KÍVIA LINHARES FERRAZZO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA
GALECTINA-3 ASSOCIADA À β -CATENINA E CICLINA D1 EM
CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO E ADENOCARCINOMA
POLIMORFO DE BAIXO GRAU DE MALIGNIDADE DE GLÂNDULAS
SALIVARES**

São Paulo
2008

Kívia Linhares Ferrazzo

**Estudo da expressão imunoistoquímica da proteína galectina-3
associada à β -catenina e ciclina D1 em carcinoma adenóide cístico
e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de
glândulas salivares**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

São Paulo
2008

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ferrazzo, Kívia Linhares

Estudo da expressão imunoistoquímica da proteína galectina-3 associada à β -catenina e ciclina D1 em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares / Kívia Linhares Ferrazzo; orientador Suzana Cantanhede Orsini Machado de Souza. -- São Paulo, 2008.

86p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Adenocarcinoma – Marcação imunoistoquímica nuclear 2. Patologia Bucal

CDD 617.63
BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ferrazzo KL. Estudo da expressão imunoistoquímica da proteína galectina-3 associada à β -catenina e ciclina D1 em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, ____ / ____ / 2008

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Vilmar,

Essa conquista é fruto do seu apoio e incentivo constantes. Obrigada pelo amor e pela amizade.

À minha filha Bruna,

Sei que muitas vezes estive ausente e sinto muito por isso... Por não ter tido mais tempo para brincar com você, assistir a seus filmes prediletos, jogar conversa fora, enfim, ser uma mãe mais presente. Agradeço a você pela compreensão e, apesar de tão jovem, pela sua grande responsabilidade.

Ao meu pai Linhares e irmãos Morgana, Ronaldo e Ricardo, aos meus primos Daisy, Joaquim e Fernando e aos meus Amigos...

Alguns de vocês estiveram mais próximos, outros mais distantes, mas sei que todos torceram por mim e estão felizes por essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao **Senhor Deus** por estar sempre comigo em todos os momentos e por ter me ajudado a chegar até aqui.

À Professora Dra. **Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa**, Professora Titular da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP e minha orientadora, agradeço pelos conhecimentos transmitidos desde o mestrado, pela disponibilidade para orientação e pela oportunidade de desenvolver este e outros trabalhos que me permitiram crescer profissionalmente e ingressar na carreira acadêmica.

Ao Professor Dr. **Décio dos Santos Pinto Jr.**, Professor da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, pela ajuda e sugestões na elaboração do projeto de pesquisa que deu origem a este trabalho, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos transmitidos.

À Professora Titular Dra. **Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães** e aos demais Professores da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, Dra. **Andrea Mantesso**, Dr. **Fábio Daumas Nunes**, Dra. **Karem Ortega** e Dra. **Marília Trierveiler Martins** pelo alegre e agradável convívio, pela disponibilidade e ensinamentos transmitidos a todos nós alunos da pós-graduação.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Geral da FOU SP, Dr. **Fernando Augusto Soares**, Dra. **Luciana Corrêa** e Dr. **Moacir Domingos Novelli** que

sempre foram muito solícitos todas as vezes que precisei de ajuda. Os conhecimentos que adquiri com vocês foram fundamentais.

Ao Professor Dr. **Marcos Martins Neto**, chefe do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria, pela compreensão e apoio para que eu pudesse concluir o Doutorado.

Às amigas **Marina de Deus Moura** e **Yonara Freire** pela amizade e pela confiança que pude depositar em vocês desde o mestrado.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal com quem tive o prazer de conviver **Flávia Caló, Serginho, Paulo Braz, Renata Acay, Fernanda Yamamoto, Brunno, Aluana, Thaís, Fábio Coracin, Camila, Helder, Sérgio Cury, Flávia Pontes, Patrícia Adachi, Tessa, Roberto, Alexandra, Alexandre, Juliana, Paulo Sérgio, Luciana Marocchio e Vanessa Remualdo**. A amizade, troca de experiências e informações foram de grande importância durante todo o curso.

À **Elisa Santos** não só pelo imprescindível auxílio técnico no Laboratório de Imunoistoquímica e de Patologia Cirúrgica, mas também pela amizade e pelos bons momentos.

Às funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal **Bia, Nair, Néia e Zilda** pela atenção, gentileza e colaboração sempre presentes.

Às bibliotecárias **Cláudia, Glauci e Vânia** pela valiosa ajuda na formatação deste trabalho.

Ferrazzo KL. Estudo da expressão imunoistoquímica da proteína galectina-3 associada à β -catenina e ciclina D1 em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

Neoplasias malignas das glândulas salivares são lesões raras e o mecanismo pelo qual esses tumores progridem ainda não está completamente esclarecido na literatura. A galectina-3 é uma proteína multifuncional expressa em uma grande quantidade de tecidos normais, mas que também tem sido associada à progressão tumoral de neoplasias malignas da tireóide, próstata e neoplasias gástricas. Estudos prévios demonstraram que a galectina-3 está também expressa em algumas neoplasias malignas das glândulas salivares como carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade. Recentemente foi sugerido que a superexpressão da galectina-3 controla alterações nos níveis de expressão de alguns reguladores do ciclo celular, dentre eles a ciclina D1. Além disso, outros estudos revelaram que a ciclina D1 é ativada pela β -catenina de uma maneira dependente da galectina-3. O objetivo desse trabalho foi comparar a marcação imunoistoquímica nuclear e / ou citoplasmática da galectina-3 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau tentando relacioná-la à marcação da β -catenina e ciclina D1. Foram realizadas reações de imunoistoquímica para as três proteínas em 15 casos de carcinoma adenóide cístico e em 15 casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau utilizando-se material parafinado. Para a galectina-3 os carcinomas adenóides císticos apresentaram marcação

imunoistoquímica apenas nas células luminais, predominantemente no núcleo. Todos os casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau revelaram uma marcação predominantemente citoplasmática para essa proteína. Ambos os tumores exibiram intensa marcação citoplasmática e/ou nuclear para a β -catenina na maioria dos casos. Não houve imunorreatividade para a ciclina D1 em 14/15 casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau. Em contraste, os carcinomas adenóides císticos revelaram marcação nuclear específica para a ciclina D1 em 10 de 15 casos estudados em mais de 5% das células neoplásicas e essa marcação estava associada à marcação citoplasmática e nuclear da galectina-3 ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem que nos carcinomas adenóides císticos a expressão da galectina-3 pode exercer uma função de proliferação celular e parece estar relacionada à diferenciação celular no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau. Além disso, a perda de expressão da galectina-3 no carcinoma adenóide cístico pode estar associada a um comportamento clínico mais agressivo dessa lesão. Embora a β -catenina pareça exercer algum papel no mecanismo de carcinogênese dessas duas lesões, ela não parece se ligar à galectina-3 para ativar a ciclina D1.

Palavras-Chave: Galectina-3 – Ciclina D1 – β -catenina – Carcinoma adenóide cístico – Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Ferrazzo KL. Differential expression of galectin-3, β -catenin and cyclin D1 in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma of salivary glands [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Salivary gland tumors are uncommon and the mechanism by which malignant tumors progresses is still undefined. In a previous study it was shown that galectin-3 is expressed in malignant salivary gland neoplasms as adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. Galectin-3 is a multifunctional protein of a group of galactoside-binding lectins expressed in a variety of normal cells, but also has been implicated in tumor progression of some malignancies as thyroid, prostate and gastric cancers. Recently, it has been suggested that galectin-3 may be an important mediator of the β -catenin/Wnt pathway. Moreover, nuclear galectin-3 expression has been implicated in cell proliferation, promoting cyclin D1 activation. Thus, in the present study we aimed to correlate galectin-3 expression, either nuclear or cytoplasmic, with the expression of β -catenin (nuclear/cytoplasmic) and cyclin D1 (nuclear) in 15 cases of adenoid cystic carcinoma and in 15 cases of polymorphous low-grade adenocarcinoma. For galectin-3, adenoid cystic carcinomas showed specific staining only in luminal cells, mainly in the nuclei. In the cases of polymorphous low-grade adenocarcinoma, all tumor cells revealed a positive, mostly cytoplasmic, reaction to galectin-3. Both tumors showed intense cytoplasmic/nuclear staining for β -catenin in the majority of cases. Cyclin D1 immunoreactivity was not detected in 14 of the 15 polymorphous low-grade adenocarcinomas studied. In contrast, adenoid cystic carcinomas showed specific nuclear staining for cyclin D1 in

10 of 15 cases studied in more than 5% of the neoplastic cells. Cyclin D1 expression was correlated with cytoplasmic and nuclear galectin-3 expression in adenoid cystic carcinomas ($p < 0,05$). These results suggest that in adenoid cystic carcinoma galectin-3 may play a role in cellular proliferation through cyclin D1 activation. In polymorphous low-grade adenocarcinoma gal-3 expression seems to be associated with cellular differentiation. In addition, loss of cytoplasmic expression of galectin-3 in adenoid cystic carcinomas may be related to a more aggressive behavior of these lesions. Although β -catenin seems to play a role in carcinogenesis, in both lesions, it seems that it does not bind to galectin-3 for cyclin D1 stimulation.

Keywords: Galectin-3 - Cyclin D1 - β -catenin - Adenoid cystic carcinoma - Polymorphous low-grade adenocarcinoma

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1- Carcinoma adenóide cístico, subtipo sólido.....	52
Figura 5.2- Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	53
Figura 5.3- Comparação dos aspectos histopatológicos e imunoistoquí- micos entre as duas neoplasias estudadas.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Dados referentes à marcação imunoistoquímica da proteína galectina-3 nos carcinomas adenóides císticos e nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade.....	50
Tabela 5.2 - Dados referentes à marcação imunoistoquímica das proteínas β -catenina e ciclina D1 nos carcinomas adenóides císticos e nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade.....	51
Tabela 5.3 - Análise estatística da expressão da galectina-3 no carcinoma adenóide cístico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	56
Tabela 5.4 - Marcação imunoistoquímica da galectina-3 entre os subtipos do carcinoma adenóide cístico.....	58
Tabela 5.5 - Análise estatística da β -catenina e ciclina D1 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	59
Tabela 5.6 - Relação da galectina-3 e da β -catenina em membrana no carcinoma adenóide cístico.....	62
Tabela 5.7 - Relação da galectina-3 e da β -catenina em membrana no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	62
Tabela 5.8 - Relação da galectina-3 e da β -catenina em núcleo e/ou citoplasma no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	63
Tabela 5.9 - Relação da galectina-3 e da ciclina D1 no carcinoma Adenóide cístico.....	64
Tabela 5.10 - Relação da galectina-3 e da ciclina D1 no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	64
Tabela 5.11 - Associação da β -catenina em membrana e da Ciclina D1 no carcinoma adenóide cístico.....	66
Tabela 5.12 - Associação da β -catenina no núcleo/citoplasma e da	

Ciclina D1 no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	66
Tabela 5.13 - Associação da β -catenina na membrana e da Ciclina D1 no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	66
Tabela 5.14 - Teste de associação da perda de expressão em membrana da β -catenina e da marcação imunoistoquímica da ciclina D1 nos subtipos histológicos do carcinoma adenóide cístico.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Análise estatística da expressão da galectina-3 no carcinoma adenóide cístico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	57
Gráfico 5.2 - Marcação da β -catenina em núcleo/citoplasma no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	60
Gráfico 5.3 - Marcação da β -catenina em membrana no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	60
Gráfico 5.4 - Marcação da ciclina D1 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	61
Gráfico 5.5 - Comparação da marcação nuclear e citoplasmática da galectina-3 com a marcação da ciclina D1 no carcinoma adenóide cístico.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

9C4	clone do anticorpo contra a galectina-3
APBG	adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade
Bcl-2	proteína supressora da apoptose
CA	Califórnia
CAC	carcinoma adenóide cístico
C-kit	protooncogene
Co	“company”
DAB	diaminobenzidina
EDTA	“Ethylenediamine-Tetraacetic Acid”
Et al	e colaboradores
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
kDa	“kilodaltons”
mM	milimolar
MO	“Missouri”
NJ	“New Jersey”
PCR	do inglês “Polymerase Chain Reaction”
pH	potencial hidrogeniônico
RDI	“Research Diagnostics Inc”
Ser-6	aminoácido serina resíduo 6
SP	São Paulo
TBST	“Tris-Buffered Saline Tween-20”
TRIS	“Tris-Hydroximetil-Aminometano”

USA	“United States of América”
Wnt	Via de sinalização do “Wingless”

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°C	graus Celsius
β	beta – segunda letra do alfabeto grego
γ	gama – terceira letra do alfabeto grego
μm	micrômetro
x	vezes

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Carcinoma adenóide cístico.....	20
2.2 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	24
2.3 Galectina3.....	27
2.4 β -Catenina.....	32
2.5 Ciclo celular e Ciclina D1.....	35
3 PROPOSIÇÃO.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Casuística e análise morfológica.....	40
4.2 Técnica imunoistoquímica.....	41
4.3 Análise dos resultados.....	43
4.4 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Aspectos histológicos do carcinoma adenóide cístico e do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	46
5.2 Expressão imunoistoquímica da proteína galectina-3.....	47
5.3 Expressão imunoistoquímica da proteína β -catenina.....	48
5.4 Expressão imunoistoquímica da proteína ciclina D1.....	49
5.5 Análise estatística.....	55
6 DISCUSSÃO.....	68
7 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO.....	86

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas das glândulas salivares são lesões raras e os mecanismos de progressão tumoral nessas lesões ainda não estão bem definidos na literatura.

Dentre todas as neoplasias malignas que afetam as glândulas salivares, o carcinoma adenóide cístico está entre as duas mais freqüentes e merece atenção distinta em função de seu aspecto microscópico, curso clínico e prognóstico. Na maioria das vezes a lesão se origina a partir das glândulas salivares menores. Os pacientes mais acometidos pela doença encontram-se entre a quinta e a sétima décadas da vida e não há uma predileção significativa por sexo. Essa lesão é caracterizada por um crescimento lento, porém, apresenta grande potencial de invasão dos tecidos adjacentes, além de uma grande propensão a recidivar e fazer metástases.

