1, estudos tem demonstrado desregulação na expressão da galectina -3 em lesões potencialmente malignas (LEE et al., 2006), sugerindo seu envolvimento no processo da iniciação da transformação maligna (RAZ et al., 1990).

Lee et al. (2006) observaram a expressão dessa proteína em mucosa cervical normal, neoplasia intraepitelial de baixo grau e alto grau e carcinoma cervical. Redução da expressão foi observada nas lesões potencialmente malignas e na lesão cancerosa, nenhuma marcação foi identificada. Este estudo mostra que a redução da expressão imuno-histoquímica da galectina-3 está associada com a progressão do carcinoma cervical.

### **2.2.3 Galectina -7**

A galectina -7 é uma proteína encontrada principalmente no epitélio escamoso estratificado de várias regiões, como na pele, esôfago, língua e sua expressão está associada com a diferenciação e desenvolvimento dos ceratinócitos (KUWABARA et al., 2002; SAUSSEZ; KISS, 2006; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008). Magnaldo, Fowles e Darmon (1998) afirmam que a galectina -7 está presente em todas as camadas do epitélio, independente do grau de diferenciação do ceratinócito, o que faz essa proteína se distinguir de outros marcadores epiteliais, como algumas citoqueratinas e a involucrina, as quais se expressam, respectivamente, na camada basal e suprabasal (MAGNALDO; BARRANDON, 1996).

Há evidências de que a galectina-7 pode ser induzida pela p53, atuando dessa forma em mecanismos de regulação da apoptose. Bernerd, Sarasin e Magnaldo (1999) sugerem que uma super expressão da galectina -7 ocorre rapidamente após a indução com radiação ultravioleta B nos ceratinócitos da epiderme, promovendo, paralelamente, a estabilização da p53 e inibindo a apoptose, levando ao desenvolvimento de carcinomas de pele. Mecanismos adicionais revelam efeitos pró-apoptóticos causados pela galectina -7, a qual promove a ativação da JNK e liberação do citocromo c mitocondrial (KUWABARA et al., 2002).

Defeitos na apoptose constituem um dos principais mecanismos da tumorigênese humana e a galectina -7 age, como um fator regulatório positivo ou negativo no desenvolvimento tumoral, dependendo do tipo histológico do tumor (MOISAN et al., 2003; SAUSSEZ; KISS, 2006).

A galectina -7 está desregulada em neoplasias, sendo demonstrada principalmente pela sua super expressão (SAUSSEZ; KISS, 2006). Alguns tumores estão associados com esse padrão, o qual está envolvido com a agressividade biológica em carcinoma de mama experimental (LU et al., 1997) e na progressão de linfomas para um fenótipo metastático (MOISAN et al., 2003).

Chen et al. (2004) realizaram uma análise proteômica em espécimes de carcinoma epidermóide oral e observaram que a galectina -7 esteve super regulada nesses casos, quando comparados com a mucosa oral normal.

Saussez et al. (2008) realizaram uma análise comparativa da expressão das galectinas -1 e -7 em amostras de epitélio normal, displasia de baixo e alto grau e carcinoma epidermóide de hipofaringe e laringe. Além do aumento expressão observado durante a progressão da neoplasia, houve uma mudança de localização do núcleo para o citoplasma no caso da galectina -1 e do citoplasma para o núcleo para a galectina -7. Esses dados revelam que tanto o aumento da expressão quanto a localização diferente dessas proteínas está relacionada com a carcinogênese inicial, assim como com a progressão neoplásica do carcinoma epidermóide de hipofaringe e laringe.

Em um estudo realizado por Alves (2009), foi observado expressão imuno-histoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em respectivamente 87,7%, 87,7% e 78,3% dos espécimes de carcinoma epidermóide de língua. A galectina -1 esteve presente no meio intracelular, principalmente no citoplasma de células do estroma e sua expressão foi relacionada com metástase e estadiamento clínico do tumor. A imunoexpressão galectina -3 se relacionou com a presença de metástase em neoplasias de alto grau de malignidade, e esteve presente principalmente no citoplasma dos ninhos de células neoplásicas. A galectina -7 apresentou marcação exclusiva em células neoplásicas, principalmente na membrana e citoplasma de tumores de alto grau. A autora sugere que essas proteínas estão envolvidas na carcinogênese oral podendo servir como marcadores de comportamento biológico e da progressão tumoral.

PROPOSIÇÃO

### **3 PROPOSIÇÃO**

O presente trabalho teve como proposta avaliar qualitativamente a expressão imuno-histoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em displasia epitelial oral correlacionando esta expressão com as lesões de baixo e alto risco, além de comparar com a mucosa oral normal.

## MATERIAIS E MÉTODOS

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Considerações éticas**

O presente estudo foi submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN e pelo Sistema Nacional de Ética na Pesquisa-SISNEP e aprovado com o número de protocolo 034/2009 e CAAE 0035.0.051.000-09 (ANEXO A).

### **4.2 Caracterização do Estudo**

A presente pesquisa se constituiu em uma análise qualitativa descritiva da expressão imuno-histoquímica das galectinas -1, -3 e -7 na displasia epitelial oral, objetivando uma análise da expressão entre os graus de displasia epitelial oral e mucosa oral normal.

### **4.3 Universo e população**

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizados todos os casos arquivados no período de 38 anos, entre os anos de 1970 e 2008, no Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN, os quais corresponderam um total de 9621 casos. Desses, 173 casos foram diagnosticados como displasia epitelial oral.

### **4.4 Amostra**

A amostra selecionada para a realização deste estudo compreendeu 55 casos. Desses, 50 compreendiam os casos de displasia epitelial oral, os quais preenchiam os critérios de seleção citado no item abaixo

Cinco casos de mucosa oral normal foram selecionados com o objetivo de realizar uma análise comparativa, os quais foram obtidos de cirurgia com finalidade ortodôntica.

#### **4.4.1. Critérios de inclusão**

- Foram incluídos os espécimes diagnosticados histopatologicamente como displasia epitelial oral;
- Foram incluídos os espécimes que tinham material biológico suficiente nos blocos de parafina para o desenvolvimento da pesquisa;



- Foram incluídos os casos que tiveram a autorização pelo paciente através do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

#### 4.5 Estudo morfológico

Nos espécimes de displasia epitelial oral existentes nos Arquivos da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da UFRN selecionados para este estudo foi realizada uma análise histomorfológica, por dois observadores, em microscopia de luz, nos aumentos 40x, 100x, 200x e 400x, com cortes de 5 µm de espessura, dispostos em lâminas de vidro e corados pela técnica da hematoxilina e eosina, a fim de definir o grau da displasia epitelial oral.

Foi realizada uma análise morfológica dos aspectos citológicos e arquiteturais preconizados pela OMS e as displasias epiteliais orais foram classificadas em lesões de baixo e alto risco, baseado no sistema binário de gradação proposto por Kujan et al. (2006). Nesse sistema, as lesões de baixo risco correspondem as displasias leves e as de alto risco correspondem as displasias categorizadas como moderadas e severas pela OMS (2005).

#### 4.6 Estudo imuno-histoquímico

##### 4.6.1 Método imuno-histoquímico

Do material embocado em parafina foram obtidos cortes de 3µm de espessura e estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e preparadas com adesivo à base de Organosilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). A especificidade, clone, recuperação antigênica, diluição e período de incubação das galectinas -1, -3 e -7 estão descritas no Quadro 3.

