

**UNIVERSIDADE DE UBERABA**  
**JANUSA MARIA MUNIZ**

**GALECTINA-9 COMO UM IMPORTANTE MARCADOR NO  
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS DE CAVIDADE ORAL, LEUCOPLASIA ORAL E  
LÍQUEN PLANO ORAL.**

UBERABA, MG  
2013

**JANUSA MARIA MUNIZ**

**GALECTINA-9 COMO UM IMPORTANTE MARCADOR NO  
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS DE CAVIDADE ORAL, LEUCOPLASIA ORAL E  
LÍQUEN PLANO ORAL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Biopatologia.

Orientada: Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues.

UBERABA, MG

2013

*Dedico este trabalho aos meus pais, José Altino Muniz e Lúcia Divina Silva Viçoso por proporcionar ao longo da minha vida amor, dedicação, força e suporte para que todos os meus sonhos e objetivos sejam alcançados.*

---

*õ... Em tempos em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, suspeitas, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo...ö*

*Martha Medeiros*

---

---

Agradeço a **Deus** que em sua infinita misericórdia me proporcionou sabedoria para que eu conquistasse mais essa vitória.

Aos meus pais, **José Altino Muniz e Lúcia Divina Silva Viçoso** que com muito amor e apoio, não mediram esforços para que eu conquistasse mais essa vitória.

À minhas irmãs, **Joelma Maria Muniz e Jailda Maria Muniz** pelo carinho e atenção sempre dedicados.

Ao meu namorado **Ronaldo Goulart Magno Junior** pelo companheirismo e incentivo.

À minha orientadora **Profa. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues** que dedicou tempo, paciência e atenção tornando possível a excussão e conclusão dessa dissertação.

À **UNIUBE** pela disponibilização da estrutura para o desenvolvimento dos projetos.

Ao **Prof. Dr. José Bento Alves**, Coordenador do Programa de Mestrado.

Aos **Profs. do curso de mestrado**.

À funcionária do Curso de Mestrado **Poliana Alves** pelo carinho e generosidade.

À aluna de iniciação científica **Marcela**, que mesmo com todos os seus compromissos me auxiliou com empenho e seriedade no desenvolvimento do presente trabalho.

À técnica de laboratório da UFTM, **Polyanna** pela atenção e auxílio na realização da pesquisa.

À **UFTM** (Universidade Federal do Triângulo Mineiro) por disponibilizar o laboratório de patologia.

---

---

**INTRODUÇÃO:** O câncer de cavidade oral representa o sexto tipo de câncer mais incidente no mundo, sendo os mecanismos patogênicos da doença e sua relação com desordens potencialmente malignas, ainda pouco esclarecidas. Apesar de evidências indicarem o envolvimento galectinas 1,3,9 (Gal-1, Gal-3, Gal-9) e metaloproteinase 3 (MMP-3) bem como mastócitos, na progressão do câncer e metástase, essa ligação permanece largamente desconhecida, sendo necessários mais estudos a fim de reconhecer o real envolvimento das proteínas e células citadas acima em desordens potencialmente malignas (DPM) e carcinomas de células escamosas de cavidade oral (CCE oral) em humanos. **OBJETIVOS:** Avaliar e quantificar os mastócitos e analisar *in situ* a expressão de Gal-1, Gal-3, Gal-9 e MMP-3 envolvidas em DPM e CCE oral comparando-as com o grupo controle. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram selecionados 80 casos de lesões orais e 13 casos normais obtidos entre 1999 e 2009 no Serviço de Anatomia Patológica do Curso de Odontologia da UNIUBE, e no Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia ó PATMED/Uberaba, sendo 40 casos de CCE oral, 20 casos de leucoplasia oral, 20 casos de líquen plano oral e 13 casos do grupo controle. Foi realizada a coloração de azul de toluidina para a quantificação dos mastócitos. Para técnica de imunohistoquímica foram utilizados anticorpos anti-Gal-1, anti-Gal-3, anti-Gal-9 e anti-MMP-3 sendo que a densidade de células imunomarcadas foi expressa em  $\text{mm}^2$ . **RESULTADOS:** a densidade de mastócitos foi significativamente menor nos pacientes com leucoplasia oral e CCE oral quando comparado ao grupo controle ( $p=0,018$ ). Expressão de Gal-1 foi significativamente menor nos pacientes com leucoplasia oral quando comparado com os pacientes com CCE oral e com o grupo controle ( $p=0,0001$ ). A Gal-3 foi significativamente maior nos pacientes com leucoplasia oral quando comparados com os pacientes com CCE oral ( $p=0,032$ ). E comparado a Gal-3 com grau de malignidade esta foi significativamente menor nos casos de CCE oral de grau I quando comparadas com o grupo controle ( $p=0,001$ ). A Gal-9 foi significativamente maior nos pacientes com CCE oral comparado com os demais grupos ( $p=0,0001$ ). A imunomarcagem para MMP-3 foi significativamente maior nos pacientes com líquen plano oral comparado com os casos de leucoplasia oral ( $p=0,013$ ). **CONCLUSÃO:** A expressão aumentada de Gal-9 permitiu diferenciar CCE oral das DPM. Nossos achados apontam que essas lesões orais de alguma forma diminuem a presença de mastócitos nestes tecidos, assim como, aumentam a expressão de MMP3 no líquen plano. A expressão dos demais marcadores investigados foi distinta no líquen plano na leucoplasia e no CCE oral. Assim, conhecer como estas proteínas são expressas pode colaborar para o melhor entendimento das aplicações diagnósticas e terapêuticas dessas moléculas.

**PALAVRAS CHAVES:** Galectinas; Metaloproteinases; Mastócitos, Carcinoma oral de células escamosas; Leucoplasia oral; Líquen plano oral.

---

---

**BACKGROUND:** The oral cavity cancer is the sixth most frequent cancer worldwide, and the pathogenic mechanisms of the disease and its relationship with potentially malignant disorders, are still unclear. Despite evidence indicating the involvement 1,3,9 galectins (Gal-1, 3 Gal-, Gal-9), metalloproteinase 3 (MMP-3) and mast cells in cancer progression and metastasis, this relation remains largely unknown. More studies are necessary in order to recognize the real involvement of proteins and cells in the aforementioned potentially malignant disorders (MPD) and squamous cell carcinomas of the oral cavity (oral SCC) in humans. **OBJECTIVES:** To assess and quantify mast cells in situ and analyze the expression of Gal-1, Gal-3, Gal-9 and MMP-3 and DPM involved in oral SCC compared with the control group. **MATERIAL AND METHODS:** We selected 80 cases of oral lesions and 13 normal cases obtained between 1999 and 2009 in the Department of Pathology of the School of Dentistry UNIUBE, and Laboratory of Pathology and Cytopathology - PATMED / Uberaba, 40 cases of oral CCE, oral leukoplakia in 20 cases, 20 cases of oral lichen plane and 13 cases in the control group. Staining was performed with toluidine blue for the quantitation of the mast cells. For immunohistochemistry were used anti-Gal-1, anti-Gal-3, anti-Gal-9 and anti-MMP-3 and the density of immunostained cells was expressed in mm<sup>2</sup>. **RESULTS:** The density of mast cells was significantly lower in patients with oral leukoplakia and oral CCE when compared to the control group ( $p = 0.018$ ). Gal-1 expression was significantly lower in patients with oral leukoplakia when compared with oral CCE patients and the control group ( $p = 0.0001$ ). The Gal-3 was significantly higher in patients with oral leukoplakia when compared with patients with oral CCE ( $p = 0.032$ ). And compared to Gal-3 with this malignancy was significantly lower in oral CCE grade I when compared with the control group ( $p = 0.001$ ). The Gal-9 was significantly higher in oral CCE patients compared with the other groups ( $p = 0.0001$ ). The immunostaining for MMP-3 was significantly higher in patients with oral lichen planus compared with cases of oral leukoplakia ( $p = 0.013$ ). **CONCLUSION:** Increased expression of Gal-9 oral CCE allowed differentiation of oral DPM. Our findings indicate that these oral lesions otherwise diminish the presence of mast cells in these tissues, as well as increase the expression of the MMP3 oral lichen planus. The expression of other markers investigated was distinct in oral lichen planus in oral leukoplakia and CCE. So knowing how these proteins are expressed can contribute to the better understanding of the applicability of these diagnostic and therapeutic molecules.

**KEYWORDS:** Galectins; Metalloproteinases; Mast cells, Oral squamous cell carcinoma, Oral leukoplakia, Oral lichen planus.

---

CCEs: carcinomas de células escamosas de cavidade oral

DAB: diaminobenzidina

DPM: desordens potencialmente malignas

ECM: matrix extracelular

EGF: fator de crescimento epidérmico

Gal: galectina

Gal-1: galectina-1

Gal-3: galectina-3

Gal-9: galectina-9

IL-6: interleucina-6

INCA: instituto nacional de câncer

MMPs: metaloproteinases de matriz

MMP-2: metaloproteinases da matriz-2

MMP-3: metaloproteinases da matriz -3

MMP-9: metaloproteinases da matriz-9

LPO: líquen plano oral

OMS: organização mundial da saúde

PBS: tampão fosfato salina

PBS-BSA: tampão fosfato salina - soro de albumina bovino

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

TNF- : fator de necrose tumoral alfa

TGF-b: fator transformador de crescimento beta

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

---

---

Figura 1A-Histoquímica de mastócitos de biópsias de pacientes com CCE oral (A), Leucoplasia (B), Líquen Plano (C) e grupo controle (D)(100x).....	38
Figura 1B- Imunomarcção para Gal-1 de biópsias de pacientes com CCE oral (A), Leucoplasia (B), Líquen Plano (C) e grupo controle (D)(40x).....	39
Figura 1C- Imunomarcção para Gal-3 de biópsias de pacientes com CCE oral (A), Leucoplasia (B), Líquen Plano (C) e grupo controle (D)(40x).....	40
Figura 1D: Imunomarcção para Gal-9 de biópsias de pacientes com CCE oral (A), Leucoplasia (B), Líquen Plano (C) e grupo controle (D)(40x).....	41
Figura 1E: Imunomarcção para MMP-3 de biópsias de pacientes com CCE oral (A), Leucoplasia (B), Líquen Plano (C) e grupo controle (D)(40x).....	42
Figura 2- Distribuição da densidade de mastócitos/mm <sup>2</sup> presentes em biópsias de pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano comparadas com o grupo controle.....	32
Figura 3- Distribuição do número de células positivas/mm <sup>2</sup> para Gal-1 presentes em biópsias pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano comparadas com o grupo controle.....	33
Figura 4- Distribuição do número de células positivas/mm <sup>2</sup> para Gal-3 presentes em biópsias de pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano comparadas com o grupo controle.....	34
Figura 5- Distribuição do número de células positivas para Gal-3 mm <sup>2</sup> presentes em biópsias de pacientes com CCE oral, de acordo com o grau de malignidade comparado com o grupo controle.....	35
Figura 6- Distribuição do número de células positivas/mm <sup>2</sup> para Gal-9 presentes em biópsias de pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano comparadas com o grupo controle.....	36
Figura 7- Distribuição do número de células positivas/mm <sup>2</sup> para MMP-3 presentes em biópsias de pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano comparadas com o grupo controle.....	37

---

---

Tabela 1-Especificação das diluições e produtos utilizados para cada anticorpo.....29

Tabela 2 - Distribuição da média da idade, sexo dos pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano e grupo controle.....31

---

# *Sumário*

---

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>X</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Neoplasias malignas.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2 Lesões pré-malignas.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Envolvimento dos mastócitos nas lesões malignas e desordens potencialmente malignas.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Envolvimento das Galectinas 1, 3 e 9 nas lesões malignas e desordens potencialmente malignas .....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Envolvimento da metaloproteinase-3 nas lesões malignas e desordens potencialmente malignas.....</b>	<b>22</b>
<b>2 HIPÓTESE.....</b>	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Seleção das amostras de tecido .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Histoquímica.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Imunohistoquímica .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Análise morfométrica.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Análise estatística .....</b>	<b>30</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>47</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>

---

---

# *Introdução*

---

## **1.1 Neoplasias malignas**

O problema do câncer no Brasil ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando, e com isso, o tema tem conquistado espaço nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas de governo. O conhecimento sobre a situação dessa doença permite estabelecer prioridades e alocar recursos de forma direcionada para a modificação positiva desse cenário na população brasileira (BRASIL, 2012).

Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (BRASIL, 2012).

Aproximadamente 10% dos tumores malignos que ocorrem no corpo humano estão localizados na boca (PINHEIRO et al., 1998), sendo esse, o sexto tipo de câncer mais incidente no mundo (SYRJANEN, 2005).

De acordo com o Instituto Nacional de câncer (INCA), na distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma, o câncer de cavidade bucal representa 5,1%, sendo o quarto tipo de câncer mais acometido em homens (BRASIL, 2012).

Em comparação com as neoplasias malignas da pele, aquelas que ocorrem na cavidade oral apresentam prognóstico pior, com morbimortalidade elevada, devido à grande vascularização dessa área, que propicia a disseminação neoplásica, e ao tratamento, que pode provocar mutilação nos pacientes. (GABRIEL et al., 2004; CH'NG et al., 2006).