Outro tumor maligno que está entre os que mais freqüentemente acometem as glândulas salivares é o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau. Essa neoplasia ocorre quase que exclusivamente em glândulas salivares menores, é caracterizada por um crescimento lento e raramente está associada a metástases. O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau apresenta aspectos histológicos semelhantes ao carcinoma adenóide cístico e isso muitas vezes pode dificultar o diagnóstico. Embora essas duas neoplasias apresentem semelhanças nos padrões histológicos, é imprescindível que se faça um correto diagnóstico, pois o comportamento clínico, tratamento e prognóstico são completamente diferentes.

Recentemente Ferrazzo et al. (2007) demonstraram que essas duas neoplasias expressam a proteína galectina-3 de formas distintas. A galectina-3, um dos membros mais estudados da família das galectinas, apesar de ser expressa em uma variedade de células normais, tem sido associada à progressão tumoral, resistência à apoptose e metástase em várias neoplasias. Entretanto, os mecanismos moleculares que regulam estas funções ainda não estão bem esclarecidos na literatura.

Lin et al. (2002) demonstraram que a superexpressão da galectina-3 controla alterações nos níveis de expressão de alguns reguladores do ciclo celular, dentre eles a ciclina D1. Além disso, Shimura et al. (2004) relataram que a ciclina D1 é ativada pela β -catenina de uma maneira dependente da galectina-3.

Neste trabalho nos propusemos a comparar a marcação imunoistoquímica nuclear e / ou citoplasmática da proteína galectina-3 no carcinoma adenóide cístico com seus subtipos histológicos e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, tentando relacioná-la à marcação imunoistoquímica das proteínas β -catenina e ciclina D1.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma adenóide cístico

O carcinoma adenóide cístico é considerado uma das neoplasias mais freqüentes dentre todas as neoplasias malignas que acometem as glândulas salivares (BOKO et al., 2004; COPELLI et al., 2008; HYAM; VENESS; MORGAN, 2004; PIRES et al., 2007). Este tumor pode ocorrer em qualquer glândula salivar, não havendo muita concordância na literatura quanto à sua localização preferencial. Alguns estudos têm demonstrado que o carcinoma adenóide cístico tem uma predileção pelas glândulas salivares menores e pela glândula submandibular, sendo raramente encontrado na glândula parótida (KOLUDE; LAWOYIN; AKANG, 2001; QURESHI et al., 2005). Outros autores apontam as glândulas salivares maiores como sendo a localização mais freqüente para essa neoplasia (HADDAD et al., 1995; KHAN et al., 2001). Entretanto, quando esses tumores acometem as glândulas salivares menores não há dúvida na literatura de que o local de maior ocorrência é o palato, embora esse tumor possa ser encontrado também na mucosa bucal, lábio e assoalho bucal (BUCHNER; MERRELL; CARPENTER, 2007; PIRES et al., 2007).

A faixa etária mais comumente atingida por essa neoplasia maligna está entre a quinta e sexta décadas da vida (BUCHNER; MERRELL; CARPENTER, 2007; GARDEN et al., 1995; HADDAD et al., 1995; KHAN et al., 2001; PIRES et al., 2007) e há uma discreta predileção pelo sexo feminino (BUCHNER; MERRELL;

CARPENTER, 2007; CHUMMUN et al., 2001; RAUX-RAKOTOMALALA et al., 2003; PIRES et al., 2007).

Clinicamente o carcinoma adenóide cístico geralmente se apresenta como uma massa de crescimento lento e persistente, cujos sinais e sintomas clínicos dependem, dentre outros fatores, da sua extensão e localização anatômica. Na região das glândulas salivares maiores, essa lesão se apresenta clinicamente como um aumento de volume nas regiões pré-auricular ou submandibular. O modo de expansão do carcinoma adenóide cístico é característico. Esse tumor apresenta uma propensão à invasão perineural que é responsável pela queixa de dor e desconforto em aproximadamente 50% dos pacientes (ELLIS; AUCLAIR, 1996).

Há uma tendência do carcinoma adenóide cístico de invadir o osso adjacente e se espalhar pela base do crânio, e isso é considerado a maior causa de morte nesses tumores. Metástases tardias e recorrências locais também são freqüentes (GARDEN et al., 1995; SPIERS et al., 1996), embora alguns estudos demonstrem que essa lesão tem um potencial para desenvolver metástases à distância em fases bem precoces do desenvolvimento do tumor, independente de recorrências locais (RAPIDIS et al., 2005; YASUMATSU et al., 2004).

Morfologicamente, o carcinoma adenóide cístico exhibe três subtipos histológicos: cribriforme, tubular e sólido (YAMAMOTO et al., 1998). Entretanto, as células tumorais que compõem essa neoplasia são principalmente de dois tipos: células luminais e células mioepiteliais (BARNES et al., 2005; FURUSE et al., 2005).

O padrão cribriforme exhibe ninhos de células epiteliais dispostas concêntricamente formando diversos espaços cilíndricos dando um aspecto de “queijo suíço” à lesão. Estes espaços são na maioria pseudocistos que apresentam no seu interior proteoglicanas e material semelhante à membrana basal. As células

que envolvem esses pseudocistos são células mioepiteliais de núcleo basofílico ovóide e citoplasma escasso. Os espaços ductais são preenchidos por material mucinoso eosinofílico e cercados por células cuboidais apresentando citoplasma mais volumoso e eosinofílico. Dificilmente são encontradas figuras de mitose (BARNES et al., 2005; FIGUEIREDO; SOUSA; ARAÚJO, 1997).

O subtipo histológico tubular apresenta células cuboidais de citoplasma eosinofílico e escasso, arrançadas em estruturas ductiformes de duas camadas de células envoltas por um estroma hialino. As células que circundam internamente esses espaços tubulares são do tipo epitelial luminal, que por sua vez são cercadas por uma camada periférica de células mioepiteliais (BARNES et al., 2005; FIGUEIREDO; SOUSA; ARAÚJO, 1997).

No padrão sólido as células tumorais formam lençóis ou ninhos de tamanhos ou formatos variados, onde se abrem às vezes estruturas ductiformes. As células neoplásicas apresentam geralmente morfologia cuboidal, núcleos ovais e hipercromáticos, com citoplasma claro e escasso (BARNES et al., 2005; FIGUEIREDO; SOUSA; ARAÚJO, 1997). Um pior prognóstico tem sido associado a esse subtipo histológico (KHAN et al., 2001).

Muitas vezes observa-se a presença simultânea de mais de um subtipo histológico em um único tumor. Nesses casos a classificação deve ser feita levando-se em consideração o padrão predominante (ELLIS; AUCLAIR, 1996; TOMICH, 1991).

Com relação ao prognóstico da doença, alguns autores relatam que os tumores localizados em glândulas salivares menores da cavidade bucal, nasal e seios paranasais têm uma evolução pior quando comparados àqueles das glândulas salivares maiores (KHAN et al., 2001). Outro parâmetro utilizado para tentar

determinar o prognóstico do carcinoma adenóide cístico é o padrão morfológico, onde se acredita que o subtipo sólido é o mais agressivo e está relacionado a um pior prognóstico da doença, seguido pelos padrões cribriforme e tubular (YAMAMOTO et al., 1998). Ainda com base no aspecto morfológico, a presença de invasão perineural tem sido considerada como um possível fator de prognóstico desfavorável para essa doença (GARDEN et al., 1995).

Copelli et al. (2008) avaliaram e trataram 43 pacientes com neoplasias malignas de glândulas salivares menores. Desses, 26 eram casos de carcinoma adenóide cístico que se dividiam em 13 do tipo sólido (50%), 7 do tipo cribriforme (26,9%) e 6 carcinomas adenóides císticos tubulares (23,1%). Segundo os autores, dentre todos os 43 pacientes que foram tratados, 11 pacientes apresentaram metástases à distância e dentre esses, 10 pacientes, 90,9% haviam sido tratados para o carcinoma adenóide cístico, sendo que a maioria deles (70%) apresentava carcinoma adenóide cístico do subtipo sólido. Os autores relataram ainda que a invasão perineural foi um achado freqüente nos carcinomas adenóides císticos (65,4% dos casos) e associaram a invasão perineural a uma pior sobrevida dos pacientes e pior controle da doença.

Muitos estudos têm sido feitos no sentido de se tentar identificar proteínas que possam ser utilizadas como marcadores imunoistoquímicos e assim tentar esclarecer a origem e os mecanismos de progressão tumoral nessas lesões.

2.2 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade ocorre quase que exclusivamente nas glândulas salivares menores, sendo descrito por alguns autores como o segundo tipo mais comum de tumor que acomete as glândulas salivares (BUCHNER; MERRELL; CARPENTER, 2007; FREEDMAN; LUMERMAN, 1983). Aproximadamente 60% dos casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau envolvem o palato duro, mas a lesão pode ocorrer também em outras localizações, como região retromolar, lábio superior, base da língua, glândulas salivares maiores, nasofaringe e cavidade nasal, embora com uma menor frequência (BUCHNER; MERRELL; CARPENTER, 2007; GNEPP; CHEN; WARREN, 1988; PIRES et al., 2007; WALDRON; EL-MOFTY; GNEPP, 1988). Há uma maior prevalência desse tumor em pacientes do sexo feminino em uma proporção de 2:1, na faixa etária que oscila entre a quinta e a sétima décadas da vida (BUCHNER; MERRELL; CARPENTER, 2007; EVANS; LUNA, 2000; PIRES et al., 2007).

Essa neoplasia apresenta crescimento lento e indolente além de uma variação morfológica observada histologicamente. O nome descritivo dessa patologia reflete essas características. As células que constituem o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade são de um único tipo, mas se apresentam dispostas em diversos arranjos histológicos, conferindo a esse tumor a variedade de configurações morfológicas que pode haver de um tumor para outro, ou mesmo dentro de um mesmo tumor. Os principais padrões histológicos que podem ser encontrados são: lobular ou sólido, papilar, cribriforme (lembrando o carcinoma adenóide cístico), trabecular e tubular. Este último com estruturas ductiformes

circundadas por uma única camada de células. Essas células tumorais são palidamente coradas, apresentam núcleos ovóides e às vezes nucléolos, e o tamanho varia de pequenas a médias. A presença de mitoses é incomum e necrose não é um achado típico. A invasão perineural também é um achado freqüente nessas lesões (BARNES et al., 2005).

Em 1999 Araújo et al. realizaram um estudo morfológico e imunoistoquímico de 30 casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares com o objetivo de caracterizar o componente celular dessa lesão. Foram utilizadas as citoqueratinas 7, 8, 10, 13, 14, 18 e 19, vimentina e actina músculo-específica. A maioria das células tumorais foi positiva para vimentina e para as citoqueratinas 8, 14 e 18, mas foi negativa para a actina músculo-específica. Dessa forma os autores concluíram que o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau deriva das células da junção ácino - ducto intercalar e não das células mioepiteliais.

O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau apresenta algumas similaridades com o carcinoma adenóide cístico no aspecto histológico. Porém, apesar dessas duas lesões apresentarem aspectos histológicos semelhantes em algumas ocasiões, em contraste ao adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, o carcinoma adenóide cístico apresenta uma alta taxa de recorrência não só localmente como tem capacidade de fazer metástases à distância, e isso está associado ao pior prognóstico dessa lesão (GARDEN et al., 1995; RAPIDIS et al., 2005; SPIERS et al., 1996; YASUMATSU et al., 2004).

A distinção histológica entre o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e o carcinoma adenóide cístico se faz baseada principalmente nos aspectos citológicos. As células no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau são cuboidais ou colunares, apresentam núcleo vazado e citoplasma claro, sem o aspecto basofílico

característico do carcinoma adenóide cístico. Entretanto muitas vezes esta distinção se torna difícil, principalmente quando o padrão arquitetural dessas lesões é muito similar. Quando o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau apresenta padrão de crescimento sólido ou cribriforme, ele pode ser confundido com o carcinoma adenóide cístico. Histologicamente, as áreas sólidas do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau apresentam menos pleomorfismo celular, menos figuras de mitoses e quase nunca apresentam áreas de necrose quando comparados ao carcinoma adenóide cístico (BARNES et al., 2005). Por outro lado, quando há áreas cribriformes semelhantes, a distinção pode ser feita por painéis imunoistoquímicos que incluem especialmente citoqueratinas de vários pesos moleculares, vimentina e actina de músculo liso (ARAÚJO et al., 2000, 2001).

Apesar de diversos estudos imunoistoquímicos já terem sido realizados na tentativa de se descobrir marcadores imunoistoquímicos eficientes para diferenciar o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau do carcinoma adenóide cístico (LODUCCA et al., 2000, 2003), o único marcador que apresentou uma clara diferença no padrão de marcação entre esses dois tumores foi a vimentina que é negativa nas células luminais do carcinoma adenóide cístico e positiva em praticamente todas as células neoplásicas do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (DARLING; SCHNEIDER; PHILLIPS, 2002). Segundo Araújo et al. (2000), a vimentina está sempre presente nas células neoplásicas mioepiteliais mas não é exclusiva dessas células e pode ser expressa por outras células originárias do ducto intercalar, o que justificaria a positividade dessa proteína nas células do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, que se origina das células da junção ácino – ducto intercalar, como já mencionado anteriormente.

Beltran et al. (2006) sugeriram dois marcadores a serem utilizados como um painel para distinguir essas duas neoplasias: um anticorpo indicador de proliferação celular, o protooncogene C-kit que é um receptor transmembrana de tirosinoquinase, e o marcador do componente mioepitelial dos tumores de glândulas salivares - actina de músculo liso. Segundo os autores essas proteínas apresentaram forte marcação nos carcinomas adenóides císticos estudados em contraste aos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau.