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

<b>Especificidade</b>	<b>Clone</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Diluição</b>	<b>Tempo de incubação</b>
Galectina -1*	25C1	Citrato pH 6.0 Pascal	1:100	Overnight
Galectina -3*	9C4	Citrato pH6.0 Pascal	1:100	60'
Galectina -7*	5F12	Sem tratamento	1:100	60'

\* Novocastra

Foi empregado nesta técnica imuno-histoquímica o complexo Avidina biotina (Kit LSAB + HRP, DAKO CYTOMATION, Carpinteria, CA,USA). Como controle positivo foram utilizados casos de carcinoma epidermóide oral sabidamente positivos. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino a 1% (BSA – *Bovine Serum Albumin*) em solução tampão. A técnica utilizada será realizada conforme os passos que se seguem:

- Xilol 1 (30 minutos), temperatura ambiente - desparafinização
- Xilol 2 (20 minutos), temperatura ambiente - desparafinização
- Etanol absoluto I, II, III – 5 minutos cada;
- Etanol 95º/ 5 minutos;
- Etanol 80º/ 5 minutos;
- Etanol 95% + Hidróxido de amônio a 10% 10 minutos (retirada do pigmento formólico);
- Lavagem das lâminas em água corrente, 10 minutos;
- Água destilada, 2 trocas, 5 minutos cada.
- Recuperação antigênica (Quadro 3);
- Água corrente, 10 minutos;
- Bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 VOL (2 tempos de 10 minutos)
- Água corrente, 10 minutos;
- Água destilada, 2 trocas, 5 minutos cada;
- TRIS pH 7,4, duas trocas, 5 minutos cada;
- Incubação dos cortes com os anticorpos primários diluídos em solução diluente (DakoCytomation – Antibody Diluent with Background Reducing Components – Ref. S3022 – Dako Carpinteria, CA, USA), seguindo os protocolos do laboratório de Imuno-histoquímica do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral da UFRN no que se refere a diluição, tempo de incubação e recuperação antigênica.
- Incubação com o sistema LSAB-HRP
- Duas passagens em solução Tween 20 a 1% em TRIS-HCL ( pH 7.4), por 5 minutos cada;
- Lavagem com TRIS;
- Revelação da reação com diaminobenzidina em câmara escura;

- Lavagem em água corrente, 10 minutos;
- Passagem em água destilada;
- Contracoloração com Hematoxilina de Mayer, 10 minutos;
- Lavagem em água corrente, 10 minutos;
- Água destilada, duas trocas, 5 minutos;
- Desidratação, diafanização e montagem em permount.

#### **4.6.2 Análise do perfil imuno-histoquímico**

A expressão imuno-histoquímica das galectinas -1, -3 e -7 na displasia epitelial oral e em mucosa oral normal, foi analisada em microscópio óptico Nikon® considerando: a presença ou ausência de marcação, padrão de distribuição, intensidade de marcação, localização epitelial e localização celular. (núcleo, citoplasma e membrana). O padrão de distribuição da marcação, conforme a disposição da expressão imuno-histoquímica, foi classificada em focal ( $\leq 30\%$  do epitélio) e difusa ( $>30\%$  do epitélio), adaptado de Sheehan et al. (2007). A intensidade de marcação foi avaliada subjetivamente em uma escala qualitativa onde foram utilizadas as seguintes categorias: marcação fraca e moderada a forte (Sheehan et al., 2007). A localização epitelial, ou seja, o local exato predominante da expressão imuno-histoquímica nos estratos do epitélio foi categorizado em: terço superior, terço médio e terço inferior, adaptado dos critérios usados por Usami et al. (2006). A localização celular referente à localização da expressão no compartimento da célula foi categorizada em: membranal, citoplasmática e nuclear, adaptado de Sobel et al. (2005). Todas as avaliações foram feitas por dois observadores previamente treinados, independentemente. Os dados foram anotados em ficha previamente elaborada (APÊNDICE B) para posterior análise dos resultados obtidos.

*RESULTADOS*

---

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Análise morfológica das displasias epiteliais orais**

Para o nosso estudo, foram utilizados 50 casos de displasia epitelial oral, que foram diagnosticados e classificados em alto e baixo risco, baseado no sistema binário de gradação sugerido por Kujan et al.(2006). Desses 21 foram classificados como displasia epitelial de baixo risco e 29 de alto risco.

A análise morfológica das displasias epiteliais de baixo risco foi caracterizada por alterações arquiteturais e citológicas (Quadro 1) confinadas no terço inferior do epitélio (Figura 2), as quais corresponderam a 21 casos (42%).

Nas displasias epiteliais de alto risco, que compreenderam 29 casos (58%), a análise morfológica dos espécimes mostrou alterações arquiteturais e citológicas presentes em dois terços do epitélio ou em toda sua espessura (Figura 3).

### **5.2 Análise descritiva da imunoreatividade das galectinas -1, -3 e -7 em displasia epitelial oral e mucosa oral normal**

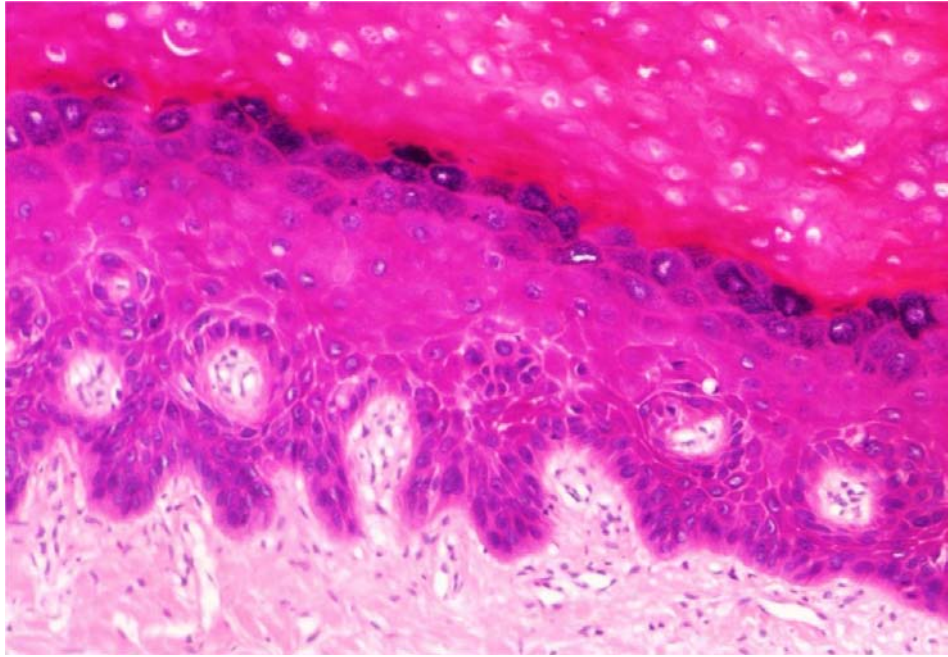
#### **5.2.1 Galectina -1**

##### **5.2.1.1 Displasia epitelial oral**

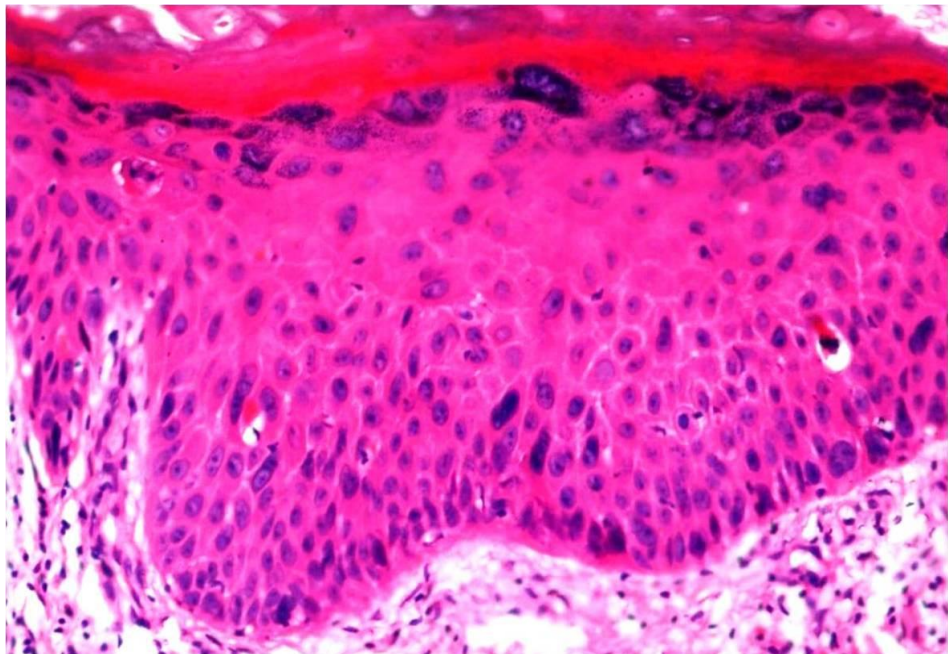
Dos 29 casos das displasias de alto risco e dos 21 casos de baixo risco, 21 (72,4%) e 12 (57,1%) foram positivos para a galectina -1, respectivamente. Dessa forma, dos 50 casos de displasia, 33 apresentaram imunexpressão da proteína. (Tabela 1). Na maioria dos casos foi observada distribuição difusa (Tabela 2). No que se refere a intensidade de expressão, 66,7% das displasias de baixo risco exibiram fraca intensidade de marcação, enquanto que em 57,1% das displasias de alto risco a marcação foi de moderada a forte (Tabela 3). A expressão da galectina -1 esteve confinada nas células do terço inferior e médio, independente do grau da displasia. (Tabela 4). A localização celular da marcação esteve presente no núcleo e citoplasma das células epiteliais em 91,7% das displasias de baixo risco e em 90,5% nas de alto risco (Figura 4a), nos demais casos apenas marcação citoplasmática foi observada (Tabela 5).