Estimam-se 9.990 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.180 em mulheres, para o Brasil, no ano de 2012. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres. Nove de cada 10 cânceres da cavidade oral e orofaringe são carcinomas de células escamosas (BRASIL, 2012).

---

# 1. Introdução

---

Os carcinomas de células escamosas (CCEs) são neoplasias malignas originadas do epitélio escamoso e podem ser bem diferenciados, moderadamente ou pouco diferenciados, ou ainda indiferenciados. Esses tumores podem ocorrer na pele (local mais frequente), boca, laringe, esôfago e colo uterino, locais esses revestidos por epitélio escamoso, ou no contexto de metaplasia escamosa, em que o epitélio original sofre transformação para epitélio escamoso, como é observado nos casos de CCE brônquico (CH'NG et al., 2006).

Apesar de ainda não haver uma clara compreensão da etiologia do câncer, vários fatores determinantes têm sido detectados e investigados. O conhecimento dos fatores de risco constitui a base para uma prevenção efetiva da doença. Mesmo sendo o câncer de boca uma doença multifatorial, o tabaco e o álcool são os dois fatores de risco mais importantes não só para o desenvolvimento da neoplasia, como também para seu prognóstico (BUNDGAARD; BENTZEN; WILDT, 1994).

Cancro oral é caracterizado por um elevado grau de capacidade de invasão local e uma elevada taxa de metástases para nódulos linfáticos cervicais. A morte como resultado de um câncer é geralmente o resultado de recorrência local ou metástases regionais e/ou sistêmica. Deste modo, a metástase é o problema extenuante no tratamento do cancro com sucesso, e acredita-se que eles começam no crescimento do tumor primário (VICENTE et al., 2005).

O estágio inicial do câncer de células escamosas é denominado carcinoma *in situ*, isto é, as células cancerosas estão presentes apenas no epitélio, diferente de carcinoma de células invasivas, onde as células cancerosas se desenvolvem nas camadas mais profundas da cavidade oral ou orofaringe (BRASIL, 2012).

As classificações histopatológicas para os carcinomas de células escamosas (CCE) da cavidade oral surgiram na tentativa de explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes (LOURENÇO et al., 2007).

---

# ***1. Introdução***

---

A classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS, em 2005, baseou-se no grau de diferenciação celular e permitiu o agrupamento dessa neoplasia maligna em três categorias. Os carcinomas de células escamosas de cavidade oral (CCE oral) puderam, então, ser classificados em pouco, moderadamente e bem diferenciados. Os bem diferenciados (Grau I) foram assim denominados quando sua arquitetura tecidual se assemelhou a um padrão normal de epitélio escamoso. Os CCEs moderadamente diferenciados (Grau II) apresentaram certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca ceratinização. Já aqueles que se mostraram pouco diferenciados (Grau III), caracterizaram-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização (BARNES et al., 2005).

## **1.2 Lesões pré-malignas**

As lesões pré-malignas ou lesões precursoras do câncer são alterações teciduais que podem assumir o caráter de tumor maligno, a qualquer tempo, mas, por outro lado, podem permanecer estáveis por um considerável período de tempo (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006).

Os termos pré-cancer, lesões precursoras, pré-malignas, neoplasia intra-epitelial, potencialmente maligna, lesões pré-cancerosas, e condições pré-malignas, tem sido utilizados amplamente na literatura internacional para descrever lesões com potencial de se tornarem um câncer. Entretanto, a Organização Mundial da Saúde, recomenda a utilização do termo *desordens potencialmente malignas* (DPM), para estas lesões (NAPIER, SPEIGHT, 2008; VAN DER WALL, 2009).

As desordens orais potencialmente malignas (DPM) podem ser caracterizadas como lesões com risco de crescimento celular descontrolado e transformação em câncer, seguida pela perda do funcionamento normal dos tecidos. O processo patológico dessas desordens afetas principalmente o epitélio escamoso estratificado que reveste toda a cavidade oral e orofaringe (SILVERMAN JR; GORSKY; KAUGARS, 1996).

---

# 1. Introdução

---

O conceito de algumas lesões da mucosa oral a serem consideradas *ô*pré-cancerosas *ô* está baseado em algumas evidências descritas de acordo com a classificação de Warnakulasuriya, Johnson e Van Der Waal (2007):

- Estudos longitudinais de áreas de tecido com alterações na aparência clínica, identificadas primeiramente como *ô*pré-cancerosas *ô*, se malignizaram durante o acompanhamento clínico.
- Algumas destas alterações, principalmente as que exibem aspecto branco e/ou vermelho, são vistas nas margens de carcinomas de células escamosas.
- Partes destas lesões podem apresentar mudanças morfológicas e citológicas de malignização, contudo, sem franca invasão do tecido conjuntivo.
- As alterações cromossômicas, moleculares e do genoma encontradas em carcinomas orais invasivos são detectadas nestas lesões.
- As manifestações clínicas mais frequentes da DPM são as leucoplasias relacionadas ao processo bioquímico de hiperkeratose. A hiperkeratose leva ao aparecimento de uma mácula ou placa branca que não pode ser removida da superfície mucosa pela raspagem.

Leucoplasia é um termo clínico utilizado para denominar uma placa predominantemente branca da mucosa oral, não removível à raspagem, que não pode ser classificada clinicamente em qualquer outra entidade. Sua superfície pode apresentar-se lisa, rugosa ou verrucosa, sendo a lesão precursora mais frequente da boca (GABRIEL et al., 2004). As mudanças microscópicas que ocorrem nas leucoplasias variam de uma simples hiperkeratose a um carcinoma de células escamosas em fase inicial. Embora uma lesão mista vermelha e branca possa ter uma chance maior de apresentar alterações displásicas, a aparência clínica de uma leucoplasia não é indicativa de seu aspecto microscópico (LUMERMAN, FREEDMAN, KERPEL, 1995; NEVILLE et al., 2004).

A taxa de transformação maligna de leucoplasia varia de 0% a 20%, sendo em média de 5% (BUNDGAARD; BENTZEN; WILDT, 1994). Esta alta prevalência da leucoplasia oral requer atenção especial dos cirurgiões-dentistas que podem, ao exame clínico, identificarem áreas suspeitas e diagnosticá-las, pois, devido ao seu risco de transformação maligna, requer intervenção terapêutica adequada, a qual inclui identificação e remoção dos fatores de risco, bem como controle periódico do paciente, devido à possibilidade de recidivas (GABRIEL et al., 2004).

---

# *1. Introdução*

---

Líquen plano oral (LPO) é uma dermatose inflamatória crônica, com clínica e histopatologia características. No entanto, sua etiologia e a patogenia permanecem obscuras. A origem viral é considerada em função de achados de corpos de inclusão na microscopia eletrônica. Outras etiologias aventadas são a predisposição genética (ocorrência familiar), alterações psicogênicas, imunológicas e neurológicas (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

Embora se acredite que o LPO seja uma doença autoimune, mediada por células T, sua causa permanece desconhecida (SUGERMAN et al., 2000). Evidências atuais sugerem que a doença esteja relacionada a uma alteração da imunidade mediada por células, precipitada por fatores endógenos ou exógenos, resultando em uma resposta alterada a autoantígenos (THORNHILL, 2001; CARROZZO et al., 2004).

O potencial de transformação maligna do LPO, além de suas características clínicas e possíveis relações com alterações sistêmicas, foi avaliado após acompanhamento de 723 pacientes com a doença num período de seis meses a oito anos. Nesse estudo o autor constatou que houve o desenvolvimento do carcinoma epidermóide em locais previamente diagnosticados como líquen plano em 0,8% dos pacientes avaliados. Frente a isto, o autor afirma ser fundamental o acompanhamento periódico dos pacientes com LPO, devido ao aumento do risco de desenvolvimento do carcinoma de células escamosas em locais acometidos pela doença (EISEN et al., 2002).

Contudo, ainda não se sabe com certeza o porquê de tal transformação acontecer. Atualmente existem evidências suficientes comprovando que processos inflamatórios crônicos, como é o caso do LPO, criariam um micro-ambiente baseado em citocinas capazes de influenciar a sobrevivência das células, além do seu crescimento, proliferação e diferenciação, contribuindo conseqüentemente com a iniciação, promoção e progressão do câncer. Por outro lado, alguns autores, acreditam que tal transformação seja favorecida por alterações na expressão de proteínas que regulam os mecanismos de apoptose (MIGNOGNA, 2004).

Aspectos clínicos característicos do LPO são, na maioria das vezes, suficientes para o diagnóstico correto da doença. Ainda assim, a biópsia associada ao exame histopatológico é recomendada para confirmar o diagnóstico clínico e, principalmente, para excluir a presença de atípicas epiteliais ou mesmo indícios de malignidade (FARIA, 2008).

---

# ***1. Introdução***

---

Durante as últimas décadas, numerosos estudos têm indicado um aumento no risco de desenvolvimento de câncer em pacientes com LPO, fazendo com que OMS classificasse esta doença como condição pré-maligna. Contudo, a associação entre o LPO e o CCE oral ainda é bastante polêmica, uma vez que muitos autores acreditam não haver dados suficientes que comprovem tal associação. Para estes autores, a grande maioria dos casos de transformação maligna não poderia ser assim considerada, por já apresentarem alterações sugestivas de malignidade no momento em que se chegou ao diagnóstico inicial de LPO. Ainda assim, não são poucos os estudos que destacam o seu potencial de malignização (EISENBERG, 2000; RÖDSTRÖM et al., 2004).

## **1.3 Envolvimento dos mastócitos nas lesões malignas e desordens potencialmente malignas**

Os mastócitos são originados de células progenitoras hematopoiéticas multipotentes que circulam nos vasos sanguíneos e posteriormente migram para os tecidos periféricos. Em sua fase final de diferenciação participam ativamente da resposta imune (FREITAS et al., 2011).

O padrão de infiltração de células inflamatórias no microambiente tumoral pode contribuir na progressão do câncer, na formação de metástases e na inibição do crescimento tumoral (BALKWILL, 2004). Em neoplasias os macrófagos, linfócitos, células natural-killer, células endoteliais, fibroblastos, eosinófilos e mastócitos são os elementos celulares mais comumente encontrados (BALKWILL, 2004; COUSSENS, WERB, 2002; IAMARRON et al., 2003).

O número e o tipo de células que compõe o infiltrado inflamatório em neoplasias estão relacionados com a produção local de quimiocinas e outros fatores quimiotáticos pelas células do tumor e do estroma (BALKWILL, 2004; OLIVEIRA-NETO et al., 2007).

A infiltração de leucócitos nos tecidos é um achado comum de muitas condições fisiológicas e patológicas. Populações específicas de leucócitos infiltrando os epitélios escamosos com queratinócitos pré-malignos ou malignos foram recentemente descritas como tendo um papel significativo na patogênese dos carcinomas de células escamosas. (JUNANKAR et al., 2006).

---

# 1. Introdução

---

A densidade de mastócitos em tecidos tem sido estudada usando métodos colorimétricos histoquímicos, como o azul de toluidina, alcian blue e a imunohistoquímica utilizando triptase, heparina, quimase e carboxipeptidase A (SHARMA et al., 2010). Alguns trabalhos mostraram significativa correlação entre a concentração de mastócitos e a microdensidade vascular em DPM e no CEC oral (IAMAROON et al., 2003; RANIERI et al., 2002).

Mastócitos são células residentes no tecido conectivo normal. Sua densidade varia de um órgão para outro, mas está constantemente bem representada no trato respiratório. A hiperplasia de mastócitos foi encontrada em muitos tumores, porém seu significado é questionável (BALICA et al., 2007). Dados recentes sugerem que os mastócitos podem ter papéis opostos na biologia tumoral e que o microambiente pode polarizar essas células para possuírem efeito tanto promotor quanto inibidor nos tumores (CH'NG et al., 2006). Os mastócitos têm sido relacionados à progressão tumoral via promoção da angiogênese (ELPEK et al., 2001).

Alguns autores sugerem que as células do CCE e os mastócitos podem controlar a resposta angiogênica pela liberação de VEGF (SAWATSUBASHI et al., 2000). Embora os mastócitos sejam associados à promoção de angiogênese em alguns tumores malignos, especialmente do trato aerodigestivo, pouco é conhecido sobre sua atuação nos CCEs orais (IAMAROON et al., 2003). Recentemente, a triptase dos mastócitos foi identificada como outro potente fator pró-angiogênico nos tumores, e seu papel têm sido estudados em vários tipos de cânceres (ELPEK et al., 2001; BENÍTEZ-BRIBIESCA et al., 2001; IAMAROON et al., 2003). Alguns trabalhos mostraram significativa correlação entre a concentração de mastócitos e a microdensidade vascular em lesões pré-neoplásicas e no CCE oral e sugeriram que os mastócitos aumentam a angiogênese nesses tumores via triptase (IAMAROON et al., 2003; RANIERI et al., 2002). Estudos *in vivo* têm demonstrado que há infiltração e degranulação sequencial de mastócitos durante a carcinogênese dos CCEs e que a sua ativação tem correlação estreita com as distintas fases de hiperqueratose, displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma oral invasivo (SYDNEY et al., 2006).

---

# 1. Introdução

---

## 1.4 Envolvimento das Galectinas 1, 3 e 9 nas lesões malignas e desordens potencialmente malignas

Estudos têm apontado que algumas proteínas derivadas das lectinas, como as galectinas, estão presentes em células normais e tumorais e que estas proteínas estão envolvidas na modulação de diversas funções celulares, inclusive na progressão de neoplasias (LANGBEIN et al., 2007).