2.3 Galectina-3

As galectinas constituem uma família de lectinas animais com afinidade por β -galactosídeos presentes na superfície de células normais e tumorais. Essas proteínas estão envolvidas em diversos eventos biológicos, tais como controle do ciclo celular, resposta imune, adesão celular, apoptose e metástase (BARONDES et al., 1994). Dentre os 14 tipos de galectinas identificados em mamíferos, a galectina-3, uma proteína monomérica de 31kDa, destaca-se pela intensa participação em processos inflamatórios, sendo produzida por macrófagos ativados, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, células dendríticas e algumas subpopulações de linfócitos. A galectina-3 também tem sido detectada no epitélio do trato gastrointestinal e respiratório, nos rins e em alguns neurônios sensitivos (HUGHES, 1999; KASAI; HIRABAYASHI, 1996).

Após sua síntese, a galectina-3 se localiza predominantemente no citoplasma podendo ser encontrada também no núcleo, sugerindo que esta proteína fica

alternando entre o núcleo e o citoplasma (DAVIDSON et al., 2002). A localização intracelular da galectina-3 no núcleo e/ou no citoplasma depende de vários fatores como o tipo celular, o nível de proliferação celular e a progressão neoplásica (MOUTSATSOS et al., 1987; OPENO et al., 2000).

Os mecanismos de transporte da galectina-3 entre o núcleo e o citoplasma, bem como as proteínas que podem participar desse processo são motivos de muitos estudos (DAVIDSON et al., 2006; LI et al., 2006; NAKAHARA et al., 2006).

Estudos têm demonstrado que a galectina-3 pode exibir marcação citoplasmática ou nuclear com diferentes funções (CALIFICE et al., 2004; DAVIDSON et al., 2002; HONJO et al., 2000; LIU; PATERSON; WANG, 2002; LOTZ et al., 1993; TAKENAKA et al., 2004; VAN DEN BRÜLE et al., 2000). A localização intracelular da galectina-3 desempenha papel importante na sua função anti-apoptótica e a fosforilação da galectina-3 no resíduo serina (Ser-6) parece ter um papel fundamental nesse processo. Takenaka et al. (2004) demonstraram que a substituição do resíduo Ser-6 por um aminoácido não fosforilado (alanina) impediu a translocação núcleo-citoplasma da proteína galectina-3, inibindo assim a sua atividade anti-apoptótica.

Califice et al. (2004) e Van den Brüle et al. (2000) demonstraram que há uma visível mudança de localização da galectina-3 intracelular nas células do carcinoma de próstata quando comparado com células não tumorais. Segundo os autores, a galectina-3 está expressa tanto no núcleo quanto no citoplasma das células normais da próstata, enquanto que nas células do tecido tumoral a galectina-3 manteve-se expressa no citoplasma, mas não no núcleo dessas células.

Em carcinomas de língua, os níveis da expressão nuclear da galectina-3 diminuíram durante a progressão tumoral quando comparados com a mucosa

normal, enquanto que a expressão citoplasmática da galectina-3 aumentou. Os autores sugerem que a translocação da galectina-3 do núcleo para o citoplasma durante a progressão neoplásica pode servir como fator prognóstico em pacientes com carcinoma de língua (HONJO et al., 2000). Esses resultados juntos sugerem que a galectina-3 parece ter uma atividade anti-tumoral quando presente no núcleo e favorecer a progressão do tumor quando expressa no citoplasma.

Alguns trabalhos sugerem que a galectina-3, quando localizada no compartimento extracelular, exerce uma função anti-apoptótica. A galectina-3 extracelular pode não ser uma molécula anti-apoptótica por si só, mas há a possibilidade de que a sua interação com alguma proteína na superfície celular possa exercer essa atividade anti-apoptótica em algumas células, contribuindo dessa forma para a sobrevivência celular (NAKAHARA; OKA; RAZ, 2005). Outros estudos também demonstraram o envolvimento da galectina-3 na inibição da apoptose. Células que apresentaram uma superexpressão da galectina-3 mostraram também um aumento da resistência à estimulação apoptótica quando induzidas por radiação e óxido nítrico (MOON et al., 2001; YANG; HSU; LIU, 1996).

Por outro lado, também foi descrita uma função pró-apoptótica para a galectina-3. Fukumori et al. (2003) relataram que a galectina-3 extracelular secretada pelas células tumorais pode exercer uma função pró-apoptótica nos linfócitos T humanos, contribuindo no mecanismo de “escape imunológico” das células tumorais, e indiretamente favorecendo a progressão tumoral.

O mecanismo molecular pelo qual a galectina-3 regula a apoptose não está bem esclarecido, contudo, é possível que ela possa mimetizar a Bcl-2, uma proteína mitocondrial bem conhecida como supressora da apoptose (MOON et al., 2001; YANG; HSU; LIU, 1996).

Apesar de existirem vários trabalhos na literatura relacionando a expressão da proteína galectina-3 à invasão tumoral e metástases em diversas neoplasias como neoplasias da tireóide, gástricas e da região da cabeça e pescoço, alguns dados são conflitantes e inconsistentes e não há um consenso geral na literatura a respeito do papel dessa proteína na progressão tumoral (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006).

Os estudos da galectina-3 em tecidos tireoideanos normais e neoplásicos demonstraram que a galectina-3 tem se mostrado ausente ou com uma fraca expressão em tecidos normais e neoplasias benignas da tireóide, e superexpressa em carcinomas tireoideanos, principalmente nos carcinomas papilíferos (FERNANDEZ et al., 1997; ROSA; KANAMURA; CARVALHO, 2005; WILSON et al., 1986).

Por outro lado, em algumas lesões como tumores de mama, próstata e ovário, a expressão da galectina-3 é inversamente proporcional ao potencial metastático da lesão (CASTRONOVO et al., 1996; KRZESLAK; LIPINSKA, 2004; PACIS et al., 2000).

Em tumores malignos epiteliais da região da cabeça e do pescoço alguns trabalhos verificaram que a galectina-3 está localizada na superfície celular, onde pode estar associada às interações celulares. Seu padrão de expressão parece estar associado à diminuição do padrão de diferenciação do tumor, sugerindo que a galectina-3 pode ser utilizada como um marcador biológico e de diferenciação nesse tipo de lesão (GILLENWATER et al., 1996; PLZAK et al., 2004).

A expressão da galectina-3 em neoplasias de glândulas salivares foi estudada pela primeira vez por Xu et al. (2000). Os autores verificaram que houve marcação da proteína em 3 dos 14 casos de carcinomas adenóides císticos estudados, em 8

dos 9 casos de adenocarcinomas polimorfos de baixo grau e em 8 dos 9 casos de carcinomas ex-adenomas pleomórficos. Diante desse resultado os autores concluíram que a expressão da galectina-3 pode estar associada à diferenciação celular.

Mais tarde, Penner, Folpe e Budnick (2002) também compararam a expressão da galectina-3 em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e concluíram que a galectina-3 não exerce nenhuma função na diferenciação celular dessas duas lesões.

Teymoortash et al. (2006) estudaram 35 casos de carcinoma adenóide cístico de cabeça e pescoço e observaram que todos os casos que apresentaram metástases à distância eram positivos para a galectina-3 e todos os casos onde não ocorreram metástases à distância eram negativos para a galectina-3. Da mesma forma, todos os pacientes que apresentaram metástases regionais também eram positivos para a galectina-3, com uma marcação predominantemente citoplasmática. Diante disso concluíram que a expressão da galectina-3 está associada ao aumento da incidência de metástases regionais e à distância nos carcinomas adenóides císticos de cabeça e pescoço.

Recentemente foi estudada a expressão imunoistoquímica da proteína galectina-3 em carcinomas adenóides císticos e adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade. Nesse trabalho observou-se que a marcação da galectina-3 foi predominantemente nuclear nos carcinomas adenóides císticos estudados e citoplasmática nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade. Além disso, de uma forma geral, a marcação imunoistoquímica da proteína galectina-3 nessas lesões manteve o mesmo padrão de marcação das citoqueratinas observado nas glândulas salivares normais, porém, com intensidade e

padrões de expressão distintos, sugerindo a participação dessa proteína na diferenciação celular (FERRAZZO et al., 2007).

Os resultados de vários estudos mostram que, embora a galectina-3 esteja localizada com mais frequência no citoplasma, ela também pode ser detectada no núcleo, na superfície celular ou no meio extracelular, o que indica uma multifuncionalidade dessa molécula (HUGHES, 1999). Os níveis de expressão da galectina-3 dependem do organismo ou do tecido avaliado, sugerindo que fatores específicos do tumor ou do tecido podem modular a expressividade da galectina-3 (TAKENAKA et al., 2004).

Weinberger et al. (2007) estudaram a marcação nuclear e citoplasmática da galectina-3, associando-a à expressão da β -catenina e da ciclina D1 em carcinomas de tireóide. Os autores sugerem que a expressão da galectina-3 parece estar fortemente associada ao aumento da expressividade da β -catenina e da ciclina D1 nos carcinomas bem diferenciados de tireóide, estando, portanto a galectina-3 envolvida no desenvolvimento dessas lesões através da ativação da via de sinalização do Wnt.

2.4 β -Catenina

As cateninas são uma família de moléculas representadas pela α - (102 kDa), β - (88 kDa) e γ - (82 kDa) catenina. Dentre o grupo das cateninas, a β -catenina possui destaque por se ligar diretamente à porção citoplasmática da E-caderina, uma proteína transmembrânica envolvida na adesão celular, formando o

denominado complexo caderina-catenina, que participa da adesão célula-célula dependente do cálcio nas junções celulares (OZAWA; BARIBAULT; KEMLER, 1989).

Além da função na adesão celular junto com a E-caderina, a β -catenina, quando na sua forma monomérica ou livre, possui uma função sinalizadora, ativando genes alvo responsáveis pela divisão celular, como o c-myc e a ciclina D1 (SHTUTMAN et al., 1999; TETSU; McCORMICK, 1999). Essa função sinalizadora da β -catenina está associada à sua participação na via de sinalização do Wnt (SHIMURA et al., 2004). Os genes Wnt pertencem a uma família em expansão de moléculas de sinalização e proto-oncogenes em potencial que estão envolvidos não apenas na carcinogênese, mas também na regulação da embriogênese, proliferação e diferenciação de linhagens celulares. Dezenove genes Wnt existem no genoma de mamíferos e têm demonstrado funcionar como marcadores moleculares associados com a progressão tumoral (KATOH, 2005). Os membros da família Wnt têm sido divididos em duas classes funcionais com base em suas atividades biológicas. Alguns membros dessa família (Wnt-1, Wnt-3A, and Wnt-8) sinalizam pela via do Wnt-1/wingless, dita via clássica ou canônica, que estabiliza a β -catenina citoplasmática, induzindo a translocação desta para o núcleo onde se ligará a fatores de transcrição (KATOH, 2005; SHIMURA et al., 2005).

A β -catenina citoplasmática normalmente tem vida curta porque ela é rapidamente fosforilada e degradada, mantendo-se assim níveis normais dessa proteína no citoplasma. A superexpressão dessa proteína livre no citoplasma por falha nos mecanismos de fosforilação e degradação, é suficiente para que ela seja translocada para o núcleo, ativando sua atividade transcricional podendo estar dessa forma relacionada à carcinogênese (SHIMURA et al., 2004). Esse papel da β -

catenina na carcinogênese tem sido extensivamente estudado nos adenocarcinomas colorretais (BIENZ; CLEVERS, 2000; POLAKIS; HART; RUBINFELD, 1999; TETSU; MCCORMICK, 1999).

Daa et al. (2005) avaliaram a expressão da β -catenina, E-caderina e ciclina D1 em 23 casos de carcinoma adenóide cístico de glândulas salivares. Segundo os autores, todos os casos de carcinoma adenóide cístico apresentaram marcação junto à membrana celular para a β -catenina e para a E-caderina, porém com uma distribuição irregular. Somente 3/23 casos apresentaram marcação nuclear para a β -catenina e 11/23 casos exibiram marcação nuclear para a ciclina D1. Os autores pesquisaram ainda através de PCR se havia mutação no gene da β -catenina e verificaram que em um caso, onde havia acúmulo da β -catenina no núcleo, havia também mutação no gene e sugeriram que a mutação no gene da β -catenina foi responsável pelo acúmulo dessa proteína no núcleo, mas isso não estava associado à estimulação da ciclina D1.

Furuse et al. (2006) estudaram a expressão da β -catenina e da E-caderina em algumas neoplasias de glândulas salivares. Os autores observaram um aumento da marcação nuclear da β -catenina nas células mioepiteliais do carcinoma epitelial-mioepitelial. Outras neoplasias estudadas como o adenoma pleomórfico, o carcinoma adenóide cístico e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau não apresentaram diferenças no padrão de marcação dessas proteínas. Segundo os autores, esses resultados refletem os diferentes mecanismos de carcinogênese encontrados nas diferentes neoplasias das glândulas salivares.

Zhou e Gao (2006) estudaram a expressão da β -catenina, Pin1 e ciclina D1 em carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares e verificaram que o acúmulo citoplasmático e a marcação nuclear aumentada da β -catenina em algumas

células tumorais, associado à diminuição da expressão dessa proteína na membrana celular, estava associado à maioria dos carcinomas adenóides císticos metastáticos, sugerindo que nos carcinomas adenóides císticos a via de sinalização do Wnt está ativada e isso pode estar associado à carcinogênese e metástases nessas lesões.

2.5 Ciclo Celular e Ciclina D1

O organismo humano consiste num grande número de células cujos núcleos contêm todo o nosso material genético (DNA), localizado em 46 cromossomos (em 23 pares). A divisão celular é fundamental para a manutenção do estado de equilíbrio do indivíduo. O processo de divisão celular é constituído basicamente por dois períodos que se repetem constantemente: a intérfase e a mitose. Este processo inclui a replicação cromossomal e a segregação em duas células filhas (KOSHLAND Jr, 1989; LINDEN et al., 1992). Estes eventos são coordenados através do ciclo celular.