##### **5.2.1.2 Mucosa oral normal**

Nenhum caso de mucosa oral normal apresentou imunoreatividade para a galectina -1.



**Figura 2.** Displasia epitelial oral de baixo risco exibindo alterações como perda de polaridade das células da camada basal, hiperplasia basilar, anisocitose, anisonucleose e pleomorfismo celular e nuclear, confinadas no terço inferior do epitélio (Hematoxilina e eosina,  $\times 400$ ).



**Figura 3.** Displasia epitelial oral de alto risco exibindo alterações como estratificação epitelial irregular, perda da polaridade da camada basal, anisocitose, anisonucleose, intenso pleomorfismo celular e nuclear, aumento da relação núcleo/citoplasma, presentes em mais de dois terços do epitélio (Hematoxilina e eosina,  $\times 400$ ).

**Tabela 1.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a expressão imuno-histoquímica da galectina-1. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Presença de marcação		Número base n (%)
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Baixo Risco	12 (57,1%)	9 (42,9%)	21 (100,0%)
Alto Risco	21 (72,4%)	8 (27,6%)	29 (100,0%)
Número base n (%)	33 (66,0%)	17 (34,0%)	50 (100,0%)

**Tabela 2.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação ao padrão da expressão imuno-histoquímica da galectina-1. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Padrão de marcação		Número base n (%)
	Difusa n (%)	Focal n (%)	
Baixo Risco	7 (58,3%)	5 (41,7%)	12 (100,0%)
Alto Risco	15 (71,4%)	6 (28,6%)	21 (100,0%)
Número base n (%)	22 (66,7%)	11 (33,3%)	33 (100,0%)

**Tabela 3.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a intensidade da expressão imuno-histoquímica da galectina-1. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Intensidade de marcação		Número base n (%)
	Fraca n (%)	Moderada/forte n (%)	
Baixo Risco	8 (66,7%)	4 (33,3%)	12 (100,0%)
Alto Risco	9 (42,9%)	12 (57,1%)	21 (100,0%)
Número base n (%)	17 (51,5%)	16 (48,5%)	33 (100,0%)

**Tabela 4.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização epitelial da expressão imuno-histoquímica da galectina-1. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Localização epitelial			Número base n (%)
	Inferior/médio n (%)	Médio/superior n (%)	Inferior/médio/superior n (%)	
<b>Baixo Risco</b>	8 (66,7%)	2 (16,7%)	2 (16,7%)	12 (100,0%)
<b>Alto Risco</b>	16 (76,2%)	2 (9,5%)	3 (14,3%)	21 (100,0%)
<b>Número base n (%)</b>	24 (72,7%)	4 (12,1%)	5 (15,2%)	33 (100,0%)

**Tabela 5.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização celular da expressão imuno-histoquímica da galectina-1. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Localização celular		Número base n (%)
	Citoplasma n (%)	Núcleo/citoplasma n (%)	
<b>Baixo Risco</b>	1 (8,3%)	11 (91,7%)	12 (100,0%)
<b>Alto Risco</b>	2 (9,5%)	19 (90,5%)	21 (100,0%)
<b>Número base n (%)</b>	3 (9,1%)	30 (90,9%)	33 (100,0%)

## 5.2.2 Galectina -3

### 5.2.2.1 Displasia epitelial oral

Com relação a imunoexpressão da galectina -3, dos 21 casos das displasias de baixo risco, 12 (57,1%) apresentaram expressão e dos 29 casos das displasias de alto risco, 15 (51,7%) foram positivos. Dessa forma, a galectina -3 foi positiva em 27, dos 50 casos de displasia epitelial oral (Tabela 6). O padrão difuso (Tabela 7) assim como a fraca intensidade de marcação (Tabela 8) foram os mais frequentes para todos os graus de displasia. Nas displasias de baixo risco, os terços inferior e médio (58,3%) foi a localização que predominou na expressão imuno-histoquímica



da galectina -3, enquanto que nas de alto risco, o mesmo número de casos apresentou expressão nos terços inferior e médio (40%) e nos terços médio e superior (40%) (Tabela 9). No que se refere a localização celular, as displasias de baixo risco exibiram marcação mais freqüente no núcleo e no citoplasma em 58,3% dos casos. Esta localização da marcação também foi observada nas displasias de alto risco (66,7%) (Figura 4b) (Tabela 10).

#### 5.2.2.2 Mucosa oral normal

Dos 5 casos de mucosa oral normal analisados, 4 foram positivos para a galectina-3, exibindo expressão difusa em 3 casos. Em todos os casos a expressão dessa proteína foi de intensidade fraca e esteve presente na membrana celular das células localizadas nos terços inferior e médio do epitélio (Figura 4c).

**Tabela 6.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a expressão imuno-histoquímica da galectina-3. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Presença de marcação		Número base n (%)
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
<b>Baixo risco</b>	12 (57,1%)	9 (42,9%)	21 (100,0%)
<b>Alto risco</b>	15 (51,7%)	14 (48,3%)	29 (100,0%)
<b>Número base n (%)</b>	27 (54,0%)	23 (46,0%)	50 (100,0%)

**Tabela 7.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação ao padrão da expressão imuno-histoquímica da galectina-3. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Padrão de marcação		Número base n (%)
	Difusa n (%)	Focal n (%)	
<b>Baixo risco</b>	10 (83,3%)	2 (16,7%)	12 (100,0%)
<b>Alto risco</b>	14 (93,3%)	1 (6,7%)	15 (100,0%)
<b>Número base n (%)</b>	24 (88,9%)	3 (11,1%)	27 (100,0%)

**Tabela 8.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a intensidade da expressão imuno-histoquímica da galectina-3. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Intensidade de marcação		Número base n (%)
	Fraca n (%)	Moderada/forte n (%)	
Baixo Risco	9 (75,0%)	3 (25,0%)	12 (100,0%)
Alto Risco	10 (66,7%)	5 (33,3%)	15 (100,0%)
<b>Número base n (%)</b>	<b>19 (70,4%)</b>	<b>8 (29,6%)</b>	<b>27 (100,0%)</b>

**Tabela 9.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização epitelial da expressão imuno-histoquímica da galectina-3. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Localização epitelial			Número base n (%)
	Inferior/médio n (%)	Médio/superior n (%)	Inferior/médio/superior n (%)	
Baixo Risco	7 (58,3%)	1 (8,3%)	4 (33,3%)	12 (100,0%)
Alto Risco	6 (40,0%)	6 (40,0%)	3 (20,0%)	15 (100,0%)
<b>Número base n (%)</b>	<b>13 (48,1%)</b>	<b>7 (25,9%)</b>	<b>7 (25,9%)</b>	<b>27 (100,0%)</b>

**Tabela 10.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização celular da expressão imuno-histoquímica da galectina-3. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Localização celular		Número base n (%)
	Citoplasma n (%)	Núcleo/citoplasma n (%)	
Baixo Risco	5 (41,7%)	7 (58,3%)	12 (100,0%)
Alto risco	5 (33,3%)	10 (66,7%)	15 (100,0%)
<b>Número base n (%)</b>	<b>10 (37,0%)</b>	<b>17 (63,0%)</b>	<b>27 (100,0%)</b>

### 5.2.3 Galectina -7

#### 5.2.3.1 Displasia epitelial oral

Dos 21 casos das displasias de baixo risco, 81% apresentaram expressão imuno-histoquímica para a galectina -7 e dos 29 casos das displasias de alto risco, 93,1% foram positivos. Então, a expressão imuno-histoquímica da galectina -7 foi observada em 44 casos (Tabela 11). Distribuição difusa pode ser observada na maioria dos casos nos 2 graus de displasia (Tabela 12). Intensidade de moderada a forte foi observada em 82,4% das displasias de baixo risco e 81,5% nas de alto risco (Tabela 13). Com relação a localização epitelial, os terços médio e superior foram o que predominaram tanto nas displasias de baixo risco, quanto nas de alto risco, correspondendo a 52,9% e 77,8%, respectivamente (Tabela 14). Nas displasias de baixo risco (70,6%) a localização celular mais comum de marcação foi o núcleo e o citoplasma, o mesmo ocorrendo para as de alto risco (66,7%) (Figura 4d) (Tabela 15)

#### 5.2.3.2 Mucosa oral normal

Dos 5 casos de mucosa oral normal, 4 foram positivos para a galectina -7 exibindo um padrão de marcação focal, de intensidade moderada a forte e localizada em membrana das células constituintes no terço médio e superior do epitélio (Figura 4e).