Proteínas que pertencem a uma família de lectinas, denominadas galectinas (Gal), que mostram alta afinidade para resíduos  $\beta$ -galactosídeos, participam na migração, adesão e proliferação das células (OLIVEIRA-NETO et al., 2007). Existem 14 tipos de galectinas encontradas em mamíferos participando de diferentes fenômenos biológicos, como interação célula-célula e célula-matriz extracelular, diferenciação celular, angiogênese, apoptose e inflamação (DUMIC, DABELIC, FLÖGEL, 2006; BRUSTMANN, 2006). Alguns estudos apontam que as galectinas tem um papel importante na ativação dos mastócitos (CHEN et al., 2009) já outros estudos experimentais demonstraram que a Gal-3 pode induzir a apoptose de mastócitos (SUZUKI et al., 2008). As galectinas têm emergindo como promissoras na compreensão de inúmeras doenças, incluindo o câncer (BALKWILL, 2004).

As Galectinas se ligam em proteínas localizadas na superfície da célula tumoral, células endoteliais, células-T, e podem ainda se ligar em proteínas da matriz extracelular. Elas podem estar presentes no interior das células tumorais onde desempenham funções anti-apoptóticas e aumentar a sinalização intracelular, que resulta na expressão desregulada de genes envolvidos no tumor progressão. As galectinas mais extensivamente estudadas têm sido a galectina-1 (Gal-1) e a galectina-3 (Gal-3), e alguns estudos apontam que estas proteínas podem ter efeitos profundos sobre o crescimento e no papel biológico funcional das células (BRAEUER et al., 2012).

A função *in vivo* da Gal-1 é incerta, porém em estudos com inibidores dessa lectina em ratos, houve uma inibição do processo inflamatório agudo, por provável redução do influxo de polimorfonucleares no local (CAMBY et al., 2002). Níveis plasmáticos aumentados de Gal-1 e Gal-3 foram encontrados em pacientes com carcinomas de células renais quando comparados com grupo controle, os autores sugerem que tanto a Gal-1 quanto a Gal-3 podem representar um instrumento útil para a detecção primária do câncer renal (KANEKO et al., 2007).

---

# 1. Introdução

---

Estudo em CCE da língua mostrou que a expressão de Gal-1 e Gal-3 estiveram presentes em 87,7% dos casos e foi significativamente correlacionada com metástase. Os autores sugerem que estas proteínas têm uma participação na carcinogênese oral e ainda que estas moléculas possam ser utilizadas como marcadores de comportamento biológico e progressão tumoral (ALVES et al., 2011).

Gal-1 está amplamente distribuída em tecidos normais e patológicos e parece ser funcionalmente pleiotrópica, podendo agir na regulação da proliferação e diferenciação celular e apoptose, interferindo assim na transformação e crescimento tumoral. (BREWER, 2002). Além disso, ela modula as funções das células imunes por controlar a proliferação e a apoptose de células T efectoras, bem como o bloquear a ativação das mesmas (PERILLO, PACE, SEILHAMER, 1995; BI et al., 2008). Sendo assim, alguns autores sugerem que a Gal-1 pode servir como um marcador para o desenvolvimento de carcinoma oral de células escamosas (YU-MEI DING. et al., 2009).

Tem sido descrito que a Gal-1 secretada por tumores facilita a fuga imunitária do tumor, matando as células T citolíticas que alvejam o tumor (RUBINSTEIN et al. 2004 )

A galectina-3 (Gal-3) (proteína de 29-31kDa) está expressa em uma grande variedade de tecidos e células (CVEJIC et al., 2005; LIU, RABINOVICH, 2005). Dependendo da sua localização na célula, a Gal-3 pode exercer diferentes funções, algumas até mesmo antagônicas. Dentre às propriedades funcionais da Gal-3, esta lectina tem assumido múltiplos papéis na patogênese, proliferação e disseminação de metástases (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006), por meio da modulação da adesão das células malignas em sítios distantes através do endotélio vascular (HUGHES, 2004). Assim, a Gal-3 pode ser encontrada em uma ampla variedade de células malignas (HUGHES, 2004; DANGUY, CAMBY, ROBERT, 2002).

É bem aceito que a Gal-3 pode ser encontrada em diferentes compartimentos celulares. Além disso, inúmeros trabalhos têm demonstrado que essa proteína pode mediar várias funções, dependendo de sua localização intracelular (GONG et al., 1999; LIU, RABINOVICH, 2005). Por exemplo, no núcleo, a Gal-3 tem sido implicada com *splicing* de RNAm e proliferação celular, enquanto no citoplasma atua como molécula anti-apoptótica, e no meio extracelular, age modulando positivamente a adesão celular e induzindo apoptose (DUMIC, DABELIC, FLÖGEL, 2006; BRUSTMANN, 2006).

---

# *1. Introdução*

---

Recentemente, vários estudos têm demonstrado a expressão de Gal-3 em diferentes tumores, bem como a sua associação com progressão tumoral e metástases em diferentes linhagens celulares tumorais (CHANG-HONG et al., 2005; BETKA et al., 2003; PLZÁK et al., 2004; TEYMOORTASH et al. 2006) onde a expressão de Gal-3 é dependente do grau de diferenciação celular (BALKWILL, 2004; DUMIC, DABELIC, FLÖGEL, 2006). Em tecido epitelial normal de mucosas bucal e vulvar, por exemplo, a Gal-3 está expressa principalmente nas camadas suprabasal e superficial (COUSSENS, WERB, 2002; CHANG-HONG et al., 2005).

Existem poucos relatos na literatura sobre a expressão da Gal-3 em CCE oral, no entanto, em DPM foi encontrado apenas um artigo onde os autores encontraram a expressão da Gal-3 em 55,5% dos casos analisados de displasias orais (FARIA et al., 2008).

No entanto, os resultados da literatura sobre a expressão da Gal-3 em câncer de cabeça e pescoço são ainda muito contraditórios.

A galectina-9 (Gal-9) tem sido demonstrada com propriedades anti-neoplásicas, regulando diversas funções celulares, tais como a adesão celular, proliferação celular, ou apoptose (ELOLA et al., 2007; OKUDAIRA, HIRASHIMA, ISHIKAWA, 2007). Ela é expressa pelo epitélio do trato gastrointestinal, células endoteliais e vários tipos de células imunitárias, incluindo células T, células B, macrófagos e mastócitos (SEKI et al., 2007; WIENER et al., 2007).

Nos últimos anos a Gal-9 vem sendo estudada tanto na saúde como na doença. Na fisiologia normal, Gal-9 parece ser um modulador importante na imunidade de células T por indução de apoptose em subpopulações de células T específicas. Uma vez que estas populações de células T estão associadas com a auto-imunidade, doenças inflamatórias, e rejeição do enxerto, foi postulado que a aplicação exógena de Gal-9 pode limitar a atividade patogênica das células T (WIERSMA et al., 2011).

Em melanomas e outras doenças malignas, alguns autores sugerem que a Gal-9 tem função supressora de tumor. A diminuição de Gal-9 está estreitamente associada com a progressão da doença metastática (KAGESHITA et al., 2002; IRIE, et al., 2005; YAMAUCHI et al., 2006; LIANG et al., 2008) uma vez que a Gal-9 também está associada com diminuição da expressão das moléculas de adesão do endotélio e inibe as células tumorais à aderirem componentes da matriz extracelular, resultando assim supressão da migração das células tumorais (NOBUMOTO et al., 2008).

---

# ***1. Introdução***

---

A expressão elevada de Gal-9 no citoplasma das células tumorais está intimamente associada com a redução da metástase e com a baixa recorrência em pacientes com melanoma maligno (KAGESHITA et al. 2002). A partir dos resultados de alguns relatos, é concebível que a Gal-9 suprime vários passos de metástases por inibição da ligação de moléculas de adesão sobre as células do tumor para os ligantes no endotélio vascular (ATSUYA N. et al., 2008).

## **1.5 Envolvimento da metaloproteínase-3 nas lesões malignas e desordens potencialmente malignas.**

A interação entre as células tumorais e o estroma é uma condição vital para o crescimento do tumor, invasão celular e metastatização. Este processo envolve fatores de crescimento, moléculas de adesão, estímulos angiogênicos, fatores de coagulação e metaloproteínas de matriz (MMPs) (FOX, GENERALI, HARRIS, 2007; UZZAN et al., 2004).

As MMPs são um grupo de endopeptidases dependentes de zinco que estão envolvidas na degradação de proteínas da matriz extracelular. Dependendo da sua especificidade de substrato, a estrutura do domínio e localização celular, as MMPs podem ser classificadas em colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2, MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11), do tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) e matrilisinas (MMP-7, MMP-26) (BREWER, 2002).

Essas enzimas podem ser produzidas por diferentes tipos celulares na pele, tais como fibroblastos, queratinócitos, macrófagos, células endoteliais, mastócitos e eosinófilos. Geralmente, MMPs não são expressas constitutivamente na pele, mas são induzidas temporariamente em resposta a sinais exógenos, assim como várias citocinas, fatores de crescimento, interações da matriz extracelular e alteração do contato célula a célula. Atualmente, há muitas evidências do importante papel das MMPs no remodelamento proteolítico da matriz extracelular em várias situações fisiológicas, incluindo desenvolvimento da morfogênese tecidual, reparo tecidual e angiogênese. Por outro lado, as MMPs têm também um importante papel patogênico na invasão das células tumorais e metástases (COUSSENS et al., 2000; KÄHÄRI, 1997).

---

# *1. Introdução*

---

A expressão gênica das metaloproteinases pode ser estimulada pela interleucina-1, pelo fator de crescimento epidérmico (EGF), pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- ) (RUNDHAUG, 2005). As MMPs degradam a membrana basal e a maioria dos componentes da matriz extracelular, como colágeno, laminina, fibronectina e elastina, que são barreiras normais para a migração das células e invasão vascular (VISSE, 2003; DUFFY, MAGUIRE, HILL, 2000). Além disto, interagem com as moléculas de adesão celular, como a laminina-5 e a e-caderina, alterando a adesão entre as células tumorais e facilitando o movimento destas através da matriz extracelular (CURRAN; MURRAY, 2000).

A interação entre as células tumorais e o estroma é uma condição vital para o crescimento do tumor, invasão celular e metastatização. Este processo envolve fatores de crescimento, moléculas de adesão, estímulos angiogênicos, fatores de coagulação e proteinases. As MMPs, especialmente a metaloproteinases da matriz-2 (MMP-2) e a metaloproteinases da matriz-9 (MMP-9), são responsáveis pela degradação dos elementos constituintes da membrana basal e da matriz extracelular (AZNAVOORIAN et al., 1993; RUNDHAUG, 2005).

Estudos demonstraram que a metaloproteinases da matriz -3 (MMP-3) provoca efeitos estimuladores na proliferação e migração das células endoteliais, bem como efeitos anti-apoptóticos sobre células in vitro (EGEBLAD, 2002).

Além disso, o tratamento com a MMP-3 em modelo canino de pulpíte irreversível, leve e grave resultou num decréscimo do número de macrófagos e de células apresentadoras de antígenos e uma inibição significativa da expressão de interleucina-6 (IL-6). Estes resultados demonstram que a MMP-3 pode atuar como um agente anti-inflamatório (EBA et al., 2012).

Embora o papel da MMP3 nas DPM ainda não foi completamente elucidado, alguns estudos têm revelado as suas funções tumorigênicas.

O aumento na expressão de MMP3 também tem sido demonstrado em vários tipos de neoplasias (NELSON et al., 2000). Esse aumento de MMP3 em camundongos transgênicos está associada a carcinogênese mamária (STERNLICHT et al., 1999). Acredita-se que as MMPs têm um papel nas fases iniciais de tumorigênese por estimular a proliferação das células e modulação da angiogênese (EGEBLAD, 2002), no entanto, não tem sido encontrada na literatura, a associação destas MMPs em DPM.

---

## ***1. Introdução***

---

Em outros estudos sobre o envolvimento *in vivo* de MMPs e seus inibidores teciduais em câncer oral são incongruentes, além disso, sua correlação com variáveis clínico-patológicas ainda é contraditória, em parte devido à variedade de métodos utilizados para a sua detecção (RAGINI et al., 2010).

Apesar de evidências indicarem o envolvimento das Gal-1, Gal-3 e Gal-9 bem como mastócitos e MMP-3 na progressão do câncer e metástase, essa ligação permanece largamente desconhecida, sendo necessários mais estudos a fim de reconhecer o real envolvimento das proteínas e células citadas acima em lesões com DPM e CCE oral em humanos.

---

## ***2. Hipótese***

---

Os mastócitos influenciam na expressão de galectinas e metaloproteinases, e o aumento destas moléculas está associado com a progressão das desordens potencialmente malignas (DPM) e carcinoma de células escamosas de cavidade oral (CCE oral).

---

---

O objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar, *in situ* a expressão de galectinas 1 (Gal-1), 3 (Gal-3) e 9 (Gal-9) de metaloproteinase 3 (MMP-3) bem como a densidade de mastócitos em biópsias de pacientes com desordens potencialmente malignas (DPM), carcinomas de células escamosas da cavidade oral (CCE oral) e grupo controle (mucosa oral normal).