O ciclo celular consiste em diversas fases; a replicação do DNA ocorre durante a fase S (síntese de DNA) e a segregação cromossomal durante a fase M (mitótica). Nas células somáticas as fases S e M são separadas pelas chamadas fases “gap” ou intervalo: G1 (pré-sintética) e G2 (pré-mitótica). Na primeira (G1), que ocorre antes da replicação do DNA, há uma série de eventos biológicos responsáveis pelo crescimento celular. Quando atinge um determinado tamanho a célula entra na fase seguinte (S), na qual acontece a síntese do DNA. A célula duplica o seu material genético (replicação do DNA), dando origem a uma cópia de

cada cromossomo. Finalmente na fase seguinte (G2), que corresponde ao intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose, a célula verifica se a duplicação do DNA está completa e se prepara para a divisão celular. A fase M é o período mais curto do ciclo celular. Aqui ocorre a condensação dos cromossomos e o seu alinhamento no fuso mitótico, culminando com a separação das cromátides irmãs (NURSE, 1990, 1994, 2000).

Depois da divisão as células voltam a G1 e o ciclo celular fica completo. Durante a sua vida a célula pode se proliferar continuamente, pode entrar em apoptose ou pode permanecer quiescente, saindo do ciclo celular e entrando em uma fase fisiológica de repouso (G0).

As transições que ocorrem durante a progressão do ciclo celular estão sendo constantemente controladas. A divisão celular é controlada pelo ambiente extracelular como reflexo da ação de fatores de crescimento, fatores de adesão celular e hormônios, e por um sistema de controle intrínseco da célula. Este sistema interno de controle do ciclo celular é regulado por interrupções que podem parar o ciclo em pontos de checagem (ou “checkpoints”) em resposta a qualquer irregularidade, como por exemplo, alteração da replicação ou DNA danificado, assegurando que os estágios do ciclo celular tenham sido corretamente completados antes do próximo estágio de divisão começar (COLLINS; JACKS; PAVLETICH, 1997; HARTWELL; WEINERT, 1989). Existem dois principais pontos de checagem: o G1/S, também chamado de ponto de restrição, e o G2/M, que ocorre antes da mitose.

A regulação do ciclo celular é realizada por ciclinas e por proteínas quinases dependentes de ciclinas (Cdks). As ciclinas são proteínas do ciclo celular das células eucarióticas e são assim chamadas por apresentarem expressões variadas e

cíclicas durante o ciclo celular. Essas proteínas são sintetizadas imediatamente antes de serem utilizadas e seus níveis caem abruptamente depois da sua ação no ciclo celular devido à sua degradação (HUNTER; PINES, 1994).

São conhecidos oito tipos diferentes de ciclinas humanas: A, B, C, D, E, F, G e H. Existem três subtipos da ciclina D (D1, D2 e D3) que se distribuem de acordo com o tipo celular. A ciclina D1 encontra-se amplamente presente em células epiteliais e fibroblastos, e é uma proteína chave na regulação do ciclo celular, particularmente no ponto de controle G1/S - ponto de restrição - do ciclo celular (SHERR; ROBERTS, 1995). Esta proteína forma complexos com a Cdk4 e Cdk6. A função principal desses complexos é fosforilar a proteína do retinoblastoma. A fosforilação da proteína do retinoblastoma libera um fator de transcrição (E2F), que leva a célula à progressão da fase G1 para fase S do ciclo celular (COQUERET, 2002). Este último autor relatou que, além dessa função da ciclina D1 como ativadora das proteínas quinases dependentes de ciclina, existe outra função descrita para essa proteína. Estudos experimentais demonstraram que a ciclina D1 funciona como reguladora da transcrição, modulando a atividade de fatores de transcrição. Segundo Ewen e Lamb (2004), ambas as atividades da ciclina D1 podem contribuir no processo da carcinogênese.

O gene da ciclina D1 tem sido freqüentemente amplificado ou superexpresso em vários tipos de carcinomas em humanos, incluindo os carcinomas de cabeça e pescoço (CALLENDER et al., 1994; EL-NAGGAR; STECK; BATSAKIS, 1995; MOTOKURA; ARNOLD, 1993).

Lin et al. (2002) investigaram a participação da galectina-3 sobre a expressão da ciclina D1 em culturas celulares de carcinoma de mama. Segundo os autores, a expressão da ciclina D1 é regulada positivamente em células que apresentam

superexpressão da galectina-3. Dessa forma, sugeriram que a galectina-3 regula a transcrição gênica através da estimulação da ciclina D1.

Segundo Neves et al. (2004), a forte expressão da proteína ciclina D1 em carcinomas epidermóides bucais de alto grau sugerem que esta proteína está associada à proliferação celular nessas lesões.

Angadi e Krishnapillai (2007) concluíram que o aumento da expressão da proteína ciclina D1 está associado à perda da diferenciação em carcinomas epidermóides bucais e carcinomas verrucosos.

A participação da ciclina D1 na proliferação celular e progressão tumoral nos carcinomas adenóides císticos tem sido estudada, entretanto existe muita controvérsia na literatura. Yasumatsu et al. (2004) estudaram a expressão da ciclina D1 em carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares. Neste trabalho os autores concluíram que a expressão da ciclina D1 não está associada à proliferação das células neoplásicas, não tendo, portanto, nenhum valor prognóstico nessas lesões. Recentemente, Greer Jr et al. (2007) avaliaram a expressão imunoistoquímica da ciclina D1 em 39 casos de carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares que foram divididos de acordo com os subtipos histológicos tubular, cribriforme e sólido. Os autores não conseguiram estabelecer uma associação entre o subtipo histológico do tumor e a expressão da ciclina D1, porém observaram uma superexpressão dessa proteína (mais de 5% de núcleos de células marcadas) em 90% dos casos (35/39). Os autores sugeriram que a superexpressão da ciclina D1 pode contribuir para o crescimento tumoral e está associada ao potencial invasivo dos carcinomas adenóides císticos.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho é avaliar a expressão imunoistoquímica nuclear e citoplasmática da proteína galectina-3, relacionando-a à marcação imunoistoquímica da β -catenina e da ciclina D1 em carcinomas adenóides císticos e adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade de glândulas salivares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística e análise morfológica

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, através do Parecer de Aprovação número 150/07 (Anexo A).

Para este estudo foram utilizados materiais selecionados dos Arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – SP obtidos de biópsias de lesões bucais, sendo 15 casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade e 15 casos de carcinoma adenóide cístico de glândulas salivares. As lâminas referentes aos casos e coradas pela técnica da hematoxilina e eosina foram submetidas a um estudo morfológico em microscopia de luz para confirmação do diagnóstico. Os casos de carcinoma adenóide cístico foram classificados e separados histologicamente de acordo com os subtipos: tubular, cribriforme e sólido.

Os tumores foram submetidos ao estudo imunoistoquímico, utilizando-se o método do polímero marcado com peroxidase e os cortes submetidos aos anticorpos primários anti-galectina-3, β -catenina e ciclina D1.

4.2 Técnica imunoistoquímica

Para realização da técnica de imunoistoquímica foram utilizados cortes de 3 μm de espessura a partir do material previamente fixado em formol a 10% e emblocado em parafina. Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto, secas e mergulhadas por um minuto em solução de 3-aminopropytriethoxy-silane (Sigma Chemical CO., St Louis, MO / USA) a 10% em álcool absoluto. A desparafinação foi realizada em dois banhos de xilol, um a 60 °C por 30 minutos, e outro em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida os cortes foram hidratados em uma série descendente de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguido por etanol 95% e 85% durante 5 minutos cada. Em seguida, os cortes foram imersos em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica a 95% durante 10 minutos com a finalidade de se remover o pigmento formólico. Posteriormente, foram lavados em água corrente por 10 minutos e passados por dois banhos de água destilada de 5 minutos cada.

Para todos os anticorpos estudados foi realizada a mesma recuperação antigênica. Os cortes receberam tratamento para recuperação antigênica com tampão TRIS / EDTA a 10mM, pH 9.0 por 10 minutos em microondas. Após resfriamento em temperatura ambiente, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, passados em dois banhos de água destilada de 5 minutos cada, e então submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena que foi feito com dois banhos de quinze minutos cada um em solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol (1:1). Os cortes foram incubados “overnight” por 18 horas com o anticorpo primário anti-galectina-3 (clone 9C4, RDI, USA) em cuba úmida à temperatura de 4°

C, na diluição de 1:200. Os anticorpos anti- β -catenina (clone 14/Beta-Catenin, BD Biosciences, USA) e anti-ciclina D1 (clone DCS-6, Dako Corporation, Glostrup, Denmark) foram incubados à temperatura ambiente durante 40 minutos na diluição de 1:200 e 1:55, respectivamente. Todas as secções foram incubadas em um ciclo de kit EnVision Mouse (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos e lavadas com TBST pH 6.0.

Para revelação foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St Louis MO / USA). Após a lavagem, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer previamente filtrada. Os passos seguintes foram desidratação em uma cadeia ascendente de etanol seguindo a seqüência de 70%, 90% e 100% durante 2 minutos cada banho, diafanização em xilol (2 banhos de 5 minutos cada), e montagem com lamínula.

Nos cortes utilizados como controle negativo a incubação com o anticorpo primário não foi realizada. O controle positivo utilizado para o anticorpo da proteína galectina-3 foi um bloco parafinado de carcinoma papilífero de tireóide previamente testado e positivo. Para a β -catenina foi utilizado um bloco parafinado de arquivo que continha fragmento de mucosa normal, cujo epitélio apresentava marcação positiva para o referido anticorpo; para a ciclina D1 o controle positivo foi um caso de carcinoma epidermóide bucal sabidamente positivo para este anticorpo. Como controles positivos internos foram avaliados, quando presentes, epitélio estratificado da mucosa de revestimento e vasos sangüíneos. Tecidos de glândula salivar normal estavam presentes na maioria dos casos estudados e foram também avaliados.

4.3 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi feita mediante uma avaliação quantitativa das proteínas galectina-3 e ciclina D1 associada à análise qualitativa da proteína β -catenina nos dois tumores estudados: adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenóide cístico, sendo que nesse último as lesões foram ainda separadas por subtipos histológicos. Foram consideradas positivas as células com marcação imunoistoquímica de coloração acastanhada, não sendo levada em consideração a intensidade da coloração. A avaliação qualitativa da β -catenina foi realizada por três observadores diferentes e a avaliação quantitativa das proteínas galectina-3 e ciclina D1 foi executada por um único observador.

Para a galectina-3 foram consideradas positivas marcações citoplasmáticas e nucleares, sendo que todos os casos que apresentaram células neoplásicas marcadas foram considerados positivos, independente da quantidade de células marcadas. A expressão imunoistoquímica dessa proteína no núcleo e no citoplasma foi avaliada separadamente. Com a finalidade de se fazer a análise estatística, foi considerada a quantidade percentual absoluta e relativa de núcleos e citoplasmas de células neoplásicas marcadas em um total de 1000 células neoplásicas.

A β -catenina foi avaliada qualitativamente levando-se em consideração a marcação dessa proteína junto à membrana e a marcação em núcleo e/ou citoplasma. Para isso foi atribuído o escore “0” (zero) àqueles casos que não apresentaram marcação dessa proteína em núcleo e/ou citoplasma e escore “1” (um) aos casos que apresentaram marcação de núcleo e/ou citoplasma. Além disso, foram avaliados separadamente os casos onde houve perda de expressão da β -

catenina na membrana celular. Para analisar esse dado, atribuiu-se escore “0” (zero) aos casos onde havia marcação da β -catenina junto à membrana celular e escore “1” (um) aos casos que apresentaram perda de expressão da proteína na membrana.

Na avaliação da ciclina D1, foram consideradas positivas somente células apresentando marcação nuclear de coloração acastanhada. De acordo com estudos prévios (GREER Jr. et al., 2007; SHIRATSUCHI et al., 2007; WEINBERGER et al., 2007; YASUMATSU et al., 2004), foram considerados positivos para a ciclina D1 e com uma superexpressão dessa proteína os casos que exibiram mais de 5% de núcleos de células neoplásicas marcadas para a proteína, e negativos os casos que apresentaram menos de 5% de núcleos marcados. Com a finalidade de se realizar a análise estatística, foi atribuído o escore “0” (zero) aos casos negativos para a ciclina D1 e escore “1” (um) aos casos positivos para essa proteína.

As células positivas para a galectina-3 e para a ciclina D1 foram contadas manualmente - 1000 células por campo escolhido aleatoriamente em cada caso estudado. As imagens dos campos foram obtidas em microscópio de luz Carl Zeiss Axio Imager A1 com aumento final de 400x e câmera Axio Cam HR3 acoplados a um sistema computadorizado utilizando o software Axio Vision Release 4.6.3 SP1, 2007, que permitiu a contagem manual das células positivas dentro dos parâmetros previamente estabelecidos.

4.4 Análise estatística

Para responder ao objetivo do estudo foram utilizados os testes Mann-Whitney (CONOVER, 1980) para comparar a galectina-3 entre os dois tipos de tumores (adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenóide cístico) e os testes de Kruskal-Wallis (NETER et al., 1996) para comparar a mesma proteína entre os subtipos do carcinoma adenóide cístico. Para verificar a existência de associação entre as proteínas β -catenina e ciclina D1 nos dois tumores foram realizados testes qui-quadrado ou testes exatos de Fischer (AGRESTI, 1990) quando a amostra não foi suficiente para a realização do teste qui-quadrado. O mesmo foi feito para associar as proteínas aos subtipos histológicos do carcinoma adenóide cístico. Por último, para verificar a existência de associação entre a expressão imunoistoquímica das diferentes proteínas, foram realizados testes Mann-Whitney para comparar a expressão da galectina-3 com a expressão da β -catenina e da ciclina D1 e os testes qui-quadrado ou exato de Fisher para comparar a expressão da β -catenina e ciclina D1 nos dois tumores estudados.