**Tabela 11.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a expressão imuno-histoquímica da galectina-7. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Presença de marcação		Número base n (%)
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
<b>Baixo risco</b>	17 (81,0%)	4 (19,0%)	21 (100,0%)
<b>Alto risco</b>	27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100,0%)
<b>Número base n (%)</b>	44 (88,0%)	6 (12,0%)	50 (100,0%)

**Tabela 12.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação ao padrão da expressão imuno-histoquímica da galectina-7. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Padrão de marcação		Número base n (%)
	Difusa n (%)	Focal n (%)	
Baixo risco	16 (94,1%)	1 (5,9%)	17 (100,0%)
Alto risco	20 (74,1%)	7 (25,9%)	27 (100,0%)
Número base n (%)	36 (81,8%)	8 (18,2%)	44 (100,0%)

**Tabela 13.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a intensidade da expressão imuno-histoquímica da galectina-7. Natal, RN. 2010

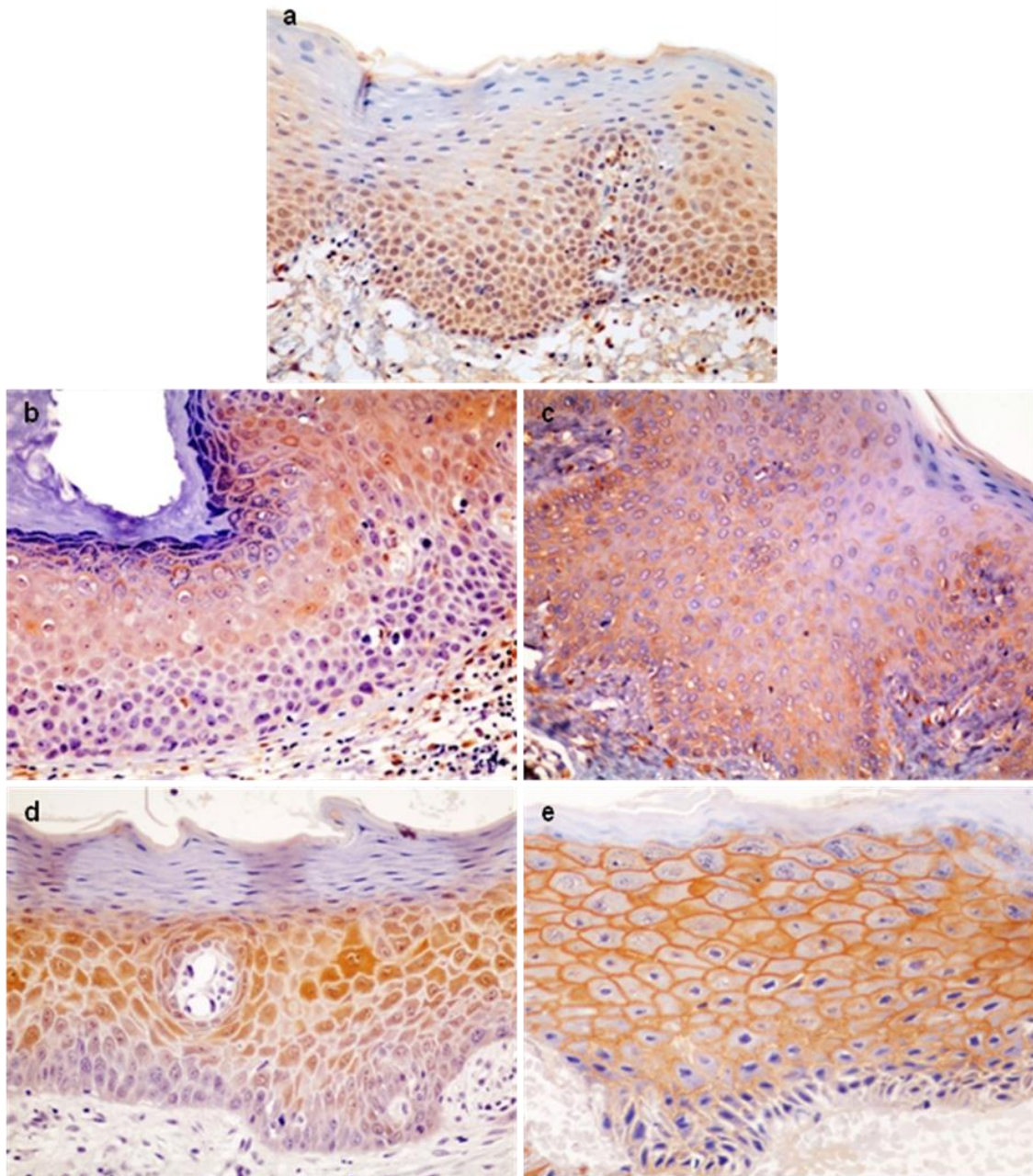
Grau da DEO	Intensidade de marcação		Número base n (%)
	Fraca n (%)	Moderada/ forte n (%)	
Baixo risco	3 (17,6%)	14 (82,4%)	17 (100,0%)
Alto risco	5 (18,5%)	22 (81,5%)	27 (100,0%)
Número base n (%)	8 (18,2%)	36 (81,8%)	44 (100,0%)

**Tabela 14.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização epitelial da expressão imuno-histoquímica da galectina-7. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Localização epitelial			Número base n (%)
	Inferior/ médio n (%)	Médio/ superior n (%)	Inferior/médio/ superior n (%)	
Baixo risco	1 (5,9%)	9 (52,9%)	7 (41,2%)	17 (100,0%)
Alto Risco	3 (11,1%)	21 (77,8%)	3 (11,1%)	27 (100,0%)
Número base n (%)	4 (9,1%)	30 (68,2%)	10 (2,7%)	44 (100,0%)

**Tabela 15.** Distribuição dos casos de displasia epitelial oral de acordo com o grau em relação a localização celular da expressão imuno-histoquímica da galectina-7. Natal, RN. 2010

Grau da DEO	Localização celular			
	Citoplasma n (%)	Membrana n (%)	Núcleo/ citoplasma n (%)	Número base n (%)
<b>Baixo Risco</b>	1 (5,9%)	4 (23,5%)	12 (70,6%)	17 (100,0%)
<b>Alto Risco</b>	7 (25,9%)	2 (7,4%)	18 (66,7%)	27 (100,0%)
<b>Número base n (%)</b>	8 (18,2%)	6 (13,6%)	30 (68,2%)	44 (100,0%)



**Figura 4.** **a)** Expressão imuno-histoquímica nuclear e citoplasmática da galectina -1 em displasia epitelial de baixo risco, localizada nos terços inferior e médio (LSAB,  $\times 400$ ). **b)** Expressão imuno-histoquímica nuclear e citoplasmática da galectina -3, em displasia epitelial de alto risco, localizada nos terços médio e superior (LSAB,  $\times 400$ ). **c)** Expressão imuno-histoquímica membranar da galectina -3 em espécime de mucosa oral normal, localizada nos terços médio e inferior (LSAB,  $\times 400$ ). **d)** Expressão imuno-histoquímica nuclear e citoplasmática da galectina -7, em displasia epitelial de alto risco, localizada nos terços médio e superior (LSAB,  $\times 400$ ). **e)** Expressão imuno-histoquímica membranar da galectina -7 em espécime de mucosa oral normal, localizada no terço médio e superior (LSAB,  $\times 400$ ).

*DISCUSSÃO*

---

## 6 DISCUSSÃO

A displasia epitelial oral é uma lesão potencialmente maligna, com uma taxa de progressão para o carcinoma epidermóide que varia de 6 a 36% (SMITH et al., 2009). Atualmente, o diagnóstico histopatológico consiste na gradação da lesão, sendo este o meio mais utilizado pelos patologistas orais. Esta gradação serve de base para que o profissional clínico selecione o tratamento mais adequado para o paciente (BROTHERWELL et al., 2003; SMITH et al., 2009), uma vez que quanto mais alto o grau da lesão, maior a probabilidade de transformação neoplásica (KUJAN et al., 2006) e dessa forma intervenções mais radicais, como a excisão cirúrgica, podem ser instituídas.