---

---

A amostra foi constituída de 80 casos de lesões orais e 13 casos normais, obtidas no Serviço de Anatomia Patológica do Curso de Odontologia da Universidade de Uberaba (UNIUBE), no período de abril de 1999 a abril de 2009, e no Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia ó PATMED, no período de dezembro 2004 a dezembro de 2009. Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro sob o protocolo de número CAAE nº 0005.0.227.000-10, a seleção dos casos estudados foram a partir da análise de planilha eletrônica montada no *Software Excel*, fornecida pela UNIUBE e pela PATMED. Esta planilha foi constituída das seguintes informações: código do caso, sexo, raça, idade, local da lesão e diagnóstico histopatológico.

Os dados fornecidos por meio da planilha eletrônica, tanto pela UNIUBE, quanto pela PATMED, não permitiu qualquer acesso a dados de identificação dos pacientes, já que os códigos de registro de entrada no laboratório (código do caso) foram constituídos apenas por algarismos.

### 4.1 Seleção das amostras de tecido

Foram selecionados para o presente estudo 40 casos cujas lesões foram diagnosticadas como CCE em pacientes com faixa etária de 39 a 94 anos de ambos os sexos e raça com lesões localizadas em diferentes partes da cavidade oral.

Obteve-se 20 casos com diagnóstico positivo para leucoplasia oral e 20 casos diagnosticados com líquen plano oral.

No grupo controle foram apresentados 13 casos, esses tecidos foram removidos na extração de dentes molares em que o perfil histopatológico da mucosa oral encontrava-se com características de normalidade, esses pacientes se encontraram com faixa etária de 12 a 94 anos.

As amostras dos quatro grupos em questão foram selecionadas e analisadas no mesmo período.

De posse dos números dos casos selecionados para o estudo, os mesmos foram enviados para a UNIUBE e para a PATMED, a fim de serem separados os blocos de parafina de cada caso.

---

---

### 4.2 Histoquímica

Os blocos de parafina selecionados foram cortados no micrótomo com cortes seriados de 6 µm de espessura, sendo que para cada caso foram preparadas 5 lâminas.

As lâminas nº 1 foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina para o diagnóstico de cada lesão. Para isso, as lâminas foram desparafinadas em xilol, hidratadas em uma bateria de concentração decrescente de álcool, hidratadas em água destilada, coradas com Hematoxilina e posteriormente com Eosina, desidratadas com álcool e novamente passadas no xilol para colagem da lamínula.

Para a detecção de mastócitos as lâminas nº 2 foram desparafinizadas, lavadas em água destilada, coradas com fucsina-laranja G, e rapidamente imerso em álcool a 60%. Em seguida, as lâminas foram rapidamente imersas em azul de toluidina e, em seguida, rapidamente lavadas com água corrente. Finalmente, as lâminas foram montadas e observadas sob um microscópio de luz comum.

Nas demais lâminas foram realizadas a técnica de imunohistoquímica.

### 4.3 Imunohistoquímica

Para determinar e quantificar a expressão *in situ* das galectinas 1, 3, 9 e metaloprotéinase 3 foi realizada a técnica de imunohistoquímica indireta. As lâminas foram desparafinizadas em quatro banhos de xilol cada um por 10 minutos, em seguida passadas por dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95%, um banho de álcool 70% (5 minutos cada banho), e depois mergulhadas em água destilada por 5 minutos.

Para recuperação dos antígenos, as lâminas foram encubadas em banho maria (90°C) no ácido cítrico 0.01 molar pH=6,0 onde permaneceram por 30 minutos, após esse tempo as lâminas foram retiradas e permaneceram por 10 minutos ainda dentro da solução de ácido cítrico. Após o resfriamento, foram acrescentado 100µl de PBS/BSA 2% em cada corte, esses ficaram incubados durante 30 minutos.

O anticorpo primário foi diluído em PBS/BSA 2% de acordo com as especificações de cada anticorpo e colocado nas lâminas permanecendo *overnight* em câmara úmida (tabela 1). Em seguidas as lâminas foram lavadas durante 5 minutos por 4 vezes com PBS 1X mais Tween 20, a 0,05%. Após a lavagem, as lâminas foram imersas na solução de água oxigenada 30% e metanol por 10 minutos e lavadas novamente durante 5 minutos por 4 vezes com PBS 1X mais Tween 20, a 0,05%.

---

Logo depois as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a biotina kit (Dako, Carpinteria, CA) de Biotinylated Link Universal e Streptavidin-HRP durante 30 minutos. Posteriormente, foi retirado o excesso do anticorpo secundário com lavagem em PBS e colocado um complexo de streptoavidina-biotina que foi incubado por mais 30 minutos em temperatura ambiente.

As lâminas foram lavadas com tampão PBS 1X mais Tween 20, a 0,05%, secadas e nelas foi acrescentado a solução reveladora, contendo 1 ml de tampão Tris-HCl ( pH 7,2), 1 comprimido de diaminobenzidina (DAB)(Sigma, St Louis, MO) e 5µl de água oxigenada

A reação foi interrompida lavando-se em água corrente. Posteriormente foi realizada a coloração de fundo com hematoxilina e a montagem das lâminas com entellan.

Tabela 1-Especificação das diluições e produtos utilizados para cada anticorpo.

<b>Anticorpos</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Código</b>
Anticorpo policlonal anti-Galectin-1 humano	1:50	R&D Minneapolis,MN/EUA	AF 1152
Anticorpo purificado anti-Galectin-3 humano	1:75	R&D Minneapolis,MN/EUA	AF 1154
Anticorpo purificado anti-Galectin-9 humano	1:75	R&D Minneapolis,MN/EUA	AF 2045
Anticorpo monoclonal anti-MMP-3 humano	1:10	R&D Minneapolis,MN/EUA	MAB 905

Fonte: Do Autor, 2012.

#### 4.4 **Ánalyse morfométrica**

Avaliação morfométrica foi realizada a partir da quantificação do número de células marcadas com positividade específica, no interior da célula, através da técnica de imunohistoquímica. Esta análise foi realizada, a partir das imagens dos cortes histológicos que foram capturados por um sistema digital e analisados através do software Image Jö (National Institutes of Health, USA). Dessa forma, cada campo a ser quantificado foi capturado por meio de uma câmera acoplada ao microscópio e ao computador para digitalização da imagem. O número de células imunomarcadas de cada campo foi determinado, assim como a área de cada campo (0,14mm<sup>2</sup>). A densidade de células positivas foi expressa pelo número de células por mm<sup>2</sup> e calculada através de uma equação matemática abaixo.

$$\text{Densidade} = \frac{\text{número total de células}}{\text{Área x número de campos avaliados}}$$

---

### 4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa *Statview* (Abaccus - EUA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal foram expressas em média e desvio padrão e aquelas que apresentarem distribuição não normal foram expressos em mediana com valor mínimo e máximo e percentis. As variáveis que apresentaram distribuição normal e variância homogênea foram analisadas pelo teste ANOVA seguida do pós-teste Bonferrone. As variáveis que apresentarem distribuição normal com variância não homogênea ou distribuição não normal foram analisadas pelos testes de Mann-Whitney (T) para comparação de dois grupos independentes ou Krukal-Wallis para 3 ou mais grupos seguida do pós-teste Dunn. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor 5% ( $p < 0,05$ ).

---

Foram avaliadas 93 biópsias cuja média de idade dos pacientes foi de  $51,08 \pm 17,55$  anos, sendo que nos pacientes com CCE oral, a média da idade foi significativamente maior quando comparados com o grupo controle e leucoplasia oral (ANOVA;  $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

Do total de biópsias analisadas, 50 (53,76%) eram do sexo masculino e 43 (46,24%) do sexo feminino. O grupo controle foi constituído de 13 (13,98%) pacientes, sendo que, 3 (27,07%) eram do sexo masculino e 10 (76,93%) do sexo feminino. Dos 40 (43,02%) pacientes CCE oral, 33 (82,5%) pacientes do sexo masculino e 7 (17,5%) do sexo feminino. Nos 20 (21,5%) pacientes com leucoplasia oral, 9 (45%) eram masculinos e 11 (55%) do sexo feminino. Dos 20 (21,5%) casos de pacientes com líquen plano oral 5 (25%) eram do sexo masculino e 15 (57%) feminino (Tabela 2).

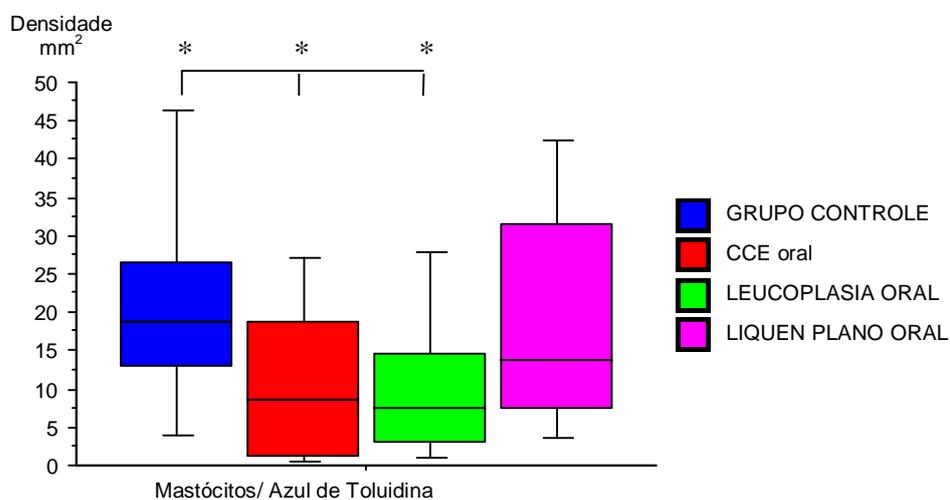
Tabela 2 - Distribuição da média da idade, sexo dos pacientes com CCE oral, leucoplasia oral, líquen plano oral e grupo controle.

	<b>Idade Total</b>	<b>Grupo Controle</b>	<b>Carcinoma oral de células escamosas</b>	<b>Leucoplasia oral</b>	<b>Líquen plano oral</b>
<b>Média Idade/</b>	51,08	34,58*	60,08 *	46,26*	49,26
<b>Desvio Padrão</b>	( $\pm 17,55$ )	( $\pm 19,86$ )	( $\pm 12,85$ )	( $\pm 16,56$ )	( $\pm 15,71$ )
<b>Sexo</b>	50	3	33	9	5
<b>Masculino</b>	(53,76%)	(27,07%)	(82,5%)	(45%)	(25%)
<b>Sexo Feminino</b>	43	10	7	11	15
	(46,24%)	(76,93%)	(17,5%)	(55%)	(57%)

Fonte: Do Autor, 2012.

Na análise histoquímica observou-se que a densidade de mastócitos foi significativamente menor nos pacientes com leucoplasia oral e CCE oral quando comparado com o grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis- Dunn;  $p=0,0184$ ) (Figura 2) (Figura 1A).

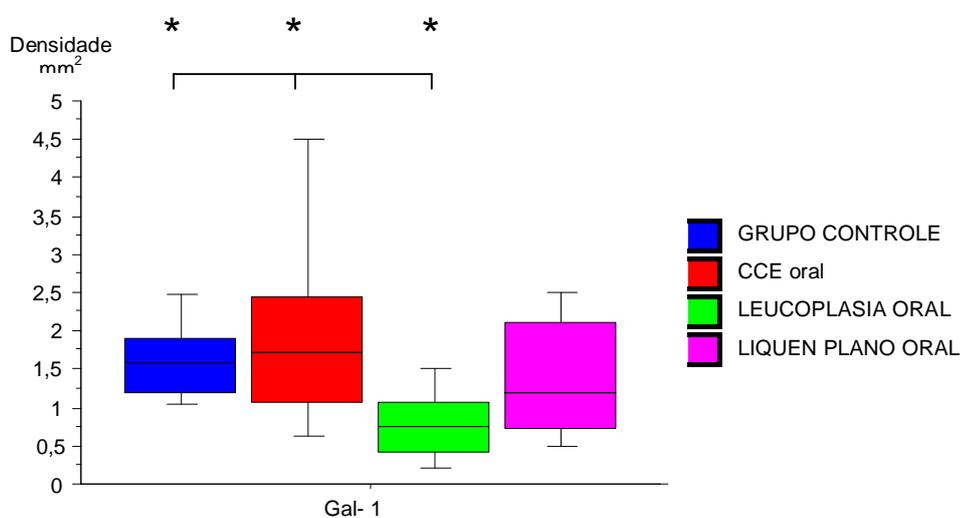
Figura 2- Distribuição da densidade de mastócitos/ $\text{mm}^2$  presentes em biópsias de pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90% (Teste de Kruskal-Wallis-Dunn;  $p=0,0184$ ).



Fonte: Do Autor, 2012.

A imunomarcção para Gal-1 foi significativamente menor nos pacientes com leucoplasia oral quando comparado com os pacientes com CCE oral e grupo controle (Kruskal Wallis- Dunn;  $p=0,0001$ ) (Figura 3) (Figura 1B).