Os dados foram ilustrados através de gráficos de Barras (BUSSAB; MORETTIN, 1987) e em todas as análises utilizou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

O software utilizado nas análises estatísticas foi o SPSS - Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, USA) na versão 13.0 e os gráficos foram elaborados utilizando-se o Excel 2003.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos histológicos do carcinoma adenóide cístico e do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Os carcinomas adenóides císticos estudados incluíram dois casos do subtipo tubular, sete casos do subtipo cribriforme e seis casos do subtipo sólido, totalizando 15 casos.

As lâminas coradas pela hematoxilina e eosina e observadas sob microscópio de luz revelaram o parênquima da lesão constituído por dois tipos de células: células luminais, com formato cuboidal e citoplasma eosinofílico, e células mioepiteliais, com núcleo hipercromático basofílico e citoplasma claro e escasso.

No subtipo tubular observavam-se estruturas tubulares ductiformes compostas por duas camadas de células. O subtipo cribriforme era caracterizado pela formação de ilhas de células mioepiteliais contendo múltiplos espaços pseudocísticos, onde por vezes também eram observados pequenos espaços ductiformes delimitados por células mais cuboidais. Células neoplásicas formando ninhos sólidos e algumas vezes lençóis, onde se observavam poucos espaços ductiformes se abrindo circundados por células luminais, caracterizavam o subtipo sólido do carcinoma adenóide cístico (Figuras 5.1 A e B).

Os 15 casos de adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade estudados eram compostos histologicamente por células cuboidais ou colunares que apresentavam núcleo vazado e citoplasma claro, sem a presença de atipias celulares. Essas células eram arranjadas arquiteturalmente de formas variadas,

formando quatro padrões histológicos distintos: o padrão lobular que era formado por lóbulos de células neoplásicas arranjadas em ilhas sólidas; áreas exibindo estruturas tubulares ductiformes com uma única camada de células; ilhas de células neoplásicas com múltiplos espaços pseudocísticos, configurando o aspecto cribriforme e também áreas formando cordões e trabéculas. O aspecto histopatológico de um dos casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade pode ser observado na figura 5.2 A.

5.2 Expressão imunoistoquímica da proteína galectina-3

Todos os casos de carcinomas adenóides císticos apresentaram marcação imunoistoquímica para a proteína galectina-3. Essa marcação foi predominantemente nuclear, sendo que em 4 dos 15 casos estudados (26,66%) a marcação foi exclusivamente nuclear.

No subtipo tubular do carcinoma adenóide cístico, as células internas das estruturas ductiformes tubulares expressaram a proteína tanto no núcleo quanto no citoplasma. Os casos do subtipo cribriforme do carcinoma adenóide cístico apresentaram poucas células positivas para a galectina-3. A marcação nesse subtipo histológico estava localizada restritamente nas células luminais que formavam os pequenos ductos no interior das ilhas neoplásicas cribriformes. Essa marcação foi predominantemente nuclear em 4/7 casos de carcinomas adenóides císticos cribriformes estudados. No subtipo sólido observou-se marcação imunoistoquímica para a galectina-3 nas células luminais que delimitavam espaços

ductiformes que eventualmente se formavam e essa marcação era predominantemente nuclear em 4/6 casos (Figura 5.1 C).

No adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, independente do padrão histológico observado, a marcação imunoistoquímica da galectina-3 foi intensa, marcando sem distinção praticamente todas as células neoplásicas, predominantemente no citoplasma (Figura 5.2 B).

Os dados referentes à marcação imunoistoquímica da proteína galectina-3 nos dois tipos de tumores e subtipos histológicos do carcinoma adenóide cístico estão resumidos na tabela 5.1.

5.3 Expressão imunoistoquímica da proteína β -catenina

Todos os 15 casos de carcinomas adenóides císticos apresentaram marcação imunoistoquímica da β -catenina no núcleo e/ou no citoplasma. Em sete dos 15 casos estudados (46,66%) houve perda de expressão da β -catenina junto à membrana celular das células neoplásicas em algumas áreas do tumor. Dentre os subtipos histológicos do carcinoma adenóide cístico, houve perda de expressão da proteína na região da membrana celular em quatro dos seis casos do subtipo sólido (66,66%) e em três dos sete casos (42,85%) do subtipo cribriforme. Nos dois casos do subtipo tubular estudados não houve perda de expressão da β -catenina em nenhuma região da lesão (Figuras 5.1 D e E).

Dentre os adenocarcinomas polimorfos de baixo grau, 12 dos 15 casos (80%) expressaram a β -catenina no núcleo com acúmulo dessa proteína no citoplasma.

Houve perda de expressão da β -catenina junto à membrana celular em 11 casos (73,33%) em algumas regiões do tumor (Figura 5.2 C e Tabela 5.2).

5.4 Expressão imunoistoquímica da proteína ciclina D1

Dos 15 casos de carcinomas adenóides císticos avaliados pela técnica imunoistoquímica para a proteína ciclina D1, 10 casos (66,66%) foram positivos para essa proteína, exibindo mais de 5% de núcleos de células neoplásicas marcadas, e cinco casos foram considerados negativos, apresentando menos de 5% de núcleos marcados para a proteína (Figura 5.1 F).

Verificou-se a positividade da proteína ciclina D1 em apenas um caso dos 15 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade estudados, correspondendo a 6,66% dos casos (Figura 5.2 D e Tabela 5.2).

A comparação dos aspectos histopatológicos e imunoistoquímicos das proteínas galectina-3, β -catenina e ciclina D1 entre as duas neoplasias estudadas está resumida na figura 5.3.

Tabela 5.1 – Dados referentes à marcação imunoistoquímica da proteína galectina-3 nos carcinomas adenóides císticos e nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade

Caso	Tipo de Tumor	Gal-3/1000	Gal-3 Na %	Gal-3 Nr %	Gal-3 Ca %	Gal-3 Cr %
01	CAC sólido	97	5,70	58,76	4,00	41,24
02	CAC sólido	72	6,30	87,50	0,90	12,50
03	CAC sólido	275	26,50	96,36	1,00	3,64
04	CAC sólido	900	20,00	22,22	70,00	77,78
05	CAC sólido	134	3,00	22,39	10,40	77,61
06	CAC sólido	54	5,40	100,00	0,00	0,00
07	CAC cribriforme	249	24,90	100,00	0,00	0,00
08	CAC cribriforme	410	22,00	53,66	19,00	46,34
09	CAC cribriforme	94	9,40	100,00	0,00	0,00
10	CAC cribriforme	7	0,30	42,85	0,40	57,14
11	CAC cribriforme	5	0,50	100,00	0,00	0,00
12	CAC cribriforme	100	1,00	10,00	9,00	90,00
13	CAC cribriforme	52	0,60	11,53	4,60	88,46
14	CAC tubular	950	30,00	31,58	65,00	68,42
15	CAC tubular	550	25,00	45,45	30,00	54,54
16	APBG	950	5,00	5,26	90,00	94,73
17	APBG	885	1,50	1,69	87,00	98,30
18	APBG	1000	15,00	15,00	85,00	85,00
19	APBG	950	15,00	15,78	80,00	84,21
20	APBG	970	21,00	21,64	76,00	78,35
21	APBG	900	3,00	3,33	87,00	96,66
22	APBG	956	7,60	7,95	88,00	92,05
23	APBG	960	30,00	31,25	66,00	68,75
24	APBG	920	2,60	2,82	89,40	97,17
25	APBG	930	3,00	3,22	90,00	96,77
26	APBG	1000	13,00	13,00	87,00	87,00
27	APBG	1000	8,00	8,00	92,00	92,00
28	APBG	900	28,00	31,11	62,00	68,88
29	APBG	960	5,00	5,20	91,00	94,79
30	APBG	600	2,00	3,33	58,00	96,66

CAC: carcinoma adenóide cístico; **APBG:** adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade; **Gal-3:** galectina-3; **Gal-3/1000:** número total de células neoplásicas marcadas para a galectina-3 em um total de 1000 células neoplásicas; **Na %:** número absoluto de núcleos marcados em percentual; **Nr %:** número relativo de núcleos marcados em percentual; **Ca %:** número absoluto de citoplasmas marcados em percentual; **Cr %:** número relativo de citoplasmas marcados em percentual

Tabela 5.2 – Dados referentes à marcação imunoistoquímica das proteínas β -catenina e ciclina D1 nos carcinomas adenóides císticos e nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade

Caso	Tipo de Tumor	β-Cat N/C	β-Cat M	Cicl D1 +/-	Cicl D1 %
01	CAC sólido	1	0	1	5,4
02	CAC sólido	1	1	1	20,1
03	CAC sólido	1	1	1	19,3
04	CAC sólido	1	1	1	10,0
05	CAC sólido	1	0	1	14,8
06	CAC sólido	1	1	0	0,4
07	CAC cribriforme	1	0	1	19,8
08	CAC cribriforme	1	0	1	14,9
09	CAC cribriforme	1	1	0	2,7
10	CAC cribriforme	1	0	0	0,8
11	CAC cribriforme	1	0	0	0,3
12	CAC cribriforme	1	1	0	0,8
13	CAC cribriforme	1	1	1	11,9
14	CAC tubular	1	0	1	5,2
15	CAC tubular	1	0	1	10,8
16	APBG	1	0	0	0,3
17	APBG	1	1	0	1,2
18	APBG	1	0	0	0,8
19	APBG	0	1	0	1,0
20	APBG	0	1	0	2,2
21	APBG	0	1	1	7,0
22	APBG	1	1	0	0,0
23	APBG	1	0	0	2,7
24	APBG	1	1	0	0,0
25	APBG	1	1	0	0,0
26	APBG	1	1	0	1,0
27	APBG	1	1	0	0,0
28	APBG	1	1	0	0,8
29	APBG	1	0	0	0,2
30	APBG	1	1	0	0,5

CAC: carcinoma adenóide cístico; **APBG:** adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade; **β -Cat N/C:** β -catenina marcada em núcleo e/ou citoplasma (0 = não marca núcleo e/ou citoplasma; 1 = marca núcleo e/ou citoplasma); **β -Cat M:** β -catenina marcada junto à membrana celular (0 = não perde expressão em membrana celular; 1 = perda de expressão da proteína junto à membrana celular); **Cicl D1 +/- :** casos negativos ou positivos para a proteína ciclina D1 (0 = negativo / menos de 5% de núcleos marcados com a ciclina D1; 1 = positivo / mais de 5% de núcleos marcados com a ciclina D1); **Cicl D1 %:** número percentual de núcleos de células neoplásicas marcadas em 1000 células

Figura 5.1- Carcinoma adenóide cístico, subtipo sólido

A e B- Aspectos histopatológicos em hematoxilina e eosina (aumento original 100x e 400x); **C-** Marcação imunoistoquímica da galectina-3 predominantemente nuclear (aumento original 400x). No detalhe, marcação predominantemente nuclear das células luminiais (aumento original 1000x); **D e E-** Marcação imunoistoquímica da β -catenina: **D-** Perda de expressão da proteína em algumas áreas do tumor (aumento original 400x); **E-** Marcação da β -catenina junto à membrana celular, acúmulo citoplasmático e marcação nuclear (aumento original 1000x); **F-** Marcação imunoistoquímica nuclear da ciclina D1 (aumento original 400x)

Figura 5.2- Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

A- Aspectos histopatológicos em hematoxilina e eosina (aumento original 400x); **B-** Marcação imunoistoquímica da galectina-3 predominantemente citoplasmática (aumento original 400x); **C-** Marcação imunoistoquímica da β -catenina mostrando marcação da proteína junto à membrana celular, acúmulo citoplasmático e marcação nuclear (aumento original 1000x); **D-** Marcação imunoistoquímica nuclear da ciclina D1 (aumento original 400x)

Figura 5.3- Comparação dos aspectos histopatológicos e imunoistoquímicos entre as duas neoplasias estudadas
 Imagens A a D- Carcinoma adenóide cístico (CAC); Imagens E a H- Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (APBG); HE = hematoxilina e eosina; Gal-3 = galectina-3; β-cat = β-catenina; Cic1D1 = ciclina D1

5.5 Análise estatística

Foram realizados testes Mann-Whitney para comparar a marcação imunoistoquímica nuclear e citoplasmática da galectina-3 entre os dois tipos de tumores estudados.

A contagem média absoluta de núcleos marcados da proteína galectina-3 foi 12,04% no carcinoma adenóide cístico e 10,65% no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau. O teste de Mann-Whitney revelou que essa diferença não foi estatisticamente significativa. Quando comparada a quantidade relativa de núcleos de células marcadas para essa proteína nos dois tumores, observou-se que a expressão da galectina-3 foi maior no carcinoma adenóide cístico e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). A marcação citoplasmática da proteína galectina-3 foi maior no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau tanto em valores absolutos quanto em valores relativos ($p < 0,001$). Esses resultados estão ilustrados na tabela 5.3 e no gráfico 5.1.