Kujan et al. (2006) sugeriram um sistema binário de gradação, o qual é complementado pelos critérios da OMS, que reduz para 2 a quantidade de graus da displasia epitelial oral: (1) displasia epitelial de baixo risco e (2) displasia epitelial de alto risco. Neste estudo, eles avaliaram a variabilidade no diagnóstico e na gradação dessa lesão comparando com o sistema preconizado pela OMS, sendo observada uma maior concordância quando o sistema binário foi utilizado. A redução no número de categorias utilizada por esse novo sistema diminuiu a subjetividade observada em outros sistemas que empregam categorias intermediárias.

Análises da gradação das displasias em outras regiões do corpo, como a laringe e esôfago, também demonstraram uma maior concordância no diagnóstico entre os avaliadores, quando uma menor quantidade de categorias foi utilizada para estabelecer a gradação das entidades (MCLAREN et al., 2000; MONTGOMERY, 2005).

Os estudos que avaliam a concordância no diagnóstico da displasia epitelial leve e severa realizados com a classificação da OMS são bastante satisfatórios, sendo, porém a displasia moderada fonte de maior discordância no diagnóstico (MCLAREN et al., 2000; KUJAN et al., 2006). A fim de atenuar este viés, o sistema binário de gradação inclui a displasia moderada nas lesões de alto risco, o que é perfeitamente justificável, uma vez que essa lesão tem um significativo potencial de transformação maligna (KUJAN et al., 2006).

Dessa forma, nós preconizamos em nosso estudo a utilização do sistema binário de gradação por consistir de um meio mais seguro e acurado de diagnóstico e conseqüentemente tem um maior potencial de auxiliar na decisão de tratar de



forma mais apropriada essas lesões, especialmente no caso das displasias moderadas, uma vez que, segundo Lodi e Porter (2008), a excisão cirúrgica é a terapêutica mais indicada nesses casos. Além disso, considerando que a displasia epitelial oral de alto risco tem uma maior tendência de malignizar quando comparada com as lesões de baixo risco (KUJAN et al., 2006; WARNAKULASURIYA et al., 2008), nós concordamos que esse novo sistema de gradação tem um melhor indicador prognóstico quanto ao risco de transformação maligna.

Muito embora, o diagnóstico das displasias epiteliais orais seja baseado na análise morfológica e, a gradação dessas lesões em apenas duas categorias proveja maior vantagem sobre o sistema de gradação preconizado pela OMS (2005), sua utilização ainda consiste de um método subjetivo de prever o potencial de transformação maligna da lesão. Portanto, conhecer a fisiopatologia da lesão é um aspecto de fundamental importância para entender melhor as alterações que ocorrem no epitélio quando este se torna displásico, e principalmente servir de melhor indicador prognóstico dessas lesões, no que diz respeito a seu potencial de malignizar. Isto requer a identificação de marcadores que ajudem a entender as alterações biomoleculares nas lesões epiteliais displásicas e forneçam subsídios mais seguros do risco de transformação maligna da lesão.

É possível evidenciar alguns biomarcadores já utilizados em displasia epitelial oral a fim de prever sua progressão para o câncer, como o p53 (CRUZ et al., 1998; CRUZ et al., 2002), p73 (CHEN; HSUE; LIN, 2004), metaloproteinases de matriz (MMP -1, -2 e -9) (JORDAN et al., 2004) e survivina (LO MUZIO et al., 2003), assim como anormalidades genéticas como a perda de heterozigotidade (ROSIN et al., 2000) e instabilidade alélica (PARTRIDGE et al., 1998).

Ainda não é possível afirmar que esses biomarcadores sejam formas seguras para prever a progressão para o câncer (OLIVER; MC DONALD; FELIX, 2000; PITIYAGE et al., 2009; SMITH et al., 2009). Entretanto, de acordo com Smith et al. (2009), podem ajudar a entender as alterações biomoleculares como os eventos que estão envolvidos, não apenas na progressão de uma lesão não-invasiva para uma lesão invasiva, como também no processo que envolve a etapa inicial da transformação do fenótipo epitelial normal para o epitélio displásico. Então, a fim de ajudar a esclarecer esses mecanismos, nossa pesquisa busca por novos biomarcadores ainda não utilizados em lesões com potencial carcinogênico.

Em diversos estudos, tem se observado a alteração das galectinas em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e, uma vez que esta neoplasia pode advir de lesões epiteliais displásicas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica das galectinas-1, -3 e -7 em 50 casos de displasia epitelial oral e correlacionou a presença ou ausência de marcação, padrão de distribuição, intensidade, localização celular e epitelial com o grau da displasia epitelial oral, baseado no sistema binário de gradação sugerido por Kujan et al. (2006). Além disso, cinco casos de mucosa oral normal foram utilizados para fins comparativos.

Os resultados encontrados na nossa pesquisa em relação a galectina -1 mostram que essa proteína se expressou em 33 (66%) casos de displasia epitelial oral. Desses, 21 casos corresponderam a lesões de alto risco. Todos os casos de mucosa oral normal foram negativos. Alguns estudos mostram uma super expressão da galectina -1 em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço quando comparados a mucosa normal (CHIANG et al., 2008; SAUSSEZ et al., 2008). Os nossos achados corroboram com as pesquisas anteriores no sentido de que a expressão da galectina -1 está presente ou mais expressa quando o epitélio está alterado. Observa-se também, que a intensidade de marcação torna-se mais intensa quanto maior o grau da displasia. Diante dos nossos achados e dos relatos da literatura pertinente, é possível sugerirmos que esta proteína pode estar envolvida no processo de iniciação do fenótipo maligno, uma vez que a mucosa oral normal foi negativa, fato observado tanto em nosso trabalho, quanto no estudo de Chiang et al., (2008). Outro dado que reforça esta sugestão é a maior freqüência e maior intensidade de expressão nas lesões de alto risco.

Alguns estudos mostram que a expressão ou super expressão da galectina -1 está relacionada ao estroma da lesão, como Kohrenhagen et al. (2006) que observaram um aumento da expressão nas células estromais, durante a progressão das neoplasias cervicais, assim como Chiang et al., (2008) que mostraram que em carcinomas bem diferenciados, a marcação foi exclusivamente em células do estroma. A expressão estromal da galectina -1 pode ser explicada por algumas hipóteses. Esta proteína se originaria nas células neoplásicas com conseqüente acúmulo nas células do estroma subjacente (NOEL; FOIDART, 1998), ou, através do estímulo das células neoplásicas, os próprios fibroblastos secretariam a proteína (JOHNSEN et al., 1998).

No entanto, na presente pesquisa, o aumento da expressão da galectina -1 foi observado apenas no epitélio, corroborando com os achados de Cindolo et al. (1999) que mostraram um aumento da expressão da galectina -1 nas células neoplásicas endometriais associada ao aumento do grau de diferenciação histológica. Além disso, predomínio da expressão foi observado, concomitantemente, no núcleo e no citoplasma nas displasias de baixo e alto risco, presentes nos terços inferior e médio. Dessa forma, leva-nos a acreditar que a presença, assim como o aumento da expressão da galectina -1 durante a progressão da displasia epitelial oral possa ocorrer através da sua super produção e conseqüente acúmulo intracelular nas células epiteliais alteradas, ativando fatores fundamentais no processo da transformação neoplásica. Como, por exemplo, o oncogene H-RAS que, conforme citam Rabinovich (2005), Fischer et al. (2005) e Camby et al. (2006), quando a galectina -1 está presente no meio intracelular pode interagir com esse oncogene, participando do processo de transformação neoplásica.

Em todos os casos de displasia e de mucosa oral normal, a alteração da expressão da galectina -3 foi observada apenas nas células epiteliais, corroborando os dados de Lee et al. (2005), ao quais observaram, em casos de mucosa normal, neoplasia intraepitelial e carcinoma cervical, uma expressão mais acentuada no componente parenquimatoso dos espécimes. Fato este também demonstrado por Than et al. (2008) e Alves (2009), os quais notaram uma expressão mais significativa em células epiteliais neoplásicas de carcinoma de tireóide e de língua, respectivamente.

A galectina-3 esteve expressa em 4 (80%) dos 5 casos de mucosa oral analisados nesse trabalho. Dos 50 casos de displasia epitelial oral estudados, um pouco mais da metade dos casos (54%) foram positivos para a galectina -3, havendo então uma diminuição da expressão imuno-histoquímica dessa proteína a medida que o epitélio assume características displásicas, as quais podem culminar com o desenvolvimento do câncer. Essa observação é consistente com estudos prévios os quais mostram diminuição da expressão em espécimes de neoplasia intraepitelial e carcinoma cervical (LEE et al., 2006), carcinoma de ovário (VAN DEN BRULE et al., 1994) e adenocarcinomas uterinos (VAN DEN BRULE et al., 1996) quando comparados aos tecidos normais.

Entretanto em outras neoplasias foi observada uma super expressão da galectina -3, como no carcinoma pancreático (BERBERAT et al., 2001), gástrico (MIYAZAKI et al., 2002), de tiróide (XU et al., 1995), renal (FRANCOIS et al., 1999) e epidermóide da cabeça e do pescoço (ALVES, 2009; DELORGE et al., 2000). Apesar desses resultados contraditórios não estarem completamente elucidados, os níveis de expressão da galectina -3 dependem do tipo de tecido avaliado, sugerindo que fatores específicos do tumor podem modular sua expressividade (TAKENAKA; FUKUMORI; RAZ, 2004; LEE et al., 2006).

No caso das displasias epiteliais orais do presente estudo, acredita-se que a redução da expressão da galectina -3 pode indicar precoces alterações biomoleculares no tecido displásico. Segundo Liu e Rabinovich (2005) e Yang, Rabinovich e Liu (2008), existem evidências que a inibição da expressão da galectina -3 é fundamental para a iniciação da transformação do fenótipo dos tumores e seu subsequente crescimento. Esses mesmos autores ainda afirmam que a localização ectópica da proteína também é fundamental para esse processo. Então, achamos importante ressaltar que, apesar de termos observado uma tendência de redução da expressão no epitélio displásico, vimos também que nos espécimes de displasia epitelial positivos, a marcação foi principalmente nuclear e citoplasmática (63%) seguida por marcação apenas citoplasmática (37%). Enquanto que nos casos positivos de mucosa normal a expressão foi membranar. Dessa forma, nossos achados estão de acordo com Liu e Rabinovich (2003) e Yang et al. (2008), uma vez que houve mudança de localização (localização ectópica) da galectina -3, da membrana para o meio intracelular, quando o epitélio assumiu morfologia displásica.

Além disso, a expressão citoplasmática esteve relacionada com a progressão da mucosa oral normal para a displasia. O que pode está de acordo com o estudo de Honjo et al. (2000) e Califice et al. (2004) em que eles mostraram que o aumento da expressão citoplasmática esteve envolvido com a progressão do câncer.

A localização intracelular está relacionada a sua ação antiapoptótica, principalmente quando localizada no citoplasma. Embora os mecanismos ainda não estejam esclarecidos, é possível que a galectina-3 mimetize a ação da proteína Bcl-2, cuja função antiapoptótica está estabelecida, devido a uma significativa similaridade em suas seqüências (KRZEŚLAK; ANNA LIPÍŃSKA, 2004; NAKAHARA, OKA, RAZ, 2005). Alterações na expressão de proteínas relacionadas a apoptose

são importantes indicadores de transformação maligna de uma lesão (SOUSA et al., 2009).

Apesar da galectina-3 ser encontrada principalmente no citoplasma das células, a membrana celular também tem sido fonte de localização, participando do mecanismo de adesão célula-célula (KRZEŚLAK; ANNA LIPÍŃSKA, 2004; NAKAHARA, OKA RAZ, 2005;). Há evidências de que a galectina-3 pode se ligar a integrina (KRZEŚLAK; ANNA LIPÍŃSKA, 2004), proteína presente na superfície de células epiteliais (LIDDINGTON; BANKSTON, 2000). Isto pode justificar a localização membranar vista nos casos de mucosa oral normal.

Das galectinas estudadas, a -7 foi a que marcou com mais frequência e intensidade os casos de displasia epitelial oral. Dos 50 casos, 44, foram imunopositivos e desses 81,8% a intensidade foi de moderada a forte. Em mucosa oral normal, 4 casos apresentaram positividade de expressão com intensidade de moderada a forte. A galectina -7 está presente no epitélio escamoso estratificado de várias regiões, inclusive na cavidade oral, estando sua expressão associada com a diferenciação e desenvolvimento dos ceratinócitos (KUWABARA et al., 2002; SAUSSEZ; KISS, 2006; YANG; RABINOVICH; LIU, 2008). Em nosso estudo a galectina -7 esteve presente no epitélio da mucosa oral normal e no epitélio displásico, o que está de acordo com o trabalho de Alves (2009), cuja expressão em carcinoma epidermóide de língua foi vista exclusivamente nas células epiteliais neoplásicas. Esses achados podem ser justificados devido a galectina -7 está intimamente relacionada a fisiologia do tecido epitelial, quando comparada as outras galectinas.

A galectina -7 é considerada um marcador epitelial, estando presente em todas as camadas do epitélio, independente do grau de diferenciação do ceratinócito (MAGNALDO; FOWLIS; DARMON, 1998). Entretanto, no nosso estudo, os casos de mucosa oral normal apresentaram marcação nos terços superior e médio, localizado em membrana celular. Segundo Madsen et al. (1995) a galectina-7 pode ser encontrada em áreas de contato célula-célula, particularmente nas camadas superiores da epiderme humana. Saussez e Kiss (2006) sugerem que esta interação célula-célula é necessária para o controle de crescimento normal do tecido.

Nos casos de displasia epitelial oral, a marcação também esteve presente principalmente nos terços médio e superior para os dois graus da lesão. Entretanto, houve mudança em relação a localização celular. Nas displasias de baixo risco

(70,6%) a localização mais comum de marcação foi o núcleo e o citoplasma, seguida da marcação apenas em membrana (23,5%). Nas de alto risco (66,7%) o núcleo e o citoplasma também foram mais freqüentemente marcados, seguidos da marcação apenas em citoplasma (25,9%), com poucos casos marcando apenas membrana (7,4%). Dessa forma, o deslocamento da membrana, para o meio intracelular sugere seu envolvimento com a progressão da mucosa normal para a displasia, como também na progressão da displasia de baixo para alto grau. Esse fato corrobora com o estudo de Saussez et al. (2008), onde o deslocamento da expressão da galectina -7 foi relacionado a progressão tumoral do carcinoma epidermóide de laringe e hipofaringe. Entretanto, diverge quando ao padrão desse deslocamento, uma vez que eles observaram o deslocamento da expressão do citoplasma para o núcleo dos ceratinócitos.

A galectina -7 pode ser encontrada tanto no meio intracelular, no citoplasma ou no núcleo, como no meio extracelular, exibindo diferentes funções de acordo com sua localização celular (KUWABARA et al., 2002). No nosso estudo, houve predomínio intracelular da expressão da galectina -7 nos casos de displasia epitelial oral, corroborando com a localização intracelular em casos de carcinomas de cabeça e pescoço, onde também houve predomínio dessa proteína no interior da célula (SAUSSEZ et al., 2008; ALVES, 2009). A localização intracelular presente nesses dois tipos de lesões, pode estar relacionada pelo fato de que o carcinoma epidermóide pode advir da transformação neoplásica da displasia epitelial oral.

O envolvimento da galectina -7 no desenvolvimento neoplásico está claro, e os estudos apontam que sua função está relacionada principalmente com o processo de regulação da apoptose, especialmente quando presente no interior do ceratinócito (KUWABARA et al., 2002; ALVES, 2009). Portanto, como as outras galectinas, a expressão alterada da galectina -7 está relacionada com as alterações sofridas pelo epitélio na progressão da displasia epitelial.

Inúmeros estudos têm demonstrado perda, diminuição ou aumento da expressão das galectinas -1, -3 e -7 em vários tipos de neoplasias, o que indica o seu envolvimento na tumorigênese, podendo, conseqüentemente, representar um alvo promissor para pesquisas relacionadas, tanto ao diagnóstico e prognóstico quanto à terapia do câncer

CONCLUSÕES

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Alterações na imunexpressão das galectinas -1, -3 e -7 na displasia epitelial oral comparados com a mucosa oral normal, sugerem que estas proteínas estão envolvidas na progressão das displasias, podendo servir como marcadores de alterações biomoleculares da lesão.
- A análise imuno-histoquímica da galectina -1 apresentou maior significância de expressão intracelular nos casos de displasia epitelial e dessa forma, pode estar mais relacionada aos eventos biomoleculares envolvidos no processo de transformação de fenótipo normal para o displásico.



*REFERÊNCIAS*

---

## REFERÊNCIAS

1. ABBEY, L. M. et al. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 80, n. 2, p. 188–191, 1995.
2. ALVES, P. M. **Avaliação imuno-histoquímica das galectinas -1, -3, -4 e -7 em carcinoma epidermóide de língua**. Natal: UFRN, 2009. 129p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.
3. ASHERY, U. et al. Spatiotemporal organization of Ras signaling: rasosomes and the galectin switch. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 4 -6, p. 471- 495, 2006.
4. BERBERAT, P. O. et al. Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 539-549, 2001.
5. BERNERD, F.; SARASIN, A.; MAGNALDO, T. Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences (US)**, v. 96, n. 20 p, 11329-1133, 1999.
6. BRENNAN, J. A. et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 11, p. 712–717, 1995.
7. BROTHWELL, D. J. et al. Observer agreement in the grading of oral epithelial dysplasia. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 31, n. 4, p.300-305, 2003.
8. CALIFICE, S. et al. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene**, v. 23, n. 45, p. 7527-7536, 2004.
9. CAMBY, I. et al. Galectin-1: A small protein with major functions. **Glycobiology**, v. 16, n. 11, p. 137-157, 2006.
10. CAMBY, I. et al. Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 61, n. 7, p. 585-596, 2002.
11. CARINCI, F. et al. Genetic portrait of mild and severe lingual dysplasia. **Oral Oncology**, v. 41, n. 4, p. 365-374, 2005.

12. CHEN, J. et al. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis. **Proteomics**, v. 4, n. 8, p. 2465-2475, 2004.
13. CHEN, Y. K.; HSUE, S. S.; LIN, L. M. p73 expression for human buccal epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma: does it correlate with nodal status of carcinoma and is there a relationship with malignant change of epithelial dysplasia? **Head & Neck**, v. 26, n. 11, p. 945-52, 2004.
14. CHEN, Y. R. et al. Quantitative proteomic and genomic profiling reveals metastasis-related protein expression patterns in gastric cancer cells. **Journal of Proteomic Research**, v. 5, n. 10, p. 2727-2742, 2006.
15. CHIANG, W. F. 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**, v. 44, n. 4, p. 325-334, 2008.
16. CINDOLO, L. et al. Galectin-1 and galectin-3 expression in human bladder transitional-cell carcinomas. **International Journal of Cancer**, v. 84, n. 1, p. 39-43, 1999.
17. CRUZ, I. et al. Suprabasal p53 immunoexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 2, p. 98-104, 2002.
18. CRUZ, I. B. et al. p53 Expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 184, n. 4, p. 360-368, 1998.
19. DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 285-293, 2002.
20. DANTAS, D. D. L. et al. Clinical-pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. **Brazilian Dental Journal**, v. 14, n. 1, p. 22-25, 2003.
21. DAVIDSON, P.J. et al. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. **Glycobiology**, v. 12, n. 5, p. 329-237, 2002.
22. DELACOUR, D.; KOCH, A.; JACOB, R. The role of galectins in protein trafficking. **Traffic**, v. 10, n. 10, p. 1405-1413, 2009.
23. DELORGE, S. et al. Correlation of galectin-3/galectin-3-binding sites with low differentiation status in head and neck squamous cell carcinomas. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 122, n. 6, p. 834-884, 2000.

24. DEMERS, M.; MAGNALDO, T.; ST-PIERRE, Y. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. **Cancer Research**, v. 65, n. 12, p. 5205-5210, 2005.
25. DEMYDENKO, D.; BEREST, I. Expression of galectin-1 in malignant tumors. **Experimental Oncology**, v. 31, n. 2, p. 74-79, 2009.
26. DHIRAPONG, A. et al. The immunological potential of galectin-1 and -3. **Autoimmunity reviews**, v. 8, n. 5, p. 360-363, 2009.
27. ELOLA, M. T. et al. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 13, p. 1679-1700, 2007.
28. FISCHER, D. J. et al. Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 33, n. 2, p. 65-70, 2004.
29. FISCHER, C. et al. Galectin-1 interacts with the  $\alpha 5\beta 1$  fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 44, p. 37266-37277, 2005.
30. FRANCOIS, C. et al. Galectin-1 and galectin-3 binding pattern expression in renal cell carcinomas. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 112, n. 2, p. 194-203, 1999.
31. FUKUMORI, T.; KANAYAMA, H. O.; AVRAHAM, M. R. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 10, n. 3, p. 101-108, 2007.
32. GALE, N. et al. Epithelial precursor lesions. In: BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHHART, P.; SIDRANSKY S. **World Health Organization Classification of Tumors. Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. p. 177-179.
33. GRANDIS, J.R. et al. Head and neck cancer: meeting summary and research opportunities. **Cancer Research**, v. 64, n. 21, p. 8126-8129, 2004.
34. HE, Q. Y. et al. Identification of tumor associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 271-278, 2004.
35. HONJO, Y. et al. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 12, p. 4635-4640, 2000.
36. JABER, M. A. et al. Oral epithelial dysplasia: clinical characteristics of western European residents. **Oral Oncology**, v. 39, n. 6, p. 589-596, 2003.

37. JOHNSEN, M. et al. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 667-671, 1998.
38. JOHNSON, N. W.; RANASINGHE, A. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. Potentially malignant lesions and conditions of the mouth and oropharynx: natural history- cellular and molecular markers of risk. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 2, n. 2, p. 31-51, 1993.
39. JORDAN R. C. et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-1 and -9 mRNA is associated with progression of dysplasia to cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 12, p. 6460-6065, 2004.
40. JUNG, E. J. et al. Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 11, p. 2331-2338, 2007.
41. KARABULUT, A. et al. Observer variability in the histological assessment of oral premalignant lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 24, n. 5, p. 198–200, 1995.
42. KOHRENHAGEN, N. et al. Increased expression of galectin-1 during the progression of cervical neoplasia. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 16, n. 6, p. 2018-2022, 2006.
43. KRZESLAK, A.; LIPINSKA, A. Galectin-3 as a multifunctional protein. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 9, n. 2, p. 305-328, 2004.
44. KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v. 42, n. 10, p. 987– 993, 2006.
45. KUJAN, O. et al. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. **Oral Oncology**, v. 43, n. 3, p. 224-231, 2007.
46. KUWABARA, I. et al. Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 5 p. 3487-3497, 2002.
47. LANGBEIN, S. et al. Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance. **Histopathology**, v. 51, n. 5, p. 681-690, 2007.
48. LEE, J. W. et al. Decreased galectin-3 expression during the progression of cervical neoplasia. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 132, n. 4, p. 241-247, 2006.

49. LIDDINGTON, R. C.; BANKSTON, L. A. The structural basis of dynamic cell adhesion: heads, tails, and allosterism. **Experimental Cell Research**, v. 261, n. 1, p. 37-43, 2000.
50. LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29-41, 2005.
51. LIU, F. T.; PATTERSON, R. J.; WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochimica Biophysica et Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 263-273, 2002.
52. LODI, G.; PORTER, S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 2, p. 63-69, 2008.
53. LO MUZIO, L. et al. Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 11, p. 923-928, 2003.
54. LU, J. et al. Gene expression changes associated with chemically induced rat mammary carcinogenesis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 20, n. 2, p. 204-215, 1997.
55. MADSEN, P. et al. Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 11, p. 5823-5829, 1995.
56. MAGNALDO, T.; BARRANDON, Y. CD24 (heat stable antigen, nectadrin), a novel keratinocyte differentiation marker, is preferentially expressed in areas of the hair follicle containing the colony-forming cells. **Journal of Cell Science**, v. 109, n. 13, p. 3035-3045, 1996.
57. MAGNALDO, T.; FOWLIS, D.; DARMON, M. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. **Differentiation**, v. 63, n. 3, p. 159-168, 1998.
58. MCLAREN, K. M. et al. Consistency of histopathological reporting of laryngeal dysplasia. The Scottish Pathology Consistency Group. **Histopathology**, v. 37, n. 5, p. 460-463, 2000.
59. MIYAZAKI, J. et al. Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes. **Oncology Reports**, v. 9, n. 6, p. 1307-1312, 2002.
60. MOISAN, S. et al. Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma is associated with progression toward an aggressive phenotype. **Leukemia**, v. 17, n. 4, p. 751-759, 2003.
61. MONTGOMERY, E. Is there a way for pathologist to decrease interobserver variability in the diagnosis of dysplasia. **The Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 129, n. 2, p. 174-176, 2005.

62. NAKAHARA, S.; OKA, N.; RAZ, A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. **Apoptosis**, v. 10, n. 2, p. 267-75, 2005.
63. NOEL, A.; FOIDART, J.M. The role of stroma in breast carcinoma growth *in vivo*. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 3, n. 2, p. 215-225, 1998.
64. OLIVER, R. J.; MACDONALD, D. G.; FELIX, D. H. Aspects of cell proliferation in oral epithelial dysplastic lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 29, n. 2, p. 49-55, 2000.
65. PITIYAGE, G. et al. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 10, p. 737-52, 2009.
66. PAN, S. et al. Quantitative proteomics investigation of pancreatic intraepithelial neoplasia. **Electrophoresis**, v. 30, n. 7, p. 1132-1144, 2009.
67. PARTRIDGE, M. et al. Allelic imbalance at chromosomal loci implicated in the pathogenesis of oral precancer, cumulative loss and its relationship with progression to cancer. **Oral Oncology**, v. 34, n. 2, p. 77-83, 1998.
68. PLZAK, J. et al. Galectin-3 an emerging prognostic indicator in advanced head neck carcinoma. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 15, p. 2324-2330, 2004.
69. RABINOVICH, G.A. Galectin-1 as a potential cancer target. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 7, p. 1188-1192, 2005.
70. RAZ, A. et al. Evidence for the role of 34-kDa galactoside-binding lectin in transformation and metastasis. **International Journal of Cancer**, v. 46, n. 5, p. 871-877, 1990.
71. REIBEL, J. Prognosis of oral premalignant lesions: significance of clinical, histopathological and molecular biological characteristics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003.
72. RORIVE, S. et al. Changes in galectin-7 and cytokeratin-19 expression during the progression of malignancy in thyroid tumors: diagnostic and biological implications. **Modern Pathology**, v. 15, n. 12, p. 1294-1301, 2002.
73. ROSIN, M.P. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 357-362, 2000.
74. SANJUÁN, X. et al. Differential expression of galectin- 3 and galectin- 1 in colorectal cancer progression. **Gastroenterology**, v. 113, n. 6, p. 1906-1915, 1997.
75. SAUSSEZ, S. et al. Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumour

- progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. **Histopathology**, v. 52, n. 4, p. 483–493, 2008.
- 76.SAUSSEZ, S.; KISS, R. Galectin-7. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 6, p. 686-697, 2006.
- 77.SHEEHAN, G.M. et al. Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. **Human Pathology**, v. 38, n. 4, p. 564-569, 2007.
- 78.SMITH, J. et al. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: A systematic review. **Oral Oncology**, v. 45, n. 8, p. 647–653, 2009.
- 79.SOBEL, G. et al. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. **Human Pathology**, v. 36, n. 2, p. 162-169, 2005.
- 80.SOUSA, F.A. et al. Immunohistochemical expression of PCNA, p53, bax and bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. **Journal of Oral Science**, v. 51, n. 1, p.117-121, 2009.
- 81.SUZUKI, Y. et al. Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 5, p. 924–934, 2008.
- 82.SZÖKE, T. 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**, v. 31, n. 5, p. 783-787, 2007.
- 83.TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; RAZ, A. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7-9, p. 543-549, 2004.
- 84.THAN, T. H. et al. Expression of galectina-3 and galectin-7 in thyroid malignancy as potential diagnostic indicators. **Singapore Medical Journal**, v. 49, n. 4, p.333-338, 2008.
- 85.USAMI, Y. et al. Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Human Pathology**, v. 37, n. 5, p. 569-77, 2006.
- 86.VAN DEN BRÛLE F.A.; WALTREGNY D.; CASTRONOVO V. Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. **Journal of Pathology**, v. 193, n. 1, p. 80-87, 2001.
- 87.VAN DEN BRULE, F.A. et al. Diferential expression of the 67-kD laminin receptor and 31-kD human laminin-binding protein in human ovarian carcinomas. **European Journal of Cancer**, v. 30, n. 8, p. 1096–1099, 1994.



- 88.VAN DEN BRULE, F.A. et al. Expression of the 67-kD laminin receptor, galectin-1, and galectin-3 in advanced human uterine adenocarcinoma. **Human Pathology**, v. 27, n. 11, p. 1185–1191, 1996.
- 89.VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 317-323, 2008.
- 90.WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, n. 3, p. 127-133, 2008.
- 91.WARNAKULASURIYA, S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. **Journal of Pathology**, v. 194, n. 3, p. 294-297, 2001.
- 92.XU, X. C.; EL-NAGGAR, A. K.; LOTAN, R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. potential diagnostic implications. **American Journal of Pathology**, v. 147, n. 3, p. 815–822, 1995.
- 93.YAMAOKA, K. et al. Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 59, n. 6, p. 722–730, 2000.
- 94.YANG, R.Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Molecular Medicine**, v.10, n. 17, p. 1-24, 2008.

APÊNDICES

## APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Este é um convite para você participar da pesquisa “**Avaliação imuno-histoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em displasia epitelial oral**”, que é coordenada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lélia Maria Guedes Queiroz. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Essa pesquisa procura avaliar proteínas (substâncias) presentes em fragmentos de mucosa oral normal. Caso você decida aceitar o convite, não irá passar por nenhum procedimento clínico ou cirúrgico, não havendo o qualquer desconforto. Apenas nos dará a oportunidade de utilizar o material já removido da sua boca durante biópsia realizada anteriormente. Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados da pesquisa serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.

Você terá o benefício de ter sua biópsia reexaminada por um grupo de pesquisadores da área de patologia oral, e no caso de alguma mudança de diagnóstico perante a reavaliação, terá a informação do novo diagnóstico do caso para que se procure ajuda especializada, caso seja necessária. Você não será submetido a nenhuma cirurgia nem nenhum procedimento clínico, sendo assim o risco de sua participação nesse estudo é mínimo.

Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para Prof<sup>a</sup> Lélia Maria Guedes Queiroz, no Departamento de Odontologia da UFRN, no endereço Av. Sen. Salgado Filho, nº 1787, Lagoa Nova, Natal – RN, ou pelo telefone (84)3215-4138. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, localizado no *Campus* Universitário da UFRN, ou pelo telefone (84)3215-3135.

### Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, \_\_\_\_\_, declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa “**Avaliação imuno-histoquímica das galectinas-1, -3 e -7 em displasia epitelial oral**”

Assinatura do Participante

Prof<sup>a</sup> Lélia Maria Guedes Queiroz  
Pesquisadora Responsável

Av. Sen. Salgado Filho, nº 1787. Lagoa Nova, Natal/RN. CEP – 59056-000  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN (Tel: 84-32153135)





## ANEXO A – Parecer de aprovado pelo comitê ética



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO - MEC  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE - UFRN  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

PARECER Nº 114/2009  
(Final)

Prot. nº	034/09-CEP/UFRN
CAAE	0035.0.051.000-09
Projeto de Pesquisa	Avaliação imuno-histoquímica das galectinas -1, -3 e -7 em displasia epitelial oral e mucosa oral normal.
Área de Conhecimento	Ciências da Saúde – Odontologia. - Grupo III.
Pesquisador Responsável	Lêlia Maria Guedes Queiroz
Instituição onde será realizada:	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Instituição Sediadora:	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Nível de Abrangência do Projeto de Pesquisa	Produção científica
Período de Realização	<b>Início:</b> maio de 2009 <b>Término:</b> junho de 2009
Revisão Ética	29 de maio de 2009

### RELATO

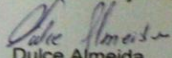
Considerando que as pendências expostas por este Comitê, foram adequadamente cumpridas, o Protocolo de Pesquisa em pauta enquadra-se na categoria de APROVADO.

**ORIENTAÇÕES AO PESQUISADOR:** em conformidade com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa (Brasília, 2002) e Resol. 196/96 – CNS o pesquisador responsável deve:

1. entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), na íntegra, por ele assinada (Resol. 196/96 – CNS – item IV.2d);
2. desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após a análise das razões da descontinuidade pelo CEP/UFRN (Resol. 196/96 – CNS – item III.3z);
3. apresentar ao CEP/UFRN eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa – CONEP – Brasília – 2002 – p.41);
4. apresentar ao CEP/UFRN relatório final após conclusão da pesquisa - (Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa - CONEP – Brasília – 2002 – p.65);

Os formulários para os Relatórios Parciais e Final estão disponíveis na página do CEP/UFRN ([www.etica.ufrn.br](http://www.etica.ufrn.br)).

Natal, 08 de junho de 2009.

  
Dulce Almeida  
COORDENADORA DO CEP-UFRN