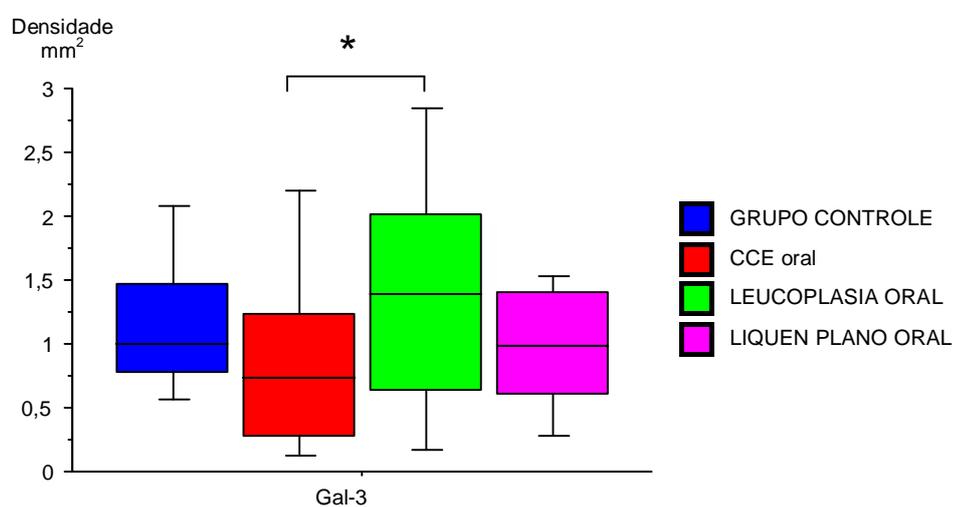
Figura 3- Distribuição do número de células positivas/mm<sup>2</sup> para Gal-1 presentes em biópsias pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90% (Teste de Kruskal-Wallis- Dunn;  $p=0,0001$ ).



Fonte: Do Autor, 2012.

A densidade de células imunomarcadas para Gal-3 foi significativamente maior nos pacientes com leucoplasia oral quando comparados com os pacientes com CCE oral (Mann-Whitney;  $p=0,032$ ). No entanto, quando comparada com os demais grupos a Gal-3 não teve diferença significativa (Kruskal-Wallis- Dunn;  $p=0,06$ ) (Figura 4) (Figura 1C)

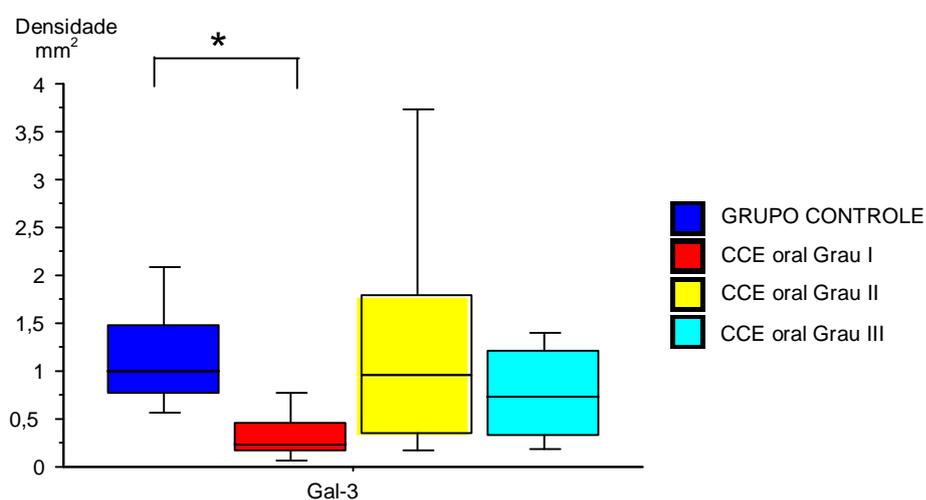
Figura 4- Distribuição do número de células positivas/mm<sup>2</sup> para Gal-3 presentes em biópsias de pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90% (Teste de Kruskal-Wallis-Dunn;  $p=0,06$ ; Mann Whitney;  $p=0,032$ ).



Fonte: Do Autor, 2012.

Ao comparar o número de células positivas para Gal-3 nos pacientes com CCE oral de acordo com o grau de malignidade verificou-se que a Gal-3 foi significativamente menor nos pacientes com CCE oral de grau I quando comparadas com o grupo controle (Kruskal-Wallis- Dunn;  $p= 0,001$ ) (Figura 5).

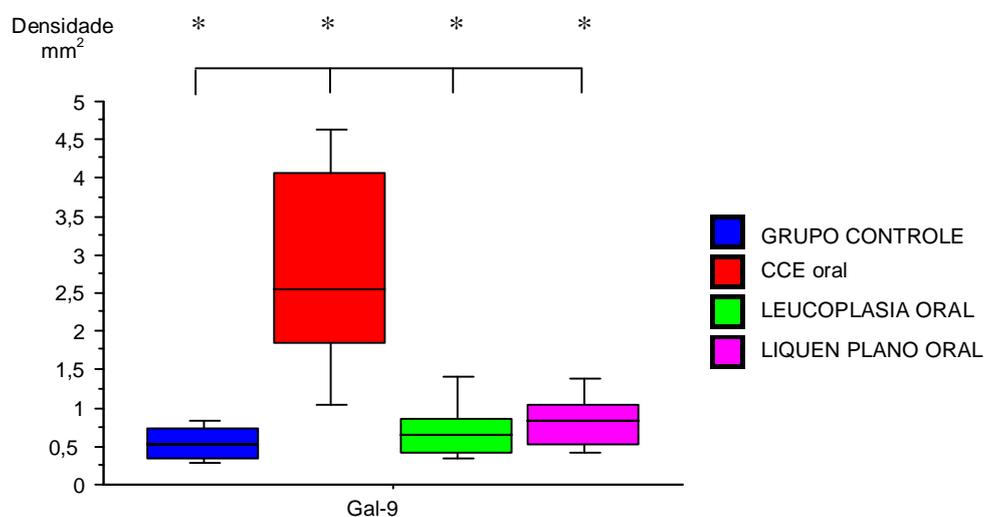
Figura 5- Distribuição do número de células positivas para Gal-3  $\text{mm}^2$  presentes em biópsias de pacientes com CCE oral, de acordo com o grau de malignidade comparado com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90% (Teste de Kruskal-Wallis- Dunn;  $p= 0,015$ ).



Fonte: Do Autor, 2012

A imunomarcação para Gal-9 foi significativamente maior nos pacientes com CCE oral comparado com os demais grupos (Kruskal-Wallis- Dunn;  $p < 0,001$ ) (Figura 6) (Figura 1D)

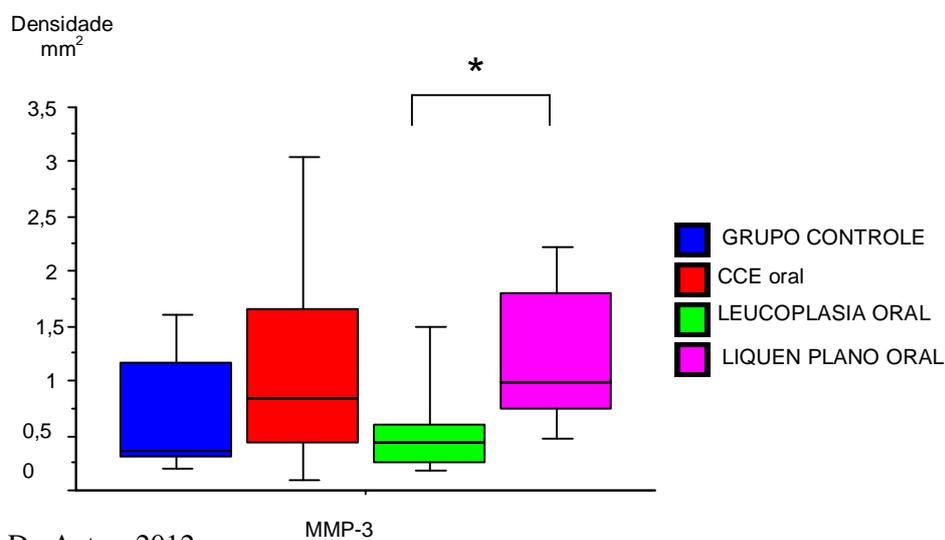
Figura 6- Distribuição do número de células positivas/mm<sup>2</sup> para Gal-9 presentes em biópsias de pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90% (Kruskal-Wallis- Dunn;  $p = 0,001$ ).



Fonte: Do Autor, 2012.

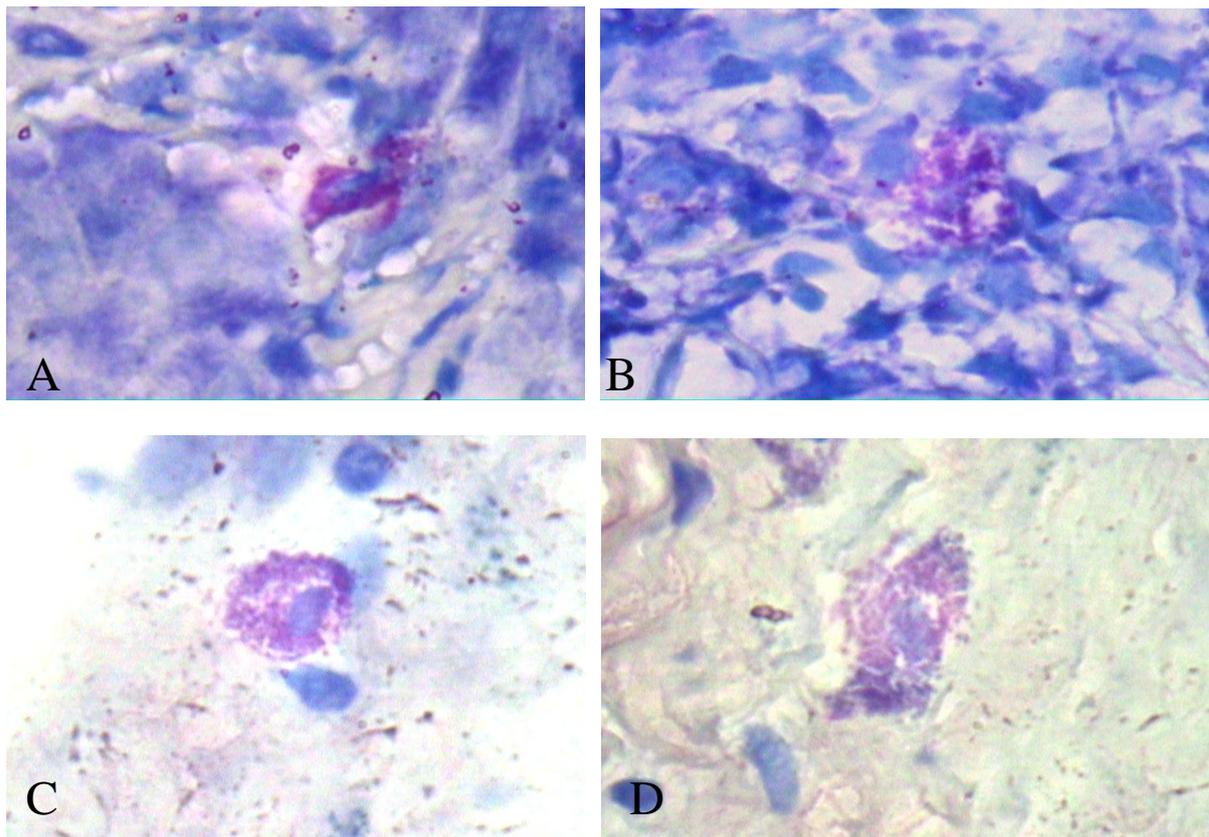
A imunomarcção para MMP-3 foi significativamente maior nos pacientes com Líquen plano oral comparado com leucoplasia oral (Kruskal-Wallis- Dunn;  $p=0,0130$ ) (Figura 7) (Figura 1E).

Figura 7- Distribuição do número de células positivas/mm<sup>2</sup> para MMP-3 presentes em biópsias de pacientes com CCE oral, leucoplasia, líquen plano comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90% (Kruskal-Wallis- Dunn;  $p=0,0130$ ).