Tabela 5.3 – Análise estatística da expressão da galectina-3 no carcinoma adenóide cístico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Proteína	Tumor	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
Gal-3 Núcleo (absoluto)	CAC	12,04	11,20	6,3	0,3	30,0	15	>0, 999
	APBG	10,65	9,44	7,6	1,5	30,0	15	
	Total	11,34	10,20	7,0	0,3	30,0	30	
Gal-3	CAC	14,29	23,23	4,0	0,0	70,0	15	<0, 001
Citoplasma	APBG	81,89	11,20	87,0	58,0	92,0	15	
(absoluto)	Total	48,09	38,77	63,5	0,0	92,0	30	
Gal-3 Núcleo (relativo)	CAC	58,82	35,36	53,7	10,0	100,0	15	<0, 001
	APBG	11,24	9,95	8,0	1,7	31,3	15	
	Total	35,03	35,17	21,9	1,7	100,0	30	
Gal-3	CAC	41,18	35,36	46,3	0,0	90,0	15	<0, 001
Citoplasma	APBG	88,75	9,95	92,1	68,8	98,3	15	
(relativo)	Total	64,97	35,17	78,1	0,0	98,3	30	

CAC: carcinoma adenóide cístico; **APBG:** adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade; **Gal-3:** galectina-3; **DP:** desvio padrão; **N:** número de casos da amostra

Gráfico 5.1 - Análise estatística da expressão da galectina-3 no carcinoma adenóide cístico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Foram realizados testes de Kruskal-Wallis para comparar a marcação imunoistoquímica da galectina-3 entre os subtipos do carcinoma adenóide cístico e os resultados mostraram que a expressão da galectina-3 é estatisticamente a mesma entre os subtipos do carcinoma adenóide cístico ($p > 0,05$). Dados ilustrados na tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Marcação imunoistoquímica da galectina-3 entre os subtipos do carcinoma adenóide cístico

Proteína	Subtipo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
Gal-3 Núcleo (absoluto)	Sólido	11,2	9,7	6,0	3,0	26,5	6	0,081
	Cribriforme	8,4	10,8	1,0	0,3	24,9	7	
	Tubular	27,5	3,5	27,5	25,0	30,0	2	
	Total	12,0	11,2	6,3	0,3	30,0	15	
Gal-3 Citoplasma (absoluto)	Sólido	14,4	27,5	2,5	0,0	70,0	6	0,120
	Cribriforme	4,7	7,2	0,4	0,0	19,0	7	
	Tubular	47,5	24,7	47,5	30,0	65,0	2	
	Total	14,3	23,2	4,0	0,0	70,0	15	
Gal-3 Núcleo (relativo)	Sólido	64,5	35,8	73,1	22,2	100,0	6	0,788
	Cribriforme	59,7	40,8	53,7	10,0	100,0	7	
	Tubular	38,5	9,8	38,5	31,6	45,5	2	
	Total	58,8	35,4	53,7	10,0	100,0	15	
Gal-3 Citoplasma (relativo)	Sólido	35,5	35,8	26,9	0,0	77,8	6	0,788
	Cribriforme	40,3	40,8	46,3	0,0	90,0	7	
	Tubular	61,5	9,8	61,5	54,5	68,4	2	
	Total	41,2	35,4	46,3	0,0	90,0	15	

CAC: carcinoma adenóide cístico; **APBG:** adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade; **Gal-3:** galectina-3; **DP:** desvio padrão; **N:** número de casos da amostra

Para verificar a existência de associação entre as proteínas β -catenina e ciclina D1 nos dois tipos de tumor e entre os subtipos do carcinoma adenóide cístico, foram realizados testes do qui-quadrado ou testes exatos de Fisher quando a amostra não foi suficiente para a realização do teste do qui-quadrado.

A β -catenina foi avaliada quanto à sua marcação ou perda de expressão em membrana celular, bem como a marcação dessa proteína em núcleo e/ou citoplasma. Os resultados da análise estatística mostraram que para a proteína β -catenina não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de tumor estudados ($p > 0,05$).

Analisando-se a marcação imunoistoquímica da ciclina D1, observou-se um número superior de casos positivos (com mais de 5% de núcleos marcados) no carcinoma adenóide cístico quando comparado ao adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e este resultado foi estatisticamente significativo ($p = 0,001$). Os resultados estão ilustrados na tabela 5.5 e nos gráficos 5.2, 5.3 e 5.4.

Tabela 5.5 – Análise estatística da β -catenina e ciclina D1 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Proteína	Categoria	Tumor				Total	P
		CAC		APBG			
		n	%	n	%		
β-catenina	Não marca	0	0,0	3	100,0	3	0, 224*
Núcleo/Citoplasma	Marca	15	55,6	12	44,4	27	
β-catenina membrana	Sem perda de expressão	8	66,7	4	33,3	12	0, 136
	Perda de expressão	7	38,9	11	61,1	18	
Ciclina D1	< 5% de núcleos marcados	5	26,3	14	73,7	19	0, 001
	> 5% de núcleos marcados	10	90,9	1	9,1	11	
Total		15	50,0	15	50,0	30	

* Teste exato de Fisher

Gráfico 5.2 – Marcação da β -catenina em núcleo/citoplasma no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Gráfico 5.3 – Marcação da β -catenina em membrana no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Gráfico 5.4 – Marcação da ciclina D1 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

A análise estatística para verificar a existência de relação entre a expressão das proteínas estudadas no carcinoma adenóide cístico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau revelou que não houve relação estatisticamente significativa entre a marcação imunoistoquímica da galectina-3 nuclear ou citoplasmática e a perda de expressão em membrana ou marcação nuclear/citoplasmática da β -catenina nas duas lesões (Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8).

Tabela 5.6 – Relação da galectina-3 e da β -catenina em membrana no carcinoma adenóide cístico

Proteína	β-catenina membrana	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
Gal-3	Sem perda de expressão	13,9	12,6	13,9	0,3	30,0	8	0,867
Núcleo	Perda de expressão	9,9	9,8	6,3	0,6	26,5	7	
(absoluto)	Total	12,0	11,2	6,3	0,3	30,0	15	
Gal-3	Sem perda de expressão	16,1	22,5	7,2	0,0	65,0	8	0,694
Citoplasma	Perda de expressão	12,2	25,7	1,0	0,0	70,0	7	
(absoluto)	Total	14,3	23,2	4,0	0,0	70,0	15	
Gal-3	Sem perda de expressão	56,8	29,0	49,6	22,4	100,0	8	0,867
Núcleo	Perda de expressão	61,1	43,9	87,5	10,0	100,0	7	
(relativo)	Total	58,8	35,4	53,7	10,0	100,0	15	
Gal-3	Sem perda de expressão	43,2	29,0	50,4	0,0	77,6	8	0,867
Citoplasma	Perda de expressão	38,9	43,9	12,5	0,0	90,0	7	
(relativo)	Total	41,2	35,4	46,3	0,0	90,0	15	

Tabela 5.7 – Relação da galectina-3 e da β -catenina em membrana no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Proteína	β-catenina membrana	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
Gal-3	Sem perda de expressão	13,8	11,8	10,0	5,0	30,0	4	0,343
Núcleo	Perda de expressão	9,5	8,8	7,6	1,5	28,0	11	
(absoluto)	Total	10,6	9,4	7,6	1,5	30,0	15	
Gal-3	Sem perda de expressão	83,0	11,6	87,5	66,0	91,0	4	0,661
Citoplasma	Perda de expressão	81,5	11,6	87,0	58,0	92,0	11	
(absoluto)	Total	81,9	11,2	87,0	58,0	92,0	15	
Gal-3	Sem perda de expressão	14,2	12,3	10,1	5,2	31,3	4	0,412
Núcleo	Perda de expressão	10,2	9,4	8,0	1,7	31,1	11	
(relativo)	Total	11,2	10,0	8,0	1,7	31,3	15	
Gal-3	Sem perda de expressão	85,8	12,3	89,9	68,8	94,8	4	0,412
Citoplasma	Perda de expressão	89,8	9,4	92,1	68,9	98,3	11	
(relativo)	Total	88,8	9,9	92,1	68,8	98,3	15	

Tabela 5.8 – Relação da galectina-3 e da β -catenina em núcleo e/ou citoplasma no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Proteína	β -catenina Núcleo/Citoplasma	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
Gal-3	Não marca	13,0	9,2	15,0	3,0	21,0	3	0,536
Núcleo	Marca	10,1	9,8	6,3	1,5	30,0	12	
(absoluto)	Total	10,6	9,4	7,6	1,5	30,0	15	
Gal-3	Não marca	81,0	5,6	80,0	76,0	87,0	3	0,365
Citoplasma	Marca	82,1	12,4	87,5	58,0	92,0	12	
(absoluto)	Total	81,9	11,2	87,0	58,0	92,0	15	
Gal-3	Não marca	13,6	9,4	15,8	3,3	21,6	3	0,448
Núcleo	Marca	10,7	10,4	6,6	1,7	31,3	12	
(relativo)	Total	11,2	10,0	8,0	1,7	31,3	15	
Gal-3	Não marca	86,4	9,4	84,2	78,4	96,7	3	0,448
Citoplasma	Marca	89,3	10,4	93,4	68,8	98,3	12	
(relativo)	Total	88,8	9,9	92,1	68,8	98,3	15	

Quando se analisou a existência de relação entre a marcação absoluta da galectina-3 nuclear ou citoplasmática e a marcação da ciclina D1 no carcinoma adenóide cístico, verificou-se que houve uma menor marcação absoluta tanto nuclear quanto citoplasmática da galectina-3 naqueles casos considerados negativos para a ciclina D1, ou seja, que apresentaram menos de 5% de núcleos marcados para essa proteína ($p=0,028$).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da galectina-3 e da ciclina D1 no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.

Esses resultados estão demonstrados nas tabelas 5.9 e 5.10 e no gráfico 5.5.

Tabela 5.9 – Relação da galectina-3 e da ciclina D1 no carcinoma adenóide cístico

Proteína	Ciclina D1	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Gal-3	< 5% de núcleos marcados	3,3	4,0	1,0	0,3	9,4	5	0,028
Núcleo	> 5% de núcleos marcados	16,4	11,2	21,0	0,6	30,0	10	
(absoluto)	Total	12,0	11,2	6,3	0,3	30,0	15	
Gal-3	< 5% de núcleos marcados	1,9	4,0	0,0	0,0	9,0	5	0,028
Citoplasma	> 5% de núcleos marcados	20,5	26,5	7,5	0,0	70,0	10	
(absoluto)	Total	14,3	23,2	4,0	0,0	70,0	15	
Gal-3	< 5% de núcleos marcados	70,6	41,9	100,0	10,0	100,0	5	0,371
Núcleo	> 5% de núcleos marcados	52,9	32,4	49,6	11,5	100,0	10	
(relativo)	Total	58,8	35,4	53,7	10,0	100,0	15	
Gal-3	< 5% de núcleos marcados	29,4	41,9	0,0	0,0	90,0	5	0,371
Citoplasma	> 5% de núcleos marcados	47,1	32,4	50,4	0,0	88,5	10	
(relativo)	Total	41,2	35,4	46,3	0,0	90,0	15	

Tabela 5.10 – Relação da galectina-3 e da ciclina D1 no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Proteína	Ciclina D1	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Gal-3	< 5% de núcleos marcados	11,2	9,5	7,8	1,5	30,0	14	0,533
Núcleo	> 5% de núcleos marcados	3,0	#	3,0	3,0	3,0	1	
(absoluto)	Total	10,6	9,4	7,6	1,5	30,0	15	
Gal-3	< 5% de núcleos marcados	81,5	11,5	87,0	58,0	92,0	14	>0,999
Citoplasma	> 5% de núcleos marcados	87,0	#	87,0	87,0	87,0	1	
(absoluto)	Total	81,9	11,2	87,0	58,0	92,0	15	
Gal-3	< 5% de núcleos marcados	11,8	10,1	8,0	1,7	31,3	14	0,533
Núcleo	> 5% de núcleos marcados	3,3	#	3,3	3,3	3,3	1	
(relativo)	Total	11,2	10,0	8,0	1,7	31,3	15	
Gal-3	< 5% de núcleos marcados	88,2	10,1	92,0	68,8	98,3	14	0,533
Citoplasma	> 5% de núcleos marcados	96,7	#	96,7	96,7	96,7	1	
(relativo)	Total	88,8	9,9	92,1	68,8	98,3	15

Gráfico 5.5 – Comparação da marcação nuclear e citoplasmática da galectina-3 com a marcação da ciclina D1 no carcinoma adenóide cístico

As tabelas 5.11, 5.12 e 5.13 mostram que não houve relação entre a marcação da β -catenina em membrana, núcleo e/ou citoplasma quando comparada à marcação da ciclina D1 nas duas lesões.

Tabela 5.11 – Associação da β -catenina em membrana e da Ciclina D1 no carcinoma adenóide cístico

β-catenina membrana	Ciclina D1				Total	p
	< 5% de núcleos marcados		> 5% de núcleos marcados			
	n	%	n	%		
Sem perda de expressão	2	25,0	6	75,0	8	0,608*
Perda de expressão	3	42,9	4	57,1	7	
Total	5	33,3	10	66,7	15	

* Resultado do teste exato de Fisher

Tabela 5.12 – Associação da β -catenina no núcleo/citoplasma e da Ciclina D1 no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

β -catenina Núcleo/Citoplasma	Ciclina D1				Total	p
	< 5% de núcleos marcados		> 5% de núcleos marcados			
	n	%	n	%		
Não marca	2	66,7	1	33,3	3	0,200*
Marca	12	100,0	0	0,0	12	
Total	14	93,3	1	6,7	15	

* Resultado do teste exato de Fisher

Tabela 5.13 – Associação da β -catenina na membrana e da Ciclina D1 no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

β-catenina membrana	Ciclina D1				Total	p
	< 5% de núcleos marcados		> 5% de núcleos marcados			
	n	%	N	%		
Sem perda de expressão	4	100,0	0	0,0	4	>0,999*
Perda de expressão	10	90,9	1	9,1	11	
Total	14	93,3	1	6,7	15	

* Resultado do teste exato de Fisher

A análise estatística mostrou ainda que não houve associação entre a perda de expressão em membrana da β -catenina ($p = 0,252$) e a marcação

imunoistoquímica da proteína ciclina D1 ($p = 0,171$) entre os subtipos histológicos do carcinoma adenóide cístico (Tabela 5.14).

Tabela 5.14 – Teste de associação da perda de expressão em membrana da β -catenina e da marcação imunoistoquímica da ciclina D1 nos subtipos histológicos do carcinoma adenóide cístico

Proteína	Categoria	Subtipo						Total	p
		Sólido		Cribriforme		Tubular			
		n	%	n	%	n	%		
B Catenina membrana	Sem perda de expressão	2	25,0	4	50,0	2	25,0	8	0,252
	Perda de expressão	4	57,1	3	42,9	0	0,0	7	
Ciclina D1	< 5% de núcleos marcados	1	20,0	4	80,0	0	0,0	5	0,171
	> 5% de núcleos marcados	5	50,0	3	30,0	2	20,0	10	
Total		6	40,0	7	46,7	2	13,3	15	

6 DISCUSSÃO

A galectina-3 é uma proteína predominantemente intracelular, presente em uma grande variedade de tipos celulares e também em vários tipos de tumores, onde pode ser encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma com diferentes funções (BARONDES et al., 1994; LIU; PATTERSON; WANG, 2002).

Segundo Davidson et al. (2002) a galectina-3 fica alternando entre o núcleo e o citoplasma das células e a exportação dessa proteína do núcleo para o citoplasma e a sua importação no núcleo da célula têm sido motivo de muitos estudos. Nakahara et al. (2006) demonstraram que existem pelo menos duas formas pelas quais a galectina-3 é transportada para o núcleo: através de difusão passiva e/ou através de transporte ativo. Entretanto, Davidson et al. (2006) afirmam que existem evidências contrárias à afirmativa de que a galectina-3 se difunde de forma passiva do citoplasma para o núcleo e defendem a idéia de que a passagem dessa proteína para o núcleo ocorre apenas como transporte ativo.

Nesse contexto, algumas proteínas têm sido estudadas como sendo ligantes da galectina-3, dentre elas a β -catenina. Segundo Shimura et al. (2004, 2005), tanto a galectina-3 quanto a β -catenina podem se localizar ora no núcleo, ora no citoplasma da célula, ambas dependentes de fosforilação. A β -catenina fosforilada é degradada no citoplasma e, quando essa proteína não é fosforilada, ela pode se acumular no citoplasma e se unir à galectina-3 também não fosforilada, sendo dessa forma translocadas para o núcleo da célula, onde irão ativar proteínas alvo como a ciclina D1, que interage com vários fatores de transcrição regulando a atividade desses (COQUERET, 2002). Lin et al. (2002) já haviam demonstrado que a

superexpressão da galectina-3 regula alterações nos níveis de expressão de alguns reguladores do ciclo celular, dentre eles a ciclina D1. Como a ciclina D1 é um alvo final da via de sinalização do Wnt, Shimura et al. (2004) pesquisaram também a proteína β -catenina, um componente da via de sinalização do Wnt, e sugeriram que essa proteína faz um complexo com a galectina-3, estimulando a ciclina D1.

Dentro da grande variedade de tipos celulares onde a galectina-3 pode estar presente, essa proteína é encontrada no núcleo e no citoplasma das células luminiais dos ductos de glândulas salivares normais. Além disso, sabe-se que a galectina-3 também é expressa em algumas neoplasias malignas de glândulas salivares como adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, carcinoma adenóide cístico e carcinoma ex-adenoma pleomórfico (FERRAZZO et al., 2007; PENNER; FOLPE; BUDNICK, 2002; TEYMOORTASCH et al., 2006; XU et al., 2000).

No presente trabalho, observou-se que, de um modo geral, houve um maior número de células neoplásicas positivas para a galectina-3 nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade, que exibiram marcação predominantemente citoplasmática. Por outro lado, nos carcinomas adenóides císticos estudados essa marcação foi predominantemente nuclear, sendo que em 26,66% dos casos (4 de 15 casos) a marcação foi exclusivamente nuclear. A análise estatística revelou que quando foi comparada a quantidade relativa de núcleos marcados com a galectina-3 nos dois tumores, observou-se que havia uma maior quantidade de núcleos marcados no carcinoma adenóide cístico. Ou seja, os carcinomas adenóides císticos apresentaram um menor número total de células neoplásicas que expressaram a galectina-3 quando comparado ao adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, contudo, essa proteína, quando presente, encontrava-se na maioria dos casos localizada predominantemente no núcleo das células neoplásicas

desse tumor. Levando-se em consideração o comportamento clínico dessas duas neoplasias, esse dado isolado nos sugere que, quando analisadas apenas as células neoplásicas que expressam a galectina-3, o predomínio de marcação nuclear dessa proteína pode estar associado à maior agressividade da lesão.

Neste estudo observou-se que, apesar das duas neoplasias estudadas terem apresentado marcação citoplasmática para a galectina-3, houve maior expressão citoplasmática dessa proteína nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau, tanto em números absolutos quanto em números relativos. Entretanto, alguns casos de carcinoma adenóide cístico apresentaram exclusivamente marcação nuclear para a galectina-3, com total perda da expressão dessa proteína no citoplasma. Ferrazzo et al. (2007) estudando a galectina-3 em carcinomas adenóides císticos e adenocarcinomas polimorfos de baixo grau sugeriram que a marcação citoplasmática da galectina-3 parecia estar associada à diferenciação celular nessas neoplasias. Conhecendo-se o comportamento clínico mais agressivo do carcinoma adenóide cístico e sua grande capacidade de recorrências e metástases à distância, pode-se sugerir que a perda da expressão citoplasmática da galectina-3 está associada à diminuição da diferenciação das células neoplásicas nessas lesões.

Lotz et al. (1993) observaram em carcinomas de cólon uma diminuição total da expressão da galectina-3 associada à perda da expressão dessa proteína no núcleo. De forma semelhante, Califice et al. (2004) e Van den Brüle et al. (2000) associaram a perda da expressão nuclear da galectina-3 à progressão tumoral em carcinomas de próstata e em carcinomas de língua (HONJO et al., 2000). Portanto, os achados do presente trabalho não estão totalmente de acordo com outros trabalhos da literatura, embora neste trabalho também tenha sido verificada uma diminuição total da expressão da galectina-3 nos carcinomas adenóides císticos

comparados aos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau, como relataram Lotz et al. (1993) em carcinomas de cólon.

Ainda em relação à localização citoplasmática e/ou nuclear da galectina-3, Li et al. (2006) advertem que a observação da galectina-3 exclusivamente no citoplasma em determinados tipos celulares não significa obrigatoriamente que essa proteína não tenha entrado no núcleo dessas células em algum momento. Isso pode estar apenas refletindo a situação da célula naquele momento estático, onde os sinais de exportação nuclear da galectina-3 estejam excedendo os sinais de importação nuclear dessa proteína. Dessa forma, fica claro que a condição fisiológica de cada célula em particular é um fator determinante para a localização intracelular da galectina-3.

A proteína ciclina D1 tem sido freqüentemente superexpressa em vários tipos de carcinomas da região de cabeça e pescoço (ANGADI; KRISHNAPILLAI, 2007; CALLENDER et al., 1994; EL-NAGGAR; STECK; BATSAKIS, 1995; MOTOKURA; ARNOLD, 1993; NEVES et al., 2004). Greer Jr et al. (2007) avaliaram através de imunohistoquímica a expressão da ciclina D1 em 39 casos de carcinomas adenóides císticos e observaram uma superexpressão dessa proteína (mais de 5% de núcleos de células marcadas) em 90% dos casos (35/39). Os autores sugerem que a superexpressão da ciclina D1 pode contribuir para o crescimento tumoral e potencial invasivo dos carcinomas adenóides císticos. Por outro lado, Yasumatsu et al. (2004) concluíram que a superexpressão isolada da ciclina D1 não está associada ao aumento da proliferação das células neoplásicas nos carcinomas adenóides císticos, não tendo, portanto, nenhum valor prognóstico nessas lesões.

No presente trabalho foi observado um maior número de casos positivos para a proteína ciclina D1 nos carcinomas adenóides císticos (10/15 casos positivos,

correspondendo a 66,66% dos casos), quando comparados aos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade, onde houve apenas um caso considerado positivo para essa proteína (6,66%). Quando foi comparada a marcação da galectina-3 à quantidade de casos considerados positivos e com superexpressão da ciclina D1 nos dois tumores, observou-se que houve uma diferença estatisticamente significativa no carcinoma adenóide cístico. Os casos de carcinoma adenóide cístico que exibiram mais de 5% de células com marcação nuclear para essa proteína, também apresentaram uma maior contagem absoluta de células marcadas com a galectina-3 tanto no núcleo quanto no citoplasma. Da mesma forma, os casos de carcinomas adenóides císticos que apresentaram menos de 5% de células com núcleos marcados com a ciclina D1 também apresentaram uma menor contagem absoluta de células marcadas para a galectina-3. Nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau não foi possível estabelecer nenhuma correlação com diferença estatística significativa entre essas duas proteínas.

Analisando-se juntos os dados observados, pode-se afirmar que nos carcinomas adenóides císticos a maior expressão nuclear da galectina-3 está associada à superexpressão da ciclina D1. Conhecendo-se o papel da ciclina D1 na progressão do ciclo celular, pode-se sugerir que esta proteína está associada à maior proliferação celular e agressividade que essas neoplasias apresentam, principalmente quando comparadas ao adenocarcinoma polimorfo de baixo grau.

A proteína β -catenina foi avaliada quanto à sua marcação citoplasmática e/ou nuclear e também quanto à perda da expressão dessa proteína junto à membrana celular, onde exerce junto com a E-caderina função na adesividade celular. Nas duas neoplasias estudadas houve marcação nuclear e/ou citoplasmática da β -catenina, sem diferença estatisticamente significativa entre elas. Houve perda de

expressão da β -catenina junto à membrana celular em 7/15 casos de carcinoma adenóide cístico e em 11/15 casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Alguns estudos têm demonstrado que a β -catenina quando acumulada no citoplasma é translocada para o núcleo da célula onde forma um complexo com a galectina-3, estimulando a proliferação celular através da ativação da ciclina D1 (SHIMURA et al., 2004, 2005; WEINBERGER et al., 2007). Neste trabalho, embora houvesse intensa marcação nuclear e/ou citoplasmática da β -catenina nas duas neoplasias estudadas, a análise estatística não demonstrou nenhuma correlação entre a marcação nuclear e/ou citoplasmática da β -catenina com a galectina-3 e nem com a ciclina D1. Esses resultados são semelhantes àqueles encontrados por Daa et al. (2005) onde os autores não verificaram nenhuma associação entre o acúmulo nuclear e/ou citoplasmático da β -catenina com a ciclina D1.

Furuse et al. (2006) estudando a expressão da E-caderina e β -catenina em neoplasias de glândulas salivares, relataram que não houve diferença no padrão de marcação dessas proteínas nos carcinomas adenóides císticos e adenocarcinomas polimorfos de baixo grau.

Zhou e Gao (2006) verificaram que houve perda de expressão da β -catenina em membrana celular na maioria dos carcinomas adenóides císticos metastáticos, além de acúmulo citoplasmático dessa proteína e evidência de marcação nuclear. Os autores concluíram que a via do Wnt está ativada nessas lesões e pode exercer um papel central na carcinogênese e metástases dos carcinomas adenóides císticos.

No presente estudo, apesar de não ter havido relação estatisticamente significativa entre a expressão da β -catenina, ciclina D1 e galectina-3, é importante

observarmos que tanto os carcinomas adenóides císticos quanto os adenocarcinomas polimorfos de baixo grau estudados apresentaram acúmulo citoplasmático da β -catenina e evidência de marcação nuclear dessa proteína. Analisando-se os trabalhos da literatura juntamente com os resultados do presente trabalho, podemos sugerir que a β -catenina pode exercer algum papel no mecanismo de carcinogênese dessas duas lesões, porém ela não participa da ativação da ciclina D1 juntamente com a galectina-3 como foi proposto por alguns autores já citados anteriormente. Além disso, observou-se perda de expressão da β -catenina junto à membrana celular no carcinoma adenóide cístico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau sem diferença estatisticamente significativa. Como o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau é uma lesão que, ao contrário do carcinoma adenóide cístico, raramente apresenta metástases à distância, a perda de expressão da β -catenina em membrana celular não parece exercer um papel tão importante nas metástases como sugeriram Zhou e Gao (2006).

Não foi possível estabelecer nenhuma relação entre o padrão de marcação de nenhuma das proteínas estudadas com os subtipos histológicos do carcinoma adenóide cístico, possivelmente devido ao número reduzido de casos na amostra.

Apesar de se saber que a galectina-3 está envolvida em vários eventos celulares como diferenciação celular, resistência à apoptose, progressão tumoral e metástase em diferentes neoplasias, não existe um consenso na literatura quanto aos efeitos biológicos da marcação nuclear e citoplasmática da galectina-3, nem tampouco quanto ao mecanismo exato pelo qual essa proteína atua nesses eventos. Os resultados da literatura são interessantes, porém conflitantes e o somatório dos diversos estudos sobre a galectina-3 relatados na literatura poderão elucidar sobre o papel dessa importante proteína na carcinogênese e com isso contribuir para o

estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e quem sabe tratamento de algumas neoplasias.

7 CONCLUSÕES

Nas neoplasias de glândulas salivares estudadas, carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, a expressão da proteína galectina-3 parece estar relacionada à diferenciação celular no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, e pode exercer uma função de proliferação celular no carcinoma adenóide cístico, levando as células à proliferação pela ativação da ciclina D1. Além disso, a perda da expressão citoplasmática da galectina-3 nessas neoplasias pode estar relacionada a uma menor diferenciação celular das células neoplásicas.

A β -catenina parece exercer algum papel na carcinogênese dessas lesões, mas não faz complexo com a galectina-3 para ativar a proteína ciclina D1.

REFERÊNCIAS¹

Agresti A. Categorical data analysis. New York: Wiley; 1990.

Angadi PV, Krishnapillai R. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: correlation with histological differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:e30-5.