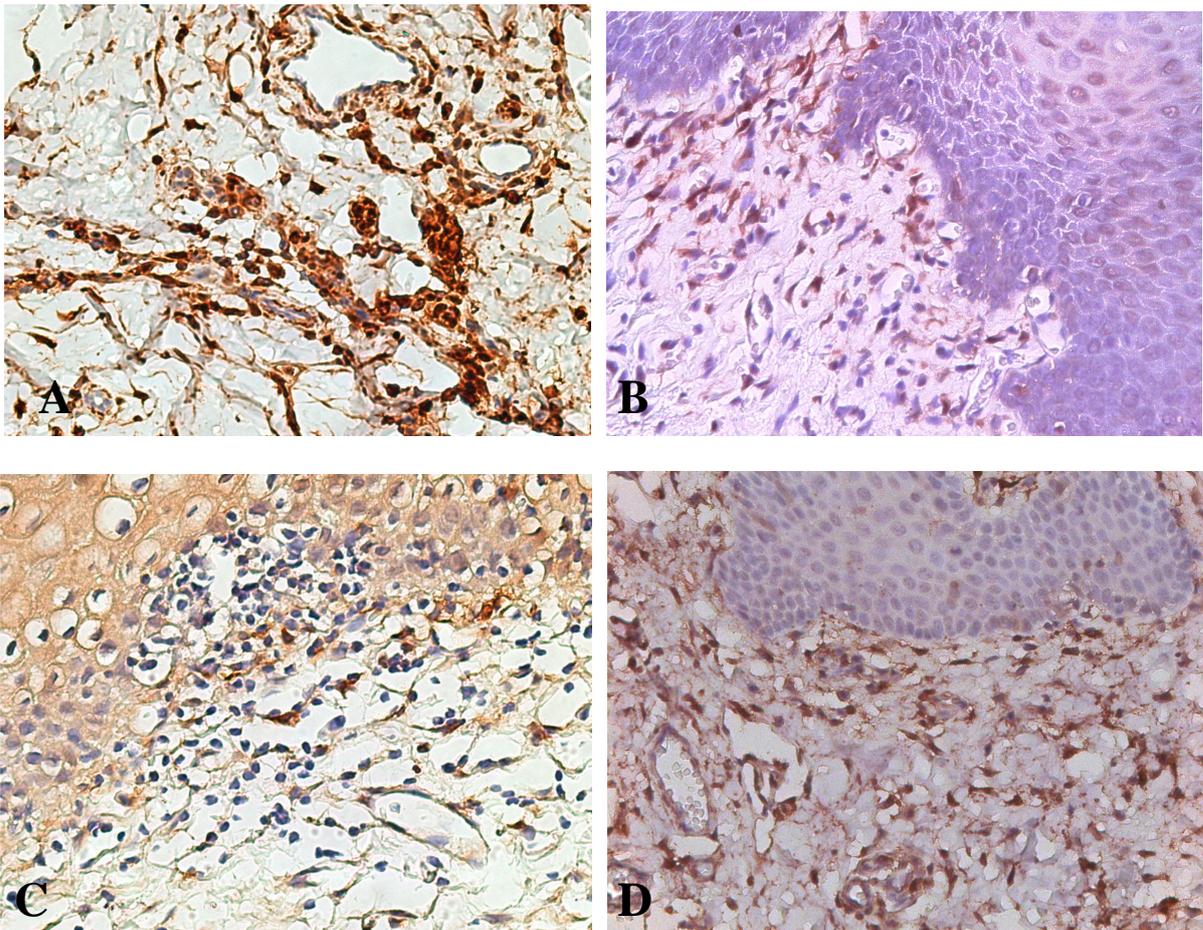
Fonte: Do Autor, 2012.

Figura 1A- Presença de mastócitos corados pelo azul de Toluidina em biópsias de pacientes com CCE oral (A), Leucoplasia oral (B), Líquen plano oral (C) e Grupo controle (D)(100x).



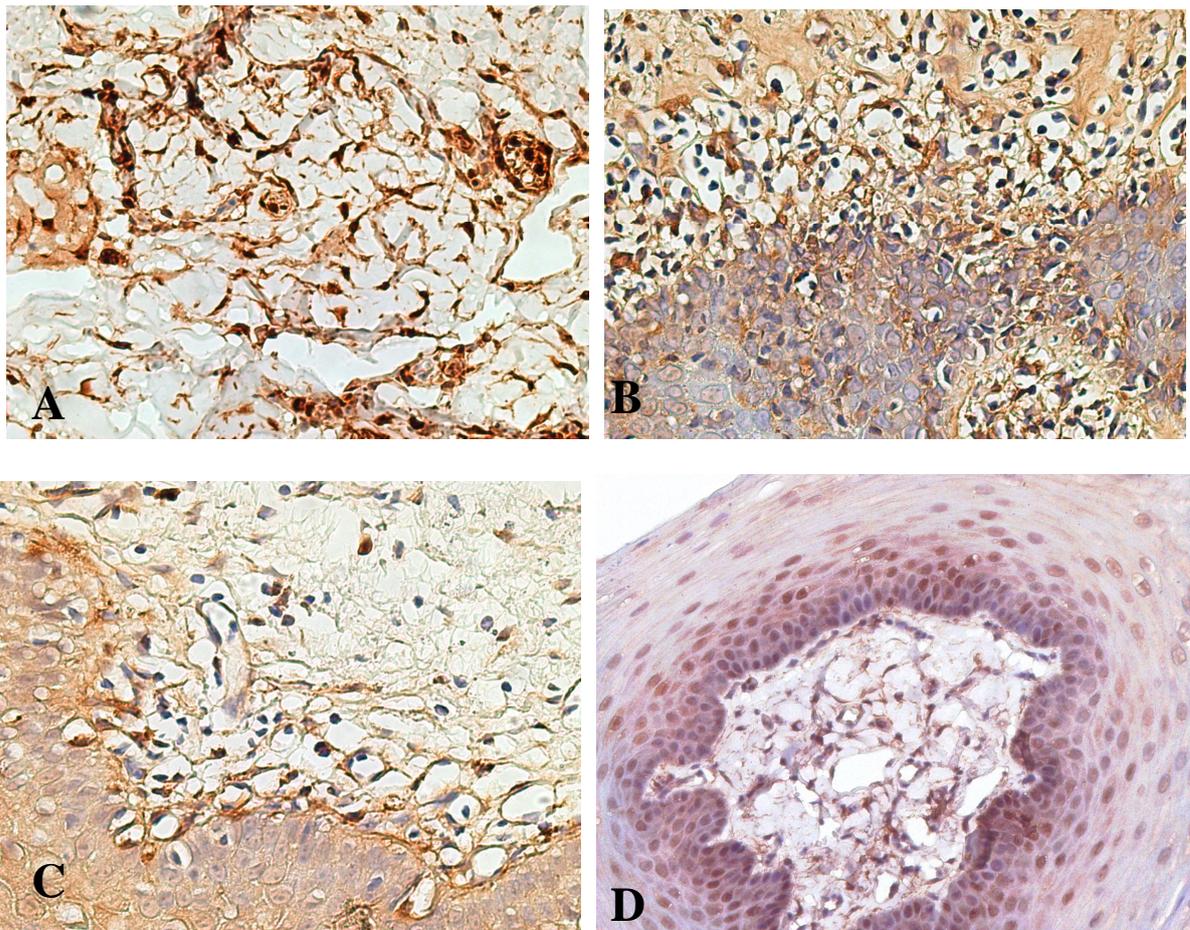
Fonte: Do Autor. 2012.

Figura 1B- Imunomarcção para Gal-1em biópsias de pacientes com CCE oral (A), Leucoplasia oral (B), Líquen plano oral (C) e Grupo controle (D)(40x). Nota-se que a imunomarcção esteve presente tanto no interior da célula como no interstício.



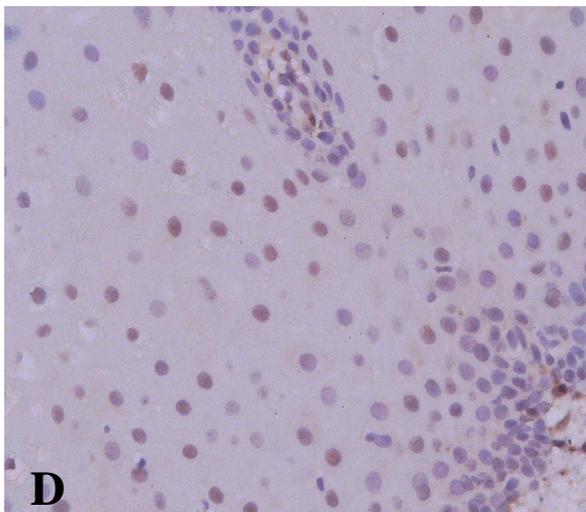
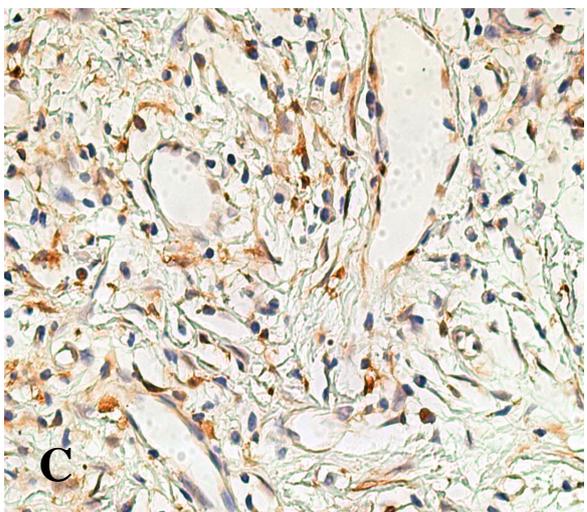
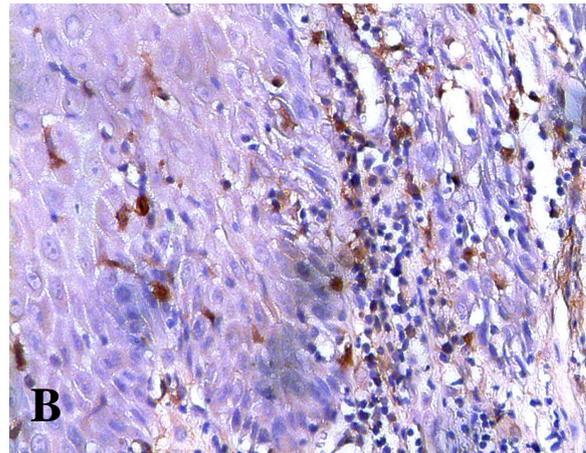
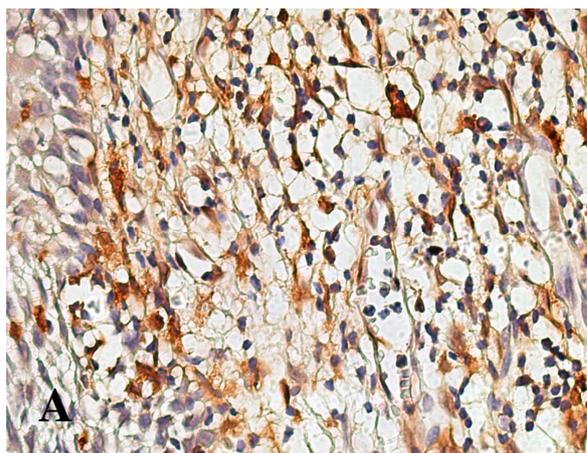
Fonte: Do Autor, 2012.

Figura 1C- Imunomarcção para Gal-3 de biópsias de pacientes com CCE oral (A), Leucoplasia oral (B), Líquen plano oral (C) e Grupo controle (D)(40x). Nota-se que a imunomarcção esteve presente tanto no interior da célula como no interstício.



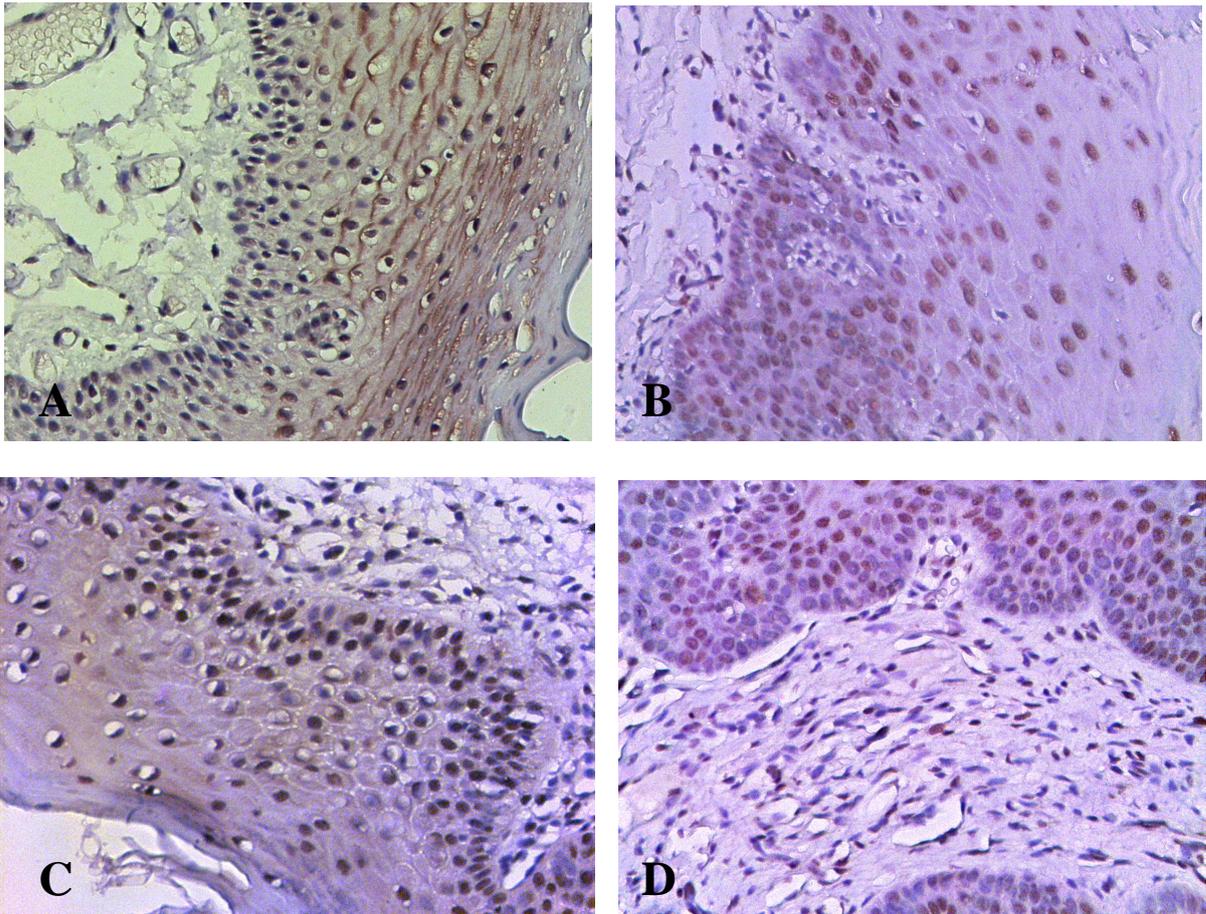
Fonte: Do Autor, 2012.

Figura 1D: Imunomarcção para Gal-9 em biópsias de pacientes com CCE oral (A), Leucoplasia oral (B), Líquen plano oral (C) e Grupo controle (D)(40x).



Fonte: Do Autor, 2012.

Figura 1E: Imunomarcação para MMP-3 de biópsias de pacientes com CCE oral (A), Leucoplasia oral (B), Líquen plano oral (C) e Gupo controle (D)(40x).



Fonte: Do Autor, 2012.

---

No presente estudo a distribuição da média da idade total dos pacientes foi de 51.08 anos ( $\pm 17,55$  anos) com idade mínima de 12 e máxima de 94. Esse resultado vai ao encontro do trabalho de outros autores cuja caracterização da amostra mostrou que a idade média encontrada foi de 42 anos ( $\pm 10,1$  anos), com idade mínima de 20 e máxima de 74 anos (ZANETTI et al., 2011). Assim acreditamos que estas lesões acometem mais pessoas do sexo masculino acima de 40 anos de idade.

No presente estudo a densidade de mastócitos foi significativamente menor nos pacientes com leucoplasia oral e CCE oral quando comparados com o grupo controle. Alguns autores acreditam que a diminuição dos mastócitos em lesões orais pré-malignas e malignas pode estar relacionada com uma falha na migração destas células para o local, e isso possivelmente poderia estar refletindo em alterações importantes no microambiente durante o início e na progressão destas lesões (OLIVEIRA-NETO et al., 2007). Entretanto, tem sido observado um aumento de mastócitos em CCE oral por outros autores, e estes acreditam que estas células podem estar aumentando a angiogênese, e o desenvolvimento do tumor (IAMAROON et al., 2003). É possível que durante o desenvolvimento tanto das DPM como nas CCE oral os mastócitos possam estar inibindo apoptose ou estar entrando em apoptose neste local, visto que alguns autores apontam que as galectinas podem inibir a ativação dos mastócitos (CHEN et al., 2004). Como encontramos um aumento no número de mastócitos no tecido normal, acreditamos que no início destas lesões estas células se dispersam do tecido de origem e por isso não encontramos um número significativo de mastócitos na progressão das lesões.

Existe uma heterogeneidade na distribuição da Gal-1, Gal-3 e Gal-9 nos diversos grupos estudados. A Gal-1, no presente estudo, foi significativamente menor nos pacientes com leucoplasia oral quando comparado com os pacientes do grupo controle e CCE oral, não havendo diferença entre os demais grupos. A Gal-1 tem sido envolvida em outras doenças não oncológicas como doenças degenerativas e modulação da resposta imune de processos inflamatórios (CAMBY et al., 2002; CHANG-HONG et al., 2005, KADOYA & HORIE 2005; CAMBY et al., 2006; RABINOVICH et al., 2007). No entanto, não tem sido encontrado descrito na literatura a expressão desta proteína relacionada com as DPMs (leucoplasia oral e líquen plano oral). A Gal-1 está envolvida no mecanismo de escape da célula tumoral frente ao sistema imune pela sua capacidade de promover a apoptose de células T ativadas. Ela ainda interage com o oncogene H-Ras, mediando a transformação tumoral, modula a adesão

---

---

entre as células tumorais e interação destas com matriz extracelular, e ainda pode atuar no processo metastático por modular as interações entre as células tumorais com as células endoteliais (RABINOVICH, 2005). De acordo com nossos resultados, embora não teve diferença significativa, a Gal-1 está aumentada no CCE oral. Acreditamos que esta molécula esteja mais associada às lesões malignas do que com as DPM.

A Gal-3 avaliada no presente estudo foi significativamente maior nos pacientes com leucoplasia oral quando comparados com os pacientes com CCE oral. No entanto, a Gal-3 nos casos de CCE oral quando comparada com os demais grupos, apesar de estar diminuída, não apresenta diferença significativa, portanto esta proteína está mais associada à leucoplasia oral do que a CCE oral. A Gal-3 pode ser encontrada em diferentes compartimentos celulares e alguns trabalhos têm demonstrado que essa proteína pode mediar várias funções, dependendo de sua localização intracelular (GONG, 1999; LIU, 2005). No presente estudo a imunomarcagem da Gal-3 foi avaliada no interior da célula, e segundo alguns autores quando esta molécula está localizada no núcleo celular ela está associada ao *splicing* de RNAm e proliferação celular (DUMIC, DABELIC, FLOGEL, 2006; SMETANA JR. et al., 2006). Algumas células tumorais podem expressar grande quantidade de Gal-3, como no caso dos tumores gástricos e hepatocarcinomas, por outro lado, em tumores de mama, cólon e pele, por exemplo, a Gal-3 está diminuída (LIU; RABINOVICH, 2005). Acredita-se que a expressão de Gal-3 esteja relacionada com diferenciação celular (FARIA et al, 2008; MOLLAOGLU, 2000; SANT'ANA, et al., 2011; DUMIC, DABELIC, FLOGEL, 2006). Em melanomas já foi demonstrado que a diminuição da expressão da Gal-3 resulta na perda da tumorigenicidade e no potencial metastático das células melanóticas (MOURAD-ZEIDAN et al., 2008). Células que apresentam mutações do gene supressor de tumor TP53 tendem a acumular Gal-3. Como esta é uma alteração tardia observada na maior parte dos tumores é possível que a expressão da Gal-3 desempenhe algum papel em estágios tardios da progressão tumoral, favorecendo a quimiorresistência e o desenvolvimento de metástases (CALIFICE et al., 2004, GRASSADONIA et al., 2004, TAKENAKA et al., 2004, VAN DEN BRULE et al., 2000). Desta forma, acreditamos que é possível que a expressão da Gal-3 desempenhe algum papel nos estágios tardios da progressão tumoral, favorecendo a quimiorresistência e o desenvolvimento de metástases.

---

---

De acordo com o grau de malignidade verificou-se no presente estudo que a Gal-3 foi significativamente menor nos pacientes com CCE oral de grau I quando comparadas com o grupo controle. Estudos sugerem que, a expressão da galectina-3 parece estar mais relacionada à diferenciação celular do que à progressão tumoral e ao prognóstico da doença (BETKA et al., 2003). Acredita-se que o aumento na expressão destas lectinas em tumores menos diferenciados, esteja vinculado a um fenótipo mais infiltrativo, portanto mais agressivo. Um estudo experimental em língua de camundongos apontou que a transformação maligna do tecido epitelial foi acompanhada da redução da expressão da Gal-3. O aumento dessas lectinas está associado com a perda da diferenciação neoplásica sugerindo uma vinculação com a agressividade tumoral (FARIA et al, 2008). Acreditamos que o aumento na expressão da Gal-3 em tumores pouco diferenciado esteja vinculado a um fenótipo mais infiltrativo, portanto mais agressivo.

A imunomarcagem para Gal-9, no presente estudo, foi significativamente maior nos pacientes com CCE oral comparado com os demais grupos. Em muitos tumores sólidos, a perda de expressão de Gal-9 está intimamente associada com a progressão de metástases. Com isso tratamento com recombinante da Gal-9 tem sido utilizado para impedir a metástases de alguns tipos de tumores (WIERSMA et al, 2011 ). Não foi descrito na literatura a expressão de Gal-9 em DPM comparadas com CCE oral. Em muitos tumores sólidos, a diminuição da expressão da Gal-9 está intimamente associada com a progressão de metástases (WIERSMA et al., 2011 ). Por outro lado, um aumento da expressão da Gal-9 foi encontrado em nevus melanótico (tumor benigno) e baixa expressão em metástases de células melanóticas. A alta expressão de Gal-9 foi inversamente associada com a progressão da lesão, onde os autores sugeriram que esse aumento em lesões primárias pode ter um melhor prognóstico (LV et al., 2012).

Além de induzir apoptose de células T efectoras, a galectina-9 pode contribuir para a regulação da inflamação através da expansão de Tregs no sangue periféricos pelas vias de ativação do TGF- inibindo o sistema imunológico de atuar frente às células tumorais (LV et al., 2012). Em nosso, foi encontrado um aumento da Gal-9 nos CCE oral e essa expressão significativa nos permitiu diferenciar CCE oral das DPM. No entanto, mais estudos devem ser realizados investigando também o papel do sistema imune frente a esta galectina.

Nos resultados do presente estudo a imunomarcagem para MMP-3 foi significativamente maior nos pacientes com líquen plano oral comparado com leucoplasia oral.

---

---

A literatura aponta um aumento na expressão de MMP3 em vários tipos de câncer, como câncer de esôfago e de mama bem como na progressão do câncer gástrico, hepatocelular e bexiga (NELSON, 2000). No entanto, uma diminuição de MMP3 foi observada em melanomas invasivos (GIROUARD et al., 2012). Níveis séricos de MMP-3 foi significativamente maior em pacientes com CCE oral comparados com pacientes saudáveis (TADBIR et.al., 2012). Não foi encontrada na literatura uma associação de MMP-3 em DPM. Acreditamos que devido a MMP-3 está associada na degradação de colágenos, ela pode ainda, estar colaborando na exacerbação da resposta imune e na lesão tecidual, como ocorre no líquen plano oral.

Diferentes mecanismos estão envolvidos na diferenciação tumoral e isso reflete na heterogeneidade de expressão das moléculas escolhidas neste estudo, especialmente quando se compara as DPM e CCE oral. Assim, conhecer como estas proteínas são expressas nas células podem colaborar no melhor entendimento das aplicabilidades terapêuticas dessas moléculas.

---

Estas moléculas têm sido relatadas expressas em um grande conjunto de células e tecidos em condições normais. Sua expressão pode também sofrer modulações com o aumento ou diminuição em várias condições de doença, tais como, doença autoimune, degenerativas, inflamações e tumores.

Este estudo não evidenciou um padrão típico de expressão dessas moléculas permitindo diferenciar CCE oral das DPM. Assim sendo:

- É A expressão aumentada de Gal-9 permitiu diferenciar CCE oral das DPM.
  - É Nossos achados apontam ainda que, as DPM de alguma forma diminuem a presença de mastócitos nestes tecidos, assim como, aumentam a expressão de MMP-3 no líquen plano oral.
  - É Este estudo aponta para um padrão heterogêneo da expressão de Gal-1, Gal-3, Gal-9 e MMP-3 entre as lesões orais aqui estudadas.
  - É Assim, conhecer como estas moléculas são expressas pode colaborar no melhor entendimento das aplicabilidades diagnósticas e terapêuticas dessas moléculas.
-

Estes resultados apontam que as propriedades biológicas destas moléculas precisam ser melhor conhecidas e sugerem que a expressão aumentada de Gal-9 pode ser útil no diagnóstico diferencial de CCE e DPM na cavidade oral.

---

---

ALVES, P. M. et al. Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. **Pathology - Research and Practice**, v.207, n.4, p.236-240, abr. 2011.

ATSUYA, N. et al. Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. **Glycobiology**, v. 18, n. 9, p. 7356744, 2008.

AZNAVOORIAN, S. et al. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer*, v.71, n.4, p.1368-1683, 1993.

BALICA, N. et al. Mast cell reaction in malignant laryngeal neoplasm. **Rom J Morphol Embryol**, n.48, p.395-401, 2007.

BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nat Rev Cancer**, v.4, n.7, p.5406-550, 2004.

BARNES et al, Eveson, JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press; 2005.

BENÍTEZ-BRIBIESCA, L., WONG, A.; UTRERA, D. Castellanos E. The Role of Mast Cell Tryptase in Neoangiogenesis of Premalignant and Malignant Lesions of the Uterine Cervix. **J Histochem Cytochem**, n.49, p.1061-1062, 2001.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2812724/>>.

Acesso em 25 abr. 2012.

BETKA, J. et al. Galectin-3, and endogenous lectin, as a tool for monitoring cell differentiation in head and neck carcinomas with implications for lectin-glycan functionality. **Acta Otolaryngol**, v.123, n.2, p. 261-3, 2003.

BI, S. et al. Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. **J Biol Chem.**, n.283, p.12248-12258, 2008.

Braeuer, R.R. et al., The Sweet and Bitter Sides of Galectins in Melanoma Progression. **Pigment Cell Melanoma Res**, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

---

---

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Secretaria de Atenção a Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Falando sobre o câncer da boca**. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

BREWSTER C. F. Binding and cross-linking properties of galectins. **Biochim Biophys Acta**, n.1572, p. 255-262, 2002.

BRUSTMANN, H. Galectin-3 and CD1a-positive dendritic cells are involved in the development of an invasive phenotype in vulvar squamous lesions. **Int J Gynecol Pathol**, v.25, n.1, p.30-37, 2006.

BUNDGAARD, T.; BENTZEN, S. M.; WILDT, J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 30B, n.5, p.323-328, 1994.

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, p.7527-7536, 2004.

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 and Experimental Neurology**, v.61, p.585-596, 2002.

\_\_\_\_\_. Galectin-1: a small protein with major functions. **Glycobiology**, v.16, p.137R-157, 2006.

CARROZZO, M. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. **J Invest Dermatol**, n.122, p.87-94, 2004.

CHANG-HONG, R. et al. Neuroprotective effect of oxidized galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Experimental Neurology**, v.194, p.203-211, 2005.

CHEN, H.Y. et al. Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.34, p.14496-501, 2009.

CH'NG S. et al. Mast cells dysregulate apoptotic and cell cycle genes in mucosal squamous cell carcinoma. **Cancer Cell International**, n.6, p.28, 2006.

---

---

\_\_\_\_\_. Mast cells and cutaneous malignancies. **Modern Pathology**, n.19, p.149-159, 2006.

COUSSENS L. M. et al.. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. **Cell**, n.103, p. 481-490, 2000.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Cancer and inflammation. **Nature**, v.420, n.6917, p.8606-867, 2002.

CURRAN S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. **Eur J Cancer**, v.36, n.13, p.1621-1630, 2000.

CVEJIC, D. et al. Galectin-3 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in papillary thyroid carcinoma. **Exp Oncol**, v.27, n.3, p.210-214, 2005.

DANGUY, A; CAMBY, I; ROBERT, K. Galectins and Cancer. **Bichimi Biophys Acta**, v.1572, p.285-293, 2002.

DUFFY M. J. et al. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Res.**, v.2, n.4, p.252-257, 2000. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/2/4/252>>. Acesso em: 05 out.2012

DUMIC, J; DABELIC, S; FLÖGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochim Biophys Acta**, v.1760, n.4, p.616-635, 2006.

EBA, H. et al. The Anti-Inflammatory Effects of Matrix Metalloproteinase-3 on Irreversible Pulpitis of Mature Erupted Teeth. **PLoS One**, v7, n.12, p. e52523, 2012.

EGEBLAD, M. Funções Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Câncer**, n.2, p.161-174, 2002.

EISENBERG, E. Oral lichen planus: a benign lesion. **J Oral Maxillofac Surg**, v.58, n.11, p. 1278-1285, 2000.

EISEN, D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study pf 723 patients. **J Am Acad Dermatol**, v.46, n.2, p.207-214, 2002.

---

---

EISEN, D. et al. Oral lichen planus: clinical features and management. **Oral Dis**, v.11, n.6, p.338-349, 2005.

ELPEK G. Ö. et al. The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. **J Clin Pathol**, n.54. p.940-94, 2001.

ELOLA M. T. et al. Galectina: matricellular glicana proteínas de ligação que ligam a adesão celular, migração e sobrevivência. **Mol Cell Vida Sci**, n.64, p.1679 ó 1700, 2007.

FARIA, Paulo Rogério de et al. Study of the galectin-3 expression in tongue carcinomas of mice. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.44, n.3, jun., 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442008000300011](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442008000300011)>. Disponível em: 14 jan. 2012.

FOX, S. B.; GENERALI, D. G.; HARRIS, A. L. Breast tumour angiogenesis. **Breast Cancer Res**, v.9, n.216, 2007.

FREITAS, V. S. et al. Mast Cells and Matrix metalloproteinase 9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.112, n.3, p.342-348, 2011

GABRIEL, J. G. et al. General considerations and clinical approach of oral leukoplakia. **Rev Bras Patol Oral**, v.3, n.4, p.187-194, 2004.

GIROUARD S. D. et al. SOX2 contributes to melanoma cell invasion. **Lab Invest**, v.92, n.3, p.362-370, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21793015>>. Acesso em 03 dez. 2011.

GONG, H. C. et al. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. **Cancer Res.**, v.59, n.24, p.6239-6245, 1999.

GRASSADONIA, A. et al. 90 K (Mac- 2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis. **Glyconconj J**, v.19, n.7-9, p.551-556, 2004

HUGHES R. C. Galectins. Encyclopedia of Biological Chemistry. **Elsevier**, v.2, p.171-174, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000137&pid=S0101-9880200900010000100019&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000137&pid=S0101-9880200900010000100019&lng=en)>. Acesso em 30 mar. 2012.

---

---

IAMAROON A. et al. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, n.32, p.195-19, 2003.

IMTIAZ, M. T. et al. Inhibition of matrix metalloproteinases protects mice from ascending infection and chronic disease manifestations resulting from urogenital Chlamydia muridarum infection. **Infect Immun**, n.74, p.5513-5521, 2006.

IRIE A. et al. Galectin-9 as a prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. **Clin Cancer Res**, n.11, p.296262968, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em 13 de abr. 2012.

JUNANKAR S. R. et al. Analysis of immune cell infiltrates during squamous carcinoma development. **J Invest Dermatol Symp Proc**, n11, p.36-43, 2006.

KADOYA, T; HORIE, H. Structural and functional studies of galectin-1: a novel axonal regeneration-promoting activity for oxidized galectin-1. **CurrentDrugsTargets**, v.4, p.375-383, 2005.

KANEKO, M. K. et al. Functional glycosylation of human podoplanin: glycan structure of platelet aggregation-inducing factor. **Cross Ref MedlineWeb of Scienc FBS Lett**, n.581, p.331-336, 2007

KAGESHITA, T. et al. Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. **Int J Câncer**, v.99, n.3, p.8096816, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em 13 abr. 2012.

KÄHÄRI, V. M.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in skin. **Exp Dermatol**, n.6, p.199-213, 1997.

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, p.681-690, 2007.

LIANG, M.; UENO, M.; OOMIZU, S. Galectin-9 expression links to malignant potential of cervical squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, n.134, p.8996907, 2008.

LIU, F. T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer**, v.5, n.5, p.29-41, 2005.

---

---

LOURENÇO et al. Histological Classifications of Oral Squamous Cell Carcinoma: a Review of the Proposed Systems **Revista Brasileira de Cancerologia** 2007; 53(3): 325-333. disponível em: [http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_53/v03/pdf/revisao3.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao3.pdf)

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral su Oral med Oral Pathol**, v.79, n.3, p.321-329, 1995.

LV, K. et al. Galectin-9 promotes TGF- $\beta$ 1-dependent induction of regulatory T cells via the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. **Mol Med Report**, 12 out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064791>>. Acesso em: 25 set. 2012.

MIGNOGNA M. D. et al. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence? **Oral Oncol**, v.40, n.2, p. 120-130, 2004.

MOLLAOGLU, N. Oral lichen planus: a review. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.38, n.4, p. 370-377, 2000.

MOURAD-ZEIDAN, A. A. et al. Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry. **Am J Pathol**, v.173, n.6, p.1839-1852, nov.2006.

NAPIER, S. S.; SPEIGHT, P. M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. **J Oral Pathol Méd.**, v.37, p.1-10, 2008.

NELSON A. R. et al. Metaloproteinases da matriz: Atividade biológica e implicações clínicas. **J Clin Oncol**, n.18, p.1135-1149, 2000.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral & Maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2.ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2004.

NOBUMOTO, A. et al. Galectin-9 suppresses tumor metastasis by blocking adhesion to endothelium and extracellular matrices. **Oxford Journals -Life Sciences & Medicine - Glycobiology**. V.18, n.9, p.135-744, 2008.

---

---

OKUDAIRA, T.; HIRASHIMA, M.; ISHIKAWA, C. A modified version of galectin-9 suppresses cell growth and induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines. **Int J Câncer**, n.120, p.2251-2261, 2007.

OLIVEIRA-NETO, H. H. et al. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. **Oral Oncol**, n.43, p.484-490, 2007.

PERILLO, N. L.; PACE, K. E.; SEILHAMER, J. J. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, n.378, p.736-739, 1995.

PINHEIRO, G. C. D. et al. **Prevenção do câncer bucal**. Bragança Paulista, SP : Encadernadora Pietro, 1998.

PLZÁK, J. et al. Galectin-3 -an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. **Eur J Cancer**, v.40, n.15, p.2324-2330, 2004.

RABINOVICH, G. A. et al. Anemerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.66, p.143-158, 2007.

\_\_\_\_\_. Galectin-1 as a potential cancer target. **Br J Cancer**, v.92, p.1188-1192, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2361964/>>. Acesso em: 13 out. 2012.

RAGINI, D. S. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors: correlation with invasion and metastasis in oral cancer. **Indian J Clin Biochem**, V. 25, N.3, P. 250-259, 2010.

RANIERI, G. et al. Microvessel density, mast cell density and thymidine phosphorylase expression in oral squamous carcinoma. **Int J Oncol**. n.21, p.1317-1323, 2002.

RÖDSTRÖM, P. O. et al. Cancer and oral lichen planus in a Swedish population. **Oral Oncol**, v.40, n.2, p.131-18, 2004.

RUBINSTEIN, N. et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege. **Cancer Cell**, v.5, n.3, p. 241-251, 2004.

---

---

RUNDHAUG J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **J Cell Mol Med.**, v.9, n.2, p. 267-285, 2005.

SAMPAIO S. P. A.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

SANT'ANA, J. M. A. de et al. alectin-3 and beta-catenin expression in premalignant and carcinomatous lesions in tongue of mice. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.47, n.1, fev. 2011.

SAWATSUBASHI, M. et al. Association of vascular endothelial growth factor and mast cells with angiogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Virchows Arch**, n.436, p.243-248, 2000.

SEKI, M. K. S. et al. Beneficial effect of galectin 9 on rheumatoid arthritis by induction of apoptosis of synovial fibroblasts. **Arthr Rheumat**, n.56, p. 968-3976, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em: 14 out. 2012.

SELLERS, A.; MURPHY, G. Collagenolytic enzymes and their naturally occurring inhibitors. **Int Rev Connect Tissue Res**, n.9, p.151-190, 1981.

SHARMA, B. et al. Immunohistochemical evaluation of mast cells and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Indian J Dent Res**, v.21, n.2, p.260-265, 2010.

SILVERMAN JR, S.; GORSKY, M.; KAUGARS, G. E. Leukoplakia, dysplasia, and malignant transformation, Guest editorial. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.82, n.2, p.117, 1996.

SMETANA JR., K. et al. Nuclear presence of adhesion-/growth-regulatory galectins in normal/malignant cells of squamous epithelial origin. **Histochem Cell Biol**, v.125, n.1, p. 171-182, 2006.

STERNLICHT, M. D.; BISSELL, M. J.; WERB, Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. **Oncogene**, v.19, p.1102-1113, 2000.

STERNLICHT M. D.; LOCHTER, A.; SYMPSON, C. J. O MMP3/stromelysin-1 proteinase estromal promove carcinogênese mamária. **Cell**, n.98, p.137-146, 1999.

---

---

SUGERMAN, P. B. et al. Oral lichen planus. **Clin Dermatol**, n.18, p.533-539, 2000.

SUZUKI, O. et al. Abe, Cell surface N-glycosylation and sialylation regulate galectin-3-induced apoptosis in human diffuse large B cell lymphoma. **Oncol Rep**, v.19, n.3, p.743-748, 2008.

SYDNEY, C. et al. Mast cells dysregulate apoptotic and cell cycle genes in mucosal squamous cell carcinoma. **Cancer Cell Int**. v.6, n.28, 2006.

SYRJANEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **J Clin Virol**, v.32, Suppl.1, p.59-66, 2005.

TAKENAKA, Y. et al. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. **Mol Cell Biol**, v.24, p.4395-4406, 2004.

TEYMOORTASH, A. et al. Expression of galectin-3 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck and its relationship with distant metastasis. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.132, n.1, p. 51-56, 2006.

THORNHILL, M. H. Immune mechanisms in oral lichen planus. **Acta Odontol Scand**, n.59, p.174-177, 2001.

UZZAN, B. et al. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. **Cancer Res**, v.64, p.2941-2955, 2004.

VAN DEN BRULE, F. A. et al. Alternation of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. **Int J Cancer**, v.89, n.4, p.361-367, 2000.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol**, v.45, n.4-5, p. 317-323, 2009.

VISSE R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ Res.**, v.92, n.8, p.827-839, 2003. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/content/92/8/827.full>>. Acesso em: 20 out. 2012.

---

---

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med.** v.36, n.10, p.575-580, 2007.

WIENER, Z. et al. TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells. **J Invest Dermatol**, n.27, p.906-914, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em 20 abr. 2012.

WIERSMA, V. R. Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease. **Med Res Rev.**, jul./2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21793015>>. Acesso em: 21 abr. 2012.

YAMAUCHI, A.; KONTANI, K.; KIHARA, M. Galectin-9, a novel prognostic factor with antimetastatic potential in breast cancer. **Breast J**, n.12, p.1966200, 2006.

YU-MEI, D. et al. Increased expression of galectin-1 is associated with human oral squamous cell carcinoma development. **Oncology Reports**, n.21, p.983-987, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287997>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

ZANETTI, F. et al. Conhecimento e fatores de risco do câncer de boca em um programa de prevenção para motoristas de caminhão. **CRO-PE**. Disponível em: <<http://www.cro-pe.org.br/revista/v10n3/6.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2012.

---