Araujo V, Sousa S, Jaeger M, Jaeger R, Loyola A, Crivelini M, et al. Characterization of the cellular component of polymorphous low-grade adenocarcinoma by immunohistochemistry and electron microscopy. *Oral Oncol* 1999;35:164-72.

Araújo VC, Loducca SVL, Sousa SOM, Williams DM, Araújo NS. The Cribriform Features of Adenoid Cystic Carcinoma and Polymorphous Low-Grade Adenocarcinoma: Cytokeratin and Integrin Expression. *Ann Diagn Pathol* 2001;5:330-4.

Araújo VC, Sousa SOM, Carvalho YR, Araújo NS. Application of immunohistochemistry in the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000;8:195-202.

Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. 1^a ed. Lyon: IARC Press; 2005. cap.5, p. 221-4.

Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994;269:20807-10.

Beltran D, Faquin WC, Gallagher G, August M. Selective Immunohistochemical Comparison of Polymorphous Low-Grade Adenocarcinoma and Adenoid Cystic Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:415-23.

Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000;103:311-20.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Boko E, Napo-Koura G, Kpemissi E, Boko-Bessi L. Tumours of the accessory salivary glands. Epidemiological and anatomopathological aspects. *Rev Laryngol Otol Rhinol* 2004;125:233-7.

Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of intra-oral minor salivary gland tumors: a study of 380 cases from northern California and comparison to reports from other parts of the world. *J Oral Pathol Med* 2007;36:207-14.

Bussab WO, Morettin PA. Estatística básica. 4^a ed. São Paulo: Atual; 1987.

Califice S, Castronovo V, Bracke M, Van Den Brule F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: Tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. *Oncogene* 2004;23:7527-36.

Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. PRAD-1(CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994;74:152-8.

Castronovo V, Van Den Brule FA, Jackers P, Clausse N, Liu FT, Gillet C, et al. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J Pathol* 1996;179:43-8.

Chummun S, Mclean NR, Kelly CG, Dawes PJ, Meikle D, Fellows S, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Br J Plast Surg* 2001;54:476-80.

Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2775-8.

Conover WJ. Practical nonparametric statistics. 2^a ed. New York: Wiley; 1980.

Copelli C, Bianchi B, Ferrari S, Ferri A, Sesenna E. Malignant tumors of intraoral minor salivary glands. *Oral Oncol* 2008;44:658-63.

Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 2002;299:35-55.

Daa T, Kaku N, Kashima K, Nakayama I, Yokoyama S. Expression of beta-catenin, E-cadherin and cyclin D1 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *J Exp Clin Cancer Res* 2005;24(1):83-7.

Darling MR, Schneider JW, Phillips VM. Polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma: a review and comparison of immunohistochemical markers. *Oral Oncol* 2002;38:641-5.

Davidson PJ, Davis MJ, Patterson RJ, Ripoche MA, Poirier F, Wang JL. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology* 2002;12(5):329-37.

Davidson PJ, Li SY, Lohse AG, Vandergaast R, Verde E, Pearson A, et al. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Conditions and signals for nuclear import. *Glycobiology* 2006;16(7):602-11.

Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760(4):616-35.

El-Naggar AK, Steck K, Batsakis JG. Heterogeneity of the proliferative fraction and cyclin D1/CCND1 gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Cytometry* 1995;21:47-51.

Ellis GL, Auclair PL. Tumors of the salivary glands. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1996.

Evans HL, Luna MA. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: a study of 40 cases with long-term follow up and an evaluation of the importance of papillary areas. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1319-28.

Ewen ME, Lamb J. The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis. *Trends in Mol Med* 2004;10(4):158-62.

Fernandez PL, Merino MJ, Gomez M, Campo E, Medina T, Castronovo V, et al. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non neoplastic thyroid tissue. *J Pathol* 1997;181:80-6.

Ferrazzo KL, Alves SM Jr, Santos E, Martins MT, de Sousa SM. Galectin-3 immunoprofile in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma of salivary glands. *Oral Oncol* 2007;43(6):580-5.

Figueiredo CRLV, Sousa SCOM, Araújo VC. Estudo imunohistoquímico do carcinoma adenóide cístico de glândula salivar menor. *Rev Pos Grad* 1997;4:231-7.

Freedman PD, Lumerman H. Lobular carcinoma of intraoral minor salivary gland origin. Report of twelve cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983;56:157-65.

Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, et al. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res* 2003;63:8302-11.

Furuse C, Cury PR, Altemani A, Pinto-Júnior DS, Araújo NS, Araújo VC. β -Catenin and E-Cadherin Expression in Salivary Gland Tumors. *Int J Surg Pathol* 2006;14:212-7.

Furuse C, Sousa SO, Nunes FD, Magalhães MH, Araújo VC. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. *Int J Surg Pathol* 2005;13(1):57-65.

Garden AS, Weber RS, Morrison WH, Ang KK, Peters LJ. The influence of positive margins and nerve invasion in adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated with surgery and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32(3):619-26.

Gillenwater A, Xu XC, El-Naggar AK, Clayman GL, Lotan R. Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1996;18:422-32.

Gnepp DR, Chen JC, Warren C. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary gland: An immunohistochemical and clinicopathologic study. *Am J Surg Pathol* 1988;12:461-8.

Greer Jr RO, Said S, Shroyer KR, Varella-Garcia M, Weed SA. Overexpression of cyclin D1 and cortactin is primarily independent of gene amplification in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncology* 2007;43:735-41

Haddad A, Enepekides D, Manolidis S, Black M. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a clinicopathologic study of 37 cases. *J Otolaryngol* 1995;24(3):201-5.

Hartwell L, Weinert T. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246:629-34.

Honjo Y, Inohara H, Akahani S, Yoshii T, Takenaka Y, Yoshida J, et al. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6(12):4635-40.

Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochem Biophys Acta* 1999;1473:172-85.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994;79:573-82.

Hyam DM, Veness MJ, Morgan GJ. Minor salivary gland carcinoma involving the oral cavity or oropharynx. *Aust Dent J* 2004;49:16-9.

Kasai K, Hirabayashi J. Galectins: a family of animal lectins. *J Biochem* 1996;119:1-8.

Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (Review). *Oncol Rep* 2005;14:1583-8.

Khan AJ, Digiovanna MP, Ross DA, Sasaki CT, Carter K, Son YH, et al. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. *Int J Cancer* 2001;96:149-58.

Kolude B, Lawoyin JO, Akang EE. Salivary gland neoplasms: a 21year review of cases seen at University College Hospital, Ibadan. *Afr J Med Sci* 2001;30:95-8.

Koshland DE Jr. The cell cycle. *Science* 1989;246(4930):545.

Krzeslak A, Lipinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett* 2004;9:305-28.

Li SY, Davidson PJ, Lin NY, Patterson RJ, Wang JL, Arnoys EJ. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. II. Identification of the signal for nuclear export. *Glycobiology*. 2006;16(7):612-22.

Lin H-M, Pestell RG, Raz A, Kim HRC. Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. *Oncogene* 2002;21:8001-10.

Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo J. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992;97:S4-13.

Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572:263-73.

Loducca SVL, Mantesso A, Kapas S, Williams DM, Araújo NS, Araújo VC. Salivary gland tumours: immunoexpression of integrins $\beta 1$, $\beta 3$ and $\beta 4$. *J Oral Pathol Med* 2003;32:305-9.

Loducca SVL, Raitz R, Araújo NS, Araújo VC. Polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma: comparative study of collagen IV, laminin and their integrin ligands ($\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$). *Histopathol* 2000;37:118-23.

Lotz MM, Andrews Jr. CW, Korzelius CA, Lee EC, Steele Jr. GD, Clarke A, et al. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Sci USA* 1993;90:3466-70.

Moon BK, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz AK. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide induced apoptosis. Implication of galectin-3 function during metastasis. *Am J Pathol* 2001;159:1055-60.

Motokura T, Arnold A. Cyclins and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1993;1155:63-78.

Moutsatsos IK, Wade M, Schindler M, Wang JL. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Sci USA* 1987;84:6452-6.

Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 2005;10(2):267-75.

Nakahara S, Oka N, Wang Y, Hogan V, Inohara H, Raz A. Characterization of the nuclear import pathways of galectin-3. *Cancer Res* 2006;15;66(20):9995-10006.

Neter J, Kutner Mh, Nachtsheim Cj, Wasserman W. Applied linear statistical models. 4^a ed. Illinois: Richard D. Irwing; 1996.

Neves AC, Mesquita RA, Novelli MD, Toddai E, Sousa SOM. Comparison between immunohistochemical expression of cyclin D1 and p21 and histological malignancy graduation of oral squamous cell carcinomas. *Braz Dent J* 2004;15:93-8.

Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000;100:71-8.

Nurse P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 1994;79:547-50.

Nurse P. Universal control mechanism in regulating onset of M-phase. *Nature* 1990;344:503-8.

Openo KP, Kadrofske MM, Patterson RJ, Wang JL. Galectin-3 expression and subcellular localization in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 2000;255:278-90.

Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 1989;8:1711-7.

Pacis RA, Pilat MJ, Pienta KJ, Wojno K, Raz A, Hogan V, et al. Decreased galectin-3 expression in prostate cancer. *Prostate* 2000;44:118-23.

Penner CR, Folpe AL, Budnick SD. C-kit expression distinguishes salivary gland adenoid cystic carcinoma from polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2002;15:687-91.

Pires FR, Pringle GA, Almeida OP, Chen SY. Intra-oral minor salivary gland tumors: A clinicopathological study of 546 cases. *Oral Oncol* 2007;43:463-70.

Plzak J, Betka J, Smetana K Jr, Chovanec M, Kaltner H, Andre S, et al. Galectin-3 - an emerging prognostic indicator in advanced head and neck carcinoma. *Eur J Cancer* 2004;40:2324-30.

Polakis P, Hart M, Rubinfeld B. Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol* 1999;470:23-32.

Qureshi SS, Nadkarni MS, Shrikhande SV, Desai S, Deodhar K, Ramadwar M, et al. Hepatic resection for metastasis from adenoid cystic carcinoma of parotid gland. *Indian J Gastroenterol* 2005;24:29-30.

Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Faratzis G, Stavrianos SD, Vilos GA, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Clinicopathological analysis of 23 patients and review of the literature. *Oral Oncol* 2005;41:328-35.

Raux-Rakotomalala F, Houliat T, Martel J, Stoll D, Bebear JP, Darrouzet V. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review of 30 cases. *Rev Laryngol Otol Rhinol* 2003;124:235-41.

Rosa MP, Kanamura CT, Carvalho MB. Expressão de galectina-3 e citoqueratina 19 nas neoplasias epiteliais da glândula tireóidea e correlação histopatológica. *J Bras Patol Med Lab* 2005;41:61-70.

Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149-63.

Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, et al. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res* 2005;65:3535-7.

Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a Novel Binding Partner of β -Catenin. *Cancer Res* 2004;64:6363-7.

Shiratsuchi H, Nakashima T, Hirakawa N, Toh S, Nakagawa T, Saito T, et al. β -catenin nuclear accumulation in head and neck mucoepidermóide carcinoma: its role in cyclin D1 overexpression and tumor progression. *Head Neck* 2007;29:577-84.

Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the β -Catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(10):5522-7.

Spiers ASD, Esseltine DLW, Ruckdeschel JC, Davies JNP, Horton J. Metastatic adenoid cystic carcinoma of salivary glands: case reports and review of the literature. *Cancer Control* 1996;3(4):336-42.

Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim HR, et al. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. *Mol Cell Biol* 2004;24:4395–4406.

Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-6.

Teymoortash A, Pientka A, Schrader C, Tiemann M, Werner JA. Expression of galectin-3 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck and its relationship with distant metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132:51-6.

Tomich CE. Adenoid cystic carcinoma. In: Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR. Surgical pathology of the salivary glands. Philadelphia: WB Saunders; 1991. cap. 19, p. 333-49.

Van den Brle FA, Waltregny D, Liu FT, Castronovo V. Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression. *Int J Cancer* 2000;89(4):361-7.

Waldron CA, El-Mofty SK, Gnepp DR. Tumors of the intraoral minor salivary glands: a demographic and histologic study of 426 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;66(3):323-33.

Weinberger PM, Adam B-L, Gourin CG, Moretz III WH, Bollag RJ, Wang BY, et al. Association of Nuclear, Cytoplasmic Expression of Galectin-3 With β -Catenin/Wnt-Pathway Activation in Thyroid Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;133:503-10

Wilson NW, Pambakian H, Richardson TC, Stokoe MR, Makin CA, Heyderman E. Epithelial markers in thyroid carcinoma: an immunoperoxidase study. *Histopathology* 1986;10:815-29.

Xu XC, Sola Gallego JJ, Lotan R, El-Naggar AK. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in benign and malignant salivary gland neoplasms. *Int J Oncol* 2000;17:271-6

Yamamoto Y, Wistuba II, Kishimoto Y, Virmani AK, Vuitch F, Albores-Saavedra J, et al. DNA analysis at p53 locus in adenoid cystic carcinoma: comparison of molecular study and p53 immunostaining. *Pathol Int* 1998;48(4):273-80.

Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6737-42.

Yasumatsu R, Kuratomi Y, Nakashima T, Masuda M, Yamamoto T. Cyclin D1 expression does not effect cell proliferation in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004;261:526-30.

Zhou CX, Gao Y. Aberrant expression of β -catenin, Pin1 and cyclin D1 in salivary adenoid cystic carcinoma: Relation to tumor proliferation and metastasis. *Oncol Rep* 2006;16:505-11.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 150/07**

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA NUCLEAR E CITOPLASMÁTICA DA GALECTINA-3 E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DA β -CATENINA E CICLINA D1 EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES"**, de responsabilidade da Pesquisadora **KÍVIA LINHARES FERRAZZO**, sob orientação da Professora Doutora **SUZANA ORSINI MACHADO DE SOUSA**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 09 de novembro de 2007

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP