

ESTUDO DA EXPRESSÃO DE BETA-CATENINA E GALECTINA-3 EM DISPLASIAS E CARCINOMAS INDUZIDOS EXPERIMENTALMENTE EM LÍNGUA DE CAMUNDONGOS WILD-TYPE E KNOCKOUT PARA O GENE DA GALECTINA-3

¹JULIANA MOREIRA DE ALMEIDA SANT'ANA, ²DANIELLA FERNANDES MENDONÇA, ³ROGER CHAMMAS, ⁴SUELY NONOGAKI, ⁵SÉRGIO VITORINO CARDOSO, ⁶ADRIANO MOTA LOYOLA, ⁷PAULO ROGÉRIO DE FARIA

1 – Faculdade de Medicina, Curso de Enfermagem, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará 1720, bloco 2U, CEP: 38405-320, Uberlândia (MG); e-mail: bhjuliana@yahoo.com.br

2 – Faculdade de Medicina, Curso de Enfermagem, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará 1720, bloco 2U, CEP: 38405-320, Uberlândia (MG); e-mail: danyfeme@yahoo.com.br

3 – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo 455, sala 4112, CEP: 01246-903, São Paulo (SP); e-mail: rchammas@lim24.fm.usp.br

4 - Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Patologia Quantitativa e Molecular, São Paulo, Brasil

5 – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará 1720, bloco HC, CEP: 38405-320, Uberlândia (MG); e-mail: cardososv@gmail.com

6 – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará 1720, bloco HC, CEP: 38405-320, Uberlândia (MG); e-mail: loyolaam@yahoo.com.br

7 – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Avenida Pará 1720, Laboratório de Histologia, bloco 2B, CEP: 38400-902, Uberlândia (MG). Autor Correspondente; e-mail: paulorfaria@icbim.ufu.br

RESUMO

Galectina-3 (GAL3) é uma lectina que apresenta importantes papéis na biologia tumoral e recentemente tem sido associada com a via de sinalização Wnt, auxiliando a beta-catenina na translocação ao núcleo. Alterada expressão de GAL3 e beta-catenina tem sido descrita em muitos cânceres, mas não em modelos de carcinogênese bucal em animais modificados geneticamente. Objetivo é estudar o processo de carcinogênese bucal em camundongos selvagens (GAL3^{+/+}) e nocautes (GAL3^{-/-}) para GAL3 bem como a expressão de GAL3 e beta-catenina em lesões displásicas e carcinomas desenvolvidos nas línguas desses animais. Vinte camundongos C57BL/6, machos, GAL3^{+/+} e GAL3^{-/-} foram desafiados com 4NQO na água de beber por 16 semanas e sacrificados na semana 16 e 32. Após o sacrifício, as línguas foram removidas, processadas, coradas por H&E para detecção de displasias e carcinomas. Ensaio imuno-histoquímico para detecção do antígeno GAL3 e beta-catenina foi realizado. Carcinogênese bucal foi mais evidente nos camundongos GAL3^{+/+}, com 55,5% deles acometidos por carcinomas contra 28,5% no grupo GAL3^{-/-} ao final do experimento. Um predomínio de beta-catenina não membranosa em displasias e carcinomas foi observado em ambos os grupos (p>0,05). Um predomínio de expressão de GAL3 citoplasmática foi observado displasias e carcinomas de camundongos GAL3^{+/+} (p>0,05). No entanto, um aumento de GAL3 nuclear foi observado na evolução de displasias para carcinomas de animais GAL3^{+/+} (p<0,05). Nenhuma correlação foi encontrada entre beta-catenina e GAL3. Carcinogênese bucal foi mais evidente em camundongos GAL3^{+/+} e a ausência de GAL3 parece não interferir na mediação da via de sinalização Wnt em camundongos GAL3^{-/-}.

ABSTRACT

Galectin-3 (GAL3) is a lectin that presents pivotal roles in the tumor biology. It has been associated with Wnt pathway, translocating the beta-catenin from cytoplasm to the nucleus. Altered GAL3 and beta-catenin expression have been described in many cancers, but not in dysplasias and carcinomas developed from mouse model of oral carcinogenesis. The goals of this report are to study the carcinogenesis process using a mouse model of oral carcinogenesis. In addition, GAL3 and beta-catenin expression in dysplasias and carcinomas was evaluated too. Twenty GAL3-deficient (GAL3^{-/-}) and wild-type (GAL3^{+/+}) male mice were challenged with 4NQO in drinking water for 16 weeks and killed at week 16 and 32. Tongues were removed, routinely processed, and stained with Hematoxylin & Eosin to detect dysplasias and carcinomas microscopically. An immunohistochemical assay was performed to detect GAL3 and beta-catenin in dysplasias and carcinomas of the both groups. Oral

carcinogenesis was more evident in GAL3^{+/+} than GAL3^{-/-} mice, with 55.5% and 28.5% of them affected by carcinomas, respectively ($p > 0.05$). Elevated expression of non-membranous beta-catenin was observed in dysplasias and carcinomas in both groups ($p > 0.05$). High cytoplasmic GAL3 expression was observed in dysplasias and carcinomas of gal3^{+/+} mice ($p < 0.05$). However, nuclear expression of GAL3 increased from dysplasias to carcinomas ($p = 0.04$). Neither nuclear nor cytoplasmic expression of galectin-3 was correlated with non-membranous/membranous beta-catenin expression. In conclusion, oral carcinogenesis was more evident in GAL3^{+/+} and absence of GAL3 seems not to be an important factor to trigger the Wnt pathway in GAL3^{-/-} mice.

PALAVRAS CHAVE: carcinogênese bucal, imunohistoquímica, galectina-3, beta-catenina, língua, camundongos.

INTRODUÇÃO

Dentre os tipos de neoplasias malignas que mais frequentemente acometem o ser humano, o carcinoma epidermóide de cavidade bucal é um dos mais prevalentes no mundo.^{8,18} Dados recentes têm mostrado que cerca de 390 mil novos casos de câncer de boca são diagnosticados anualmente em todo o mundo.^{8,18} No Brasil, a incidência estimada de casos novos em 2006 foi 13.470, colocando-o entre os seis mais frequentes tipos de neoplasias malignas no país.¹⁸ O aparecimento desse tipo de câncer está relacionado ao uso abusivo de tabaco e bebidas alcoólicas e, na maioria dos casos, apresenta um pobre prognóstico e uma alta taxa de mortalidade.^{9,17} Diante desse quadro alarmante, estudos que permitam compreender os mecanismos moleculares envolvidos no processo de desenvolvimento desse tipo de neoplasia se faz necessário. Nesse sentido, o uso de modelos de animais tem se tornado promissor, em especial modelos que utilizam animais modificados geneticamente, pois permitem analisar o papel de proteínas específicas no desenvolvimento dessas doenças.

Galectinas (GALs) são membros da família de lectinas de animais com afinidade para resíduos de beta-galactosídeos de superfície celular através de um domínio de reconhecimento de carboidrato de cerca de 130 aminoácidos altamente conservado na natureza.^{19,20,32} Há 15 tipos de galectinas reconhecidas e a galectina-3 (GAL3) é uma das mais estudadas. A GAL3 é uma proteína de 30 a 35kDa, cujo gene está localizado no cromossomo 14q21-22.^{8,20,25,32} A GAL3 está envolvida em diferentes processos fisiológicos e patofisiológicos, incluindo aqueles associados ao desenvolvimento de neoplasias malignas, em especial na transformação

neoplásica, progressão tumoral e metástase.^{4,5,6,18} Trabalho realizado recentemente concluiu que a ausência de GAL3 retarda o processo de carcinogênese em língua de camundongos knockout para GAL3 (GAL3^{-/-}), indicando que ela atua diretamente na formação de neoplasia bucal *in vivo*.⁹ Contudo, os resultados da literatura são ainda muito contraditórios e pouco se conhece sobre os mecanismos pelos quais a GAL3 exerce essas funções.

Assim como a GAL3, genes pertencentes à via de sinalização Wnt (*APC*, *CTNNB1*, *AXINA* e *GSK-3β*) contribuem para o aparecimento das neoplasias, incluindo os cânceres de boca.^{34,42} Estudos recentes têm mostrado que essa via de sinalização está alterada durante a tumorigênese, o que parece ser reflexo das diferentes funções exercidas pela beta-catenina, bem como pela sua localização no citoplasma, que ocorre quando há mutações no gene APC, GSK-3β, AXINA ou beta-catenina, onde contém o sítio de fosforilação da GSK-3β.^{34,42} Assim, componentes da via de sinalização Wnt têm sido relatados contribuir para gênese de diferentes neoplasias como carcinoma hepatocelular, meduloblastoma, melanoma, câncer de ovário, próstata, pâncreas, de cólon e em tumores de glândulas salivares.^{5,10,12} Além disso, recentemente foi demonstrado que a GAL3 participa da via de sinalização Wnt interagindo com beta-catenina para promover a ativação transcricional dos genes da ciclina D1 e c-Myc.^{36,37} Contudo, nenhum estudo ainda demonstrou se GAL3 e a beta-catenina estão associadas ao desenvolvimento de carcinomas de cabeça e pescoço.

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de carcinogênese bucal em camundongos selvagem (GAL3^{+/+}) e nocautes para GAL3 (GAL3^{-/-}) desafiados com o carcinógeno 4-nitroquinolona-1-óxido (4NQO). Além disso, estudamos a expressão por imuno-histoquímica de GAL3 em amostras de lesões displásicas e carcinomas que se desenvolveram somente em camundongos GAL3^{+/+} e de beta-catenina nas mesmas lesões, mas em ambos os grupos de camundongos no sentido de procurarmos desvendar uma possível correlação entre essas duas moléculas na carcinogênese bucal.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Camundongos GAL3^{-/-} gerados através de recombinação homóloga e cruzados com camundongos da linhagem C57BL/6 foram gentilmente cedidos pelo grupo do Hsu para esse experimento.¹⁴ Vinte camundongos GAL3^{-/-}, machos, de seis a oito semanas de idade, e pesando entre 20 e 23g, foram usados nesse estudo. Da mesma forma, vinte camundongos selvagens (GAL3^{+/+}) da mesma linhagem e pareados quanto à idade e peso foram usados

como controle. Os camundongos $GAL3^{-/-}$ e $GAL3^{+/+}$ foram divididos em dois grupos de acordo com o período de sacrifício, como segue: semana 16, imediatamente após o término do tratamento com o 4-NQO ($GAL3^{-/-}$ $n=10$ e $GAL3^{+/+}$ $n=10$) e semana 32, 16 semanas após o término do tratamento ($GAL3^{-/-}$ $n=10$ e $GAL3^{+/+}$ $n=10$). Todos os camundongos foram colocados em gaiolas de plástico forradas com serragem e mantidos em temperatura de 22°C, ciclo claro/escuro de 12/12h e alimentados com ração específica *ad libitum*.

Protocolo de Experimentação

O tratamento com o 4NQO foi baseado no protocolo descrito por Tang et al (2004). O carcinógeno 4NQO foi previamente diluído em propilenoglicol na concentração de 5mg/mL e, em seguida, em água filtrada até atingir a concentração de 100 µg/ml. Essa solução foi administrada por um período máximo de 16 semanas ininterruptas em ambos os grupos de camundongos. Durante todo o período de tratamento, a solução de 4NQO foi preparada e trocada semanalmente nos frascos de beber dos camundongos. Ao final de 16 semanas, o tratamento foi interrompido e os animais passaram a beber apenas água filtrada, exceto os grupos de camundongos $GAL3^{-/-}$ e $GAL3^{+/+}$ da semana 16, os quais foram sacrificados imediatamente após o término do tratamento. Os outros dois grupos de camundongos $GAL3^{-/-}$ e $GAL3^{+/+}$ da semana 32 receberam água filtrada por mais 16 semanas até o tempo de sacrifício.

Exame Microscópico das Línguas

Após anestesia profunda com éter etílico, seguida de deslocamento cervical, os camundongos foram autopsiados, as línguas removidas e imediatamente fixadas em formalina tamponada a 4% por 24 h. Após esse período, realizou-se o estudo macroscópico das línguas para contagem do número de alterações presentes na superfície lingual. Dado sobre localização (região dorsal, ventral e lateral), tamanho ($\leq 1,0$, $>1,0$ e $\leq 1,5$, $>1,5$ e $\leq 2,0$, $>2,0$) e número de alterações linguais foram devidamente coletadas. Para estudo microscópico, as línguas foram previamente cortadas transversalmente em cinco fragmentos, os quais foram rotineiramente processados e incluídos em parafina. Na presença de uma alteração em superfície lingual, procurou-se representar da melhor forma possível tal alteração para estudo microscópico, além dos outros fragmentos da mesma língua. Cortes de 5µm de espessura foram coradas pela Hematoxilina e Eosina (H&E) para a análise microscópica. Para diagnóstico e classificação das displasias e carcinomas, foram usados os critérios estabelecidos por Lumerman et al (1995) e Barnes et al. 2006 (OMS), respectivamente.²

Imuno-histoquímica

As proteínas beta-catenina e GAL3 foram identificadas por imuno-histoquímica através do método estreptavidina-biotina-peroxidase. Cortes histológicos de 3µm de espessura foram previamente montados em lâminas silanizadas com organossilano (SIGMA Chemical Co, St Louis, MO, USA). Após desparafinização e desidratação, seguiu-se a recuperação dos epitopos antigênicos em solução tampão de EDTA, 1mM, pH 8.0 em microondas. Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 10V e da biotina endógena (DAKO Co, Carpenteria, USA). Por fim, os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-beta-catenina e anti-GAL3 (TIB 166, hÍbridoma, da American Type Culture Collection e gentilmente cedido pelo Roger Chammas) overnight a 4°C, em câmara úmida. Após lavagem em PBS, deu-se a incubação com anticorpos secundários específicos para cada anticorpo primário. A revelação da reação foi feita o 3' 3'-diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAKO Co, Carpenteria, USA) e os cortes contracorados com Hematoxilina de Harris. Como controle positivo para beta-catenina e GAL3, utilizou-se amostra de tonsila palatina para cada reação. Para controle negativo das reações, os anticorpos primários foram substituídos pela solução diluente dos mesmos. Os anticorpos primários e secundários a serem utilizados na imuno-histoquímica serão definidos em momento apropriado.

Avaliação da Imuno-histoquímica

Para avaliar a expressão de GAL3 e beta-catenina, estabeleceu-se como índice de positividade para beta-catenina (IβCAT) e GAL3 (IGAL3) como a relação entre o número de células marcadas e o número total de células contadas nas áreas de displasias e carcinomas. Para a beta-catenina, considerou-se a sua localização em membrana (padrão membranosos-IβCATm) e núcleo/citoplasma (padrão não membranosos-IβCATnm). Para GAL3 (IGAL3), considerou-se a sua localização em núcleo (IGAL3n) e citoplasma (IGAL3c).

Análise Estatística

Para avaliar a frequência de displasias e carcinomas entre os camundongos GAL3^{+/+} e GAL3^{-/-} entre a semana 16 e 32 utilizou-se Teste Exato de Fisher. Para avaliar a média dos índices de positividade entre beta-catenina (não membrana e membranosos) e GAL3 (nuclear e citoplasmática), utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Por fim, para determinar se a expressão de GAL3 está associada com a ativação da via de sinalização Wnt, procurou-se estabelecer uma correlação entre beta-catenina não membranosos e membranosos e GAL3 nuclear e citoplasmática em carcinomas de camundongos GAL3^{+/+}. Para isso, utilizou-se o teste de Correlação de Spearman. Os valores foram expressão na forma de médias ± desvio padrão. Um p<0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Ao final do experimento, dois camundongos do grupo GAL3^{+/+} morreram, sendo um da semana 16 e outro da semana 32. Já no grupo GAL3^{-/-}, seis camundongos morreram, sendo dois da semana 16 e quatro da semana 32.

Avaliação Macroscópica

Ao final do experimento, o número de animais acometidos por alterações linguais aumentou em ambos os grupos, em especial no grupo GAL3^{+/+} da semana 32, em que 100% dos camundongos desenvolveram alterações em língua. Da mesma forma, o número de alterações também aumentou em ambos os grupos entre a semana 16 e 32, embora esse incremento tenha sido maior no grupo GAL3^{+/+} da semana 32 (sete vezes) do que no grupo GAL3^{-/-} (duas vezes) de mesma semana. Em relação à localização, tanto no grupo GAL3^{+/+} quanto no grupo GAL3^{-/-}, o local mais acometido foi à superfície dorsal, sendo 18 lesões no Grupo GAL3^{+/+} e 10 no grupo GAL3^{-/-}, seguido pelas superfícies ventral (oito vs seis, respectivamente) e lateral (sete vs quatro, respectivamente). Esses dados podem ser visualizados na Tabela 1.

TABELA 1 – Número e localização das alterações em superfície lingual de camundongos GAL3^{-/-} e GAL3^{+/+} nos diferentes períodos de observação.

Grupos	Nº de Animais Acometidos (%)	Nº Total de Alterações Macroscópicas	Regiões da Língua		
			Dorsal	Lateral	Ventral
GAL3 ^{+/+}			18	7	8
	GAL3 ^{+/+} ₁₆	3(33,3)	4		
	GAL3 ^{+/+} ₃₂	9(100)	29		
GAL3 ^{-/-}			10	4	6
	GAL3 ^{-/-} ₁₆	5(62,5)	6		
	GAL3 ^{-/-} ₃₂	6(83,3)	14		

O tamanho das lesões variou em ambos os grupos. Alterações grandes em superfície lingual (>1,5mm) foram encontradas tanto nos animais GAL3^{+/+} quanto GAL3^{-/-}. Contudo, o número de alterações linguais >1,5mm foi proporcionalmente maior no grupo GAL3^{+/+} (11 alterações) do que no grupo GAL3^{-/-} (seis alterações) da semana 32. Além disso, o número de alterações linguais menores ou iguais a 1,0mm foram mais evidentes nos camundongos GAL3^{+/+} (20 alterações) do que nos camundongos GAL3^{-/-} (11 alterações). Esses dados podem ser visualizados na Tabela 2.

TABELA 2 - Distribuição das alterações linguais segundo suas dimensões em camundongos GAL3^{-/-} e GAL3^{+/+} de acordo com o período de observação.

Subgrupos	Tamanho das Alterações em Língua em mm				
	Total de lesões	≤1,0	>1,0 e ≤1,5	>1,5 e ≤2,0	>2,0
GAL3 ^{+/+} ₁₆	4	3	1	0	0
GAL3 ^{+/+} ₃₂	29	17	1	6	5
GAL3 ^{-/-} ₁₆	6	4	1	1	0
GAL3 ^{-/-} ₃₂	14	7	2	3	2

Avaliação Microscópica

Pôde-se observar que em ambos os grupos o processo de carcinogênese bucal ocorreu, visto que lesões displásicas e carcinomas foram encontrados tanto no grupo GAL3^{+/+} quanto no grupo GAL3^{-/-}. Ao final do experimento, 10 camundongos GAL3^{+/+} (55,5%) e quatro camundongos GAL3^{-/-} (28,55) foram diagnosticados com carcinoma. Em ambos os grupos, o número de animais acometidos por displasia diminuiu e o de carcinoma aumentou entre a semana 16 e 32, embora esse aumento tenha sido maior no grupo GAL3^{+/+} da semana 32. Nesse caso, 88,9% dos camundongos desenvolveram tumor, ao passo que 50% dos animais

GAL3^{-/-} foram diagnosticados com o mesmo tumor (Tabela 3). Contudo, não houve uma diferença estatisticamente significativa em relação ao número de displasias e carcinomas entre os grupos GAL3^{+/+} e GAL3^{-/-} nos diferentes períodos de observação (p>0.05).

TABELA 3 – Número de displasias e carcinomas diagnosticado na língua de camundongos GAL3^{+/+} e GAL3^{-/-} de acordo com o período de observação.

Grupos	Ausência de Alterações	Displasia	Carcinoma
GAL3 ^{+/+} ₁₆	1	6	2
GAL3 ^{+/+} ₃₂	0	1	8
GAL3 ^{-/-} ₁₆	0	7	1
GAL3 ^{-/-} ₃₂	0	3	3

Imuno-histoquímica

A média de positividade para beta-catenina não membranosa nas displasias dos grupos GAL3^{-/-} e GAL3^{+/+} foi de $58 \pm 30,9\%$ e $48 \pm 24,9\%$, respectivamente. Por outro lado, a média de positividade para beta-catenina membranosa nessas mesmas lesões nos grupos GAL3^{-/-} e GAL3^{+/+} foi de $4 \pm 5,2\%$ e $4,3 \pm 6,6\%$, respectivamente. Em relação aos carcinomas, a média de positividade para beta-catenina não membranosa foi de $44,7 \pm 28,4\%$ para as lesões que se desenvolveram no grupo GAL3^{-/-} e $58,7 \pm 24,9\%$ para aquelas lesões diagnosticadas no grupo GAL3^{+/+}. De forma semelhante ao observado nas lesões displásicas, a expressão de beta-catenina membranosa nessas mesmas lesões foi baixa em ambos os grupos, ou seja, $1,6 \pm 1,3\%$ no grupo GAL3^{-/-} e $7,7 \pm 6,8\%$ no grupo GAL3^{+/+}. Contudo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre displasias e carcinomas quanto à expressão de beta-catenina membranosa/não membranosa nos dois grupos estudados (p>0,05) (Figura 1).

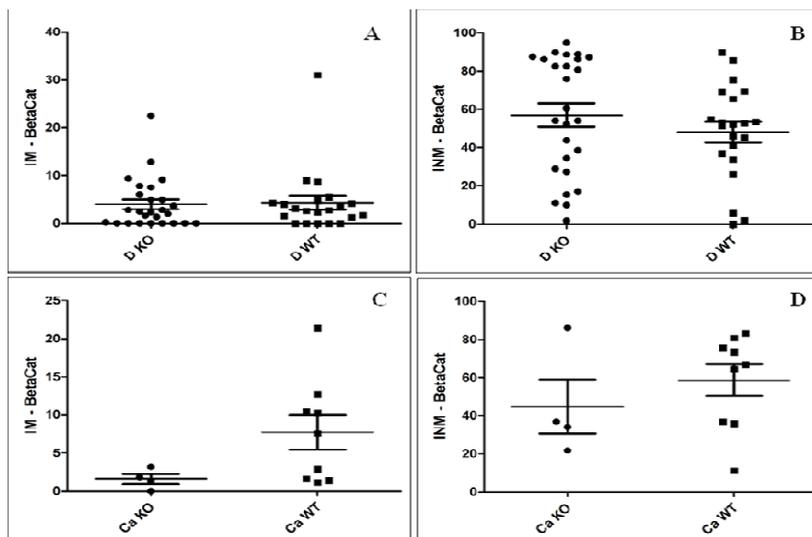


Figura 1: índice de positividade média para beta-catenina. A: índice de positividade para beta-catenina membranosa entre lesões displásicas entre os camundongos $GAL3^{-/-}$ (KO) e $GAL3^{+/+}$ (WT); B: índice de positividade para beta-catenina não membranosa entre lesões displásicas entre os camundongos $GAL3^{-/-}$ (KO) e $GAL3^{+/+}$ (WT); C: índice de positividade para beta-catenina membranosa entre carcinomas entre os camundongos $GAL3^{-/-}$ (KO) e $GAL3^{+/+}$ (WT); D: índice de positividade para beta-catenina não membranosa entre carcinomas entre os camundongos $GAL3^{-/-}$ (KO) e $GAL3^{+/+}$ (WT). IM: índice de positividade membranoso; INM: índice de positividade não membranosa; D: displasia; Ca: carcinoma; BetaCat: beta-catenina. Nenhuma diferença estatisticamente foi encontrada nessas análises ($p > 0,05$).

Em relação à GAL3, um índice de positividade média foi estabelecido nas displasias e carcinomas que desenvolveram somente no grupo $GAL3^{+/+}$. Um aumento na média de positividade para GAL3 nuclear foi encontrado de displasias para carcinomas, ou seja, $9 \pm 6,9\%$ e $15,7 \pm 8,1\%$, respectivamente. Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0.04$), indicando que a mudança de um estado pré-neoplásico para neoplásico leva ao acúmulo de GAL3 nesse compartimento celular. Por outro lado, a média de positividade para GAL3 citoplasmática foi elevada ambas as lesões ($41,1 \pm 27\%$ para displasia e $51,4 \pm 21,2\%$ para carcinomas). Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa, indicando que o aumento da expressão citoplasmática de GAL3 não parece estar associado à transformação neoplásica de carcinomas epidermóides de boca.

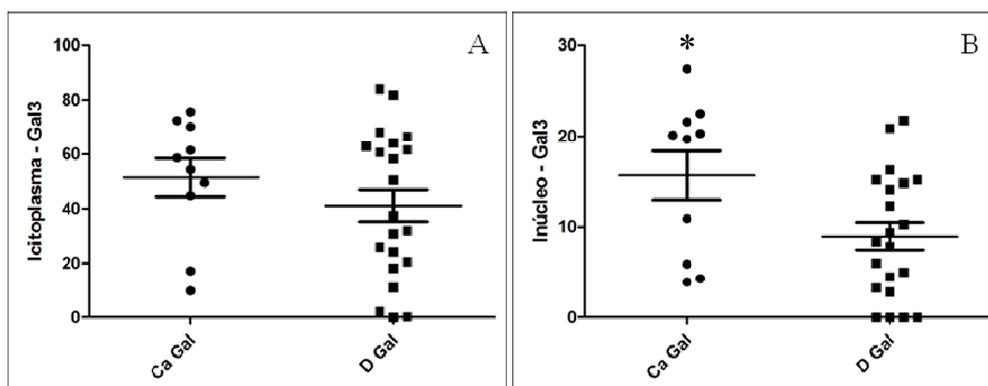


Figura 2: índice de positividade média para GAL3 em displasias e carcinomas de camundongos GAL3^{+/+}. A: índice de positividade para GAL3 citoplasmática entre displasias e carcinomas; B: índice de positividade para GAL3 nuclear displasias e carcinomas. Icitoplasma: índice de positividade citoplasmático (*p=0,04); Inúcleo: índice de positividade nuclear; Ca: carcinoma; D: displasia; GAL3: galectina-3.

Por fim, para determinar se a expressão de GAL3 está associada com a ativação da via de sinalização Wnt, procurou-se estabelecer uma correlação entre beta-catenina não membranosa/membranosa e GAL3 nuclear/citoplasmática em carcinomas do grupo GAL3^{+/+}. De acordo com a Figura 3, nem beta-catenina membranosa nem beta-catenina não membranosa estava correlacionada com GAL3 nuclear/citoplasmática, indicando que essa lectina pode não ser uma importante mediadora dessa via sinalização.

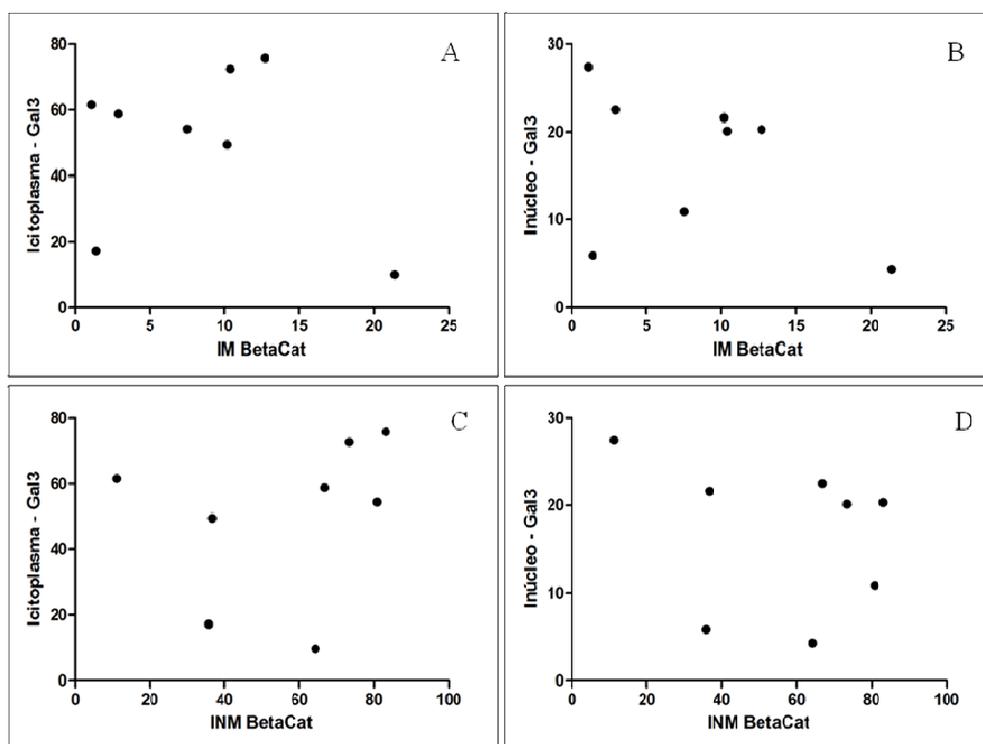


Figura 3: Análise de correlação entre beta-catenina e GAL3. A: correlação entre beta-catenina membranosa e GAL3 citoplasmática; B: correlação entre beta-catenina membranosa e GAL3 nuclear; C: correlação entre beta-catenina não membranosa e GAL3 citoplasmática; D: correlação entre beta-catenina não membranosa e GAL3 nuclear. INM: índice de positividade não membranosa; IM: índice de positividade em membrana; BetaCat: beta-catenina; Inúcleo: índice nuclear; Icitoplasma: índice citoplasmático; GAL3: galectina-3. Nenhuma significância foi encontrada nessas análises de correlação ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Existem inúmeros modelos de animais utilizados para o estudo da carcinogênese bucal, os quais variam quanto ao tipo de animal, de carcinógeno empregado e tempo de

indução.^{40,41} A maioria dos estudos utilizam os carcinógenos 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA) e o 4NQO. Contudo, trabalhos mais recentes têm mostrado que o 4NQO apresenta vantagens em relação ao DMBA, principalmente no que diz respeito à ausência de efeitos secundários teciduais após sua aplicação e ao desenvolvimento de tumores com aspectos microscópicos similares aos de humanos.^{16,30} Além disso, o mecanismo de ação do 4NQO é similar ao do tabaco e radiação actínica, as principais causas de câncer de boca e lábio, produzindo adutos de DNA nas bases nitrogenadas adenina e a guanina através ação de espécies reativas de oxigênio ou via intermediário metabólico 4-hidroxi-aminoquinolona-N-óxido (4HAQO).^{3,17,23,30} O modelo empregado nesse estudo é igual ao descrito recentemente por Tang et al (2004), o qual administrou 4NQO dissolvido na água na concentração de 100µg/ml. Os nossos resultados foram similares aos encontrados por ele, com o processo de carcinogênese bucal ocorrendo no grupo GAL3^{+/+} e GAL3^{-/-} e com o desenvolvimento de várias alterações patológicas tanto macroscópicas e quanto microscópicas no epitélio lingual.

A maioria das alterações desenvolveu em região dorsal de língua, sendo 18 no grupo GAL3^{+/+} e 10 no grupo GAL3^{-/-}. Esse aspecto parece estar associada à quantidade de enzima 4NQO redutase presente na superfície dorsal da língua.³ De acordo com Booth et al 1990, uma elevada concentração dessa enzima pode estar relacionada com a morfologia do tecido epitelial dorsal, com a presença de maior número de papilas epiteliais e, portanto, de células, aumentando a disponibilidade da enzima. Além disso, o número total de alterações em superfície lingual foi maior no grupo GAL3^{+/+} (33 alterações) do que no grupo GAL3^{-/-} (20 alterações). Somado a isso, tem-se que o número de alterações aumentou entre a semana 16 e semana 32 em ambos os grupos, sendo isso mais evidente no grupo GAL3^{+/+} (de 4 para 29 alterações). Embora não tenha sido estudo aqui, é possível predizer que a ausência da GAL3 esteja reduzindo a proliferação celular, um dos mecanismos que levam ao aparecimento de lesões teciduais.⁷ Estudos recentes têm mostrado que a GAL3 ativa genes associados à proliferação celular, como ciclina D1 e c-myc.^{36,37} Por outro lado, essa diferença pode estar relacionada à quantidade de carcinógeno ingerido por cada animal, o que também refletiria no número de alterações ao final do experimento. Por fim, o menor número camundongos GAL3^{+/+} acometidos por alterações linguais na semana 16, se comparada aos camundongos GAL3^{-/-}, pode ser decorrente da não expressão clínica de algumas alterações durante a análise macroscópica. Como já descrito na literatura, mucosa exposta ao 4NQO pode ter uma aparência normal mesmo na presença de um carcinoma invasivo situado profundamente no tecido.³⁰

Em relação ao tamanho, observou-se maior número de alterações >1,5mm no grupo GAL3^{+/+} (11 alterações) do que no grupo GAL3^{-/-} (cinco alterações). Interessante, que em ambos os grupos essas alterações se desenvolveram somente na semana 32. Como a maioria dos carcinomas apresenta dimensões relativamente grandes se comparada às lesões displásicas, é possível afirmar que a menor frequência de lesões >1,5mm em camundongos GAL3^{-/-} seja um indicativo de uma menor tendência ao desenvolvimento de carcinomas nesse grupo. Contudo, tumores com dimensões pequenas microscopicamente foi encontrado em ambos os grupos, o que não nos permite afirmar categoricamente a existência de uma relação entre tamanho e tipo de lesão. Outros estudos relacionando tamanho das alterações macroscópicas com o tipo de lesão em microscopia são necessários para confirmação de tal percepção.

De modo geral, os nossos achados microscópicos são similares aos encontrados em outros estudos de carcinogênese bucal induzido por 4NQO.^{30,41} Contudo, a incidência de camundongos que desenvolveram carcinomas foi maior no grupo GAL3^{+/+} do que no grupo GAL3^{-/-} (55,5% versus 28,5%, respectivamente). Embora não tenha sido estatisticamente significativa, o número de camundongos GAL3^{+/+} com carcinoma na semana 32 foi quase três vezes maior que o de camundongos GAL3^{-/-}. Esses dados indicam, embora hipoteticamente, que o processo de carcinogênese bucal foi mais marcante no grupo GAL3^{+/+} do que no grupo GAL3^{-/-}, em especial na semana 32. Esses dados são muito parecidos com os de Abdel-Aziz et al (2008), que encontrou uma alta incidência de tumores pulmonares em camundongos GAL3^{+/+} ao final de 32 semanas (p<0,05). Vários estudos têm mostrado que a GAL3 regula diferentes mecanismos intracelulares, tais como proliferação e diferenciação celular, transformação neoplásica e progressão tumoral.^{7,27,37} Além disso, outros trabalhos têm relacionado GAL3 com a via de sinalização Wnt^{35,37,43} uma importante via reguladora da proliferação celular e que está frequentemente alterada em diferentes tumores.²⁷ Como demonstrado por Abdel-Aziz et al (2008), a via de sinalização Wnt está frequentemente alterada em camundongos GAL3^{+/+}. Isso, de fato, poderia explicar a maior incidência de tumores em camundongos GAL3^{+/+} em seu estudo. Extrapolando esse dado ao nosso estudo, é possível afirmar que a maior incidência de tumores em animais GAL3^{+/+} observado poderia estar relacionada com alteração da via de sinalização Wnt.

A análise imuno-histoquímica mostrou que o índice de positividade para beta-catenina não membranosa foi maior que a membranosa nas displasias e nos carcinomas de ambos os grupos. Esses achados são similares ao encontrado por Sato et al (2002), que observou

expressão de beta-catenina não membranosa em 62% das lesões displásicas e 50% dos carcinomas em língua de ratos desafiados com 4NQO. Esses achados indicam que a via de sinalização Wnt está ativa tanto em animais GAL3^{+/+} quanto GAL3^{-/-} e que o acúmulo de beta-catenina não membranosa é um evento inicial no processo de carcinogênese. Além disso, um maior índice de positividade para beta-catenina não membranosa em carcinomas de camundongos GAL3^{+/+} sugere uma maior ativação da via de sinalização Wnt.¹ Contudo, não há estudos mostrando comparativamente ativação da via de sinalização Wnt em lesões bucais induzidas experimentalmente em camundongos GAL3^{+/+} e GAL3^{-/-}. Além disso, estudos descrevendo a expressão imuno-histoquímica de beta-catenina em lesões displásicas e carcinomas desenvolvidos experimentalmente em animais GAL3^{-/-} não tem sido relatado na literatura. Assim, esse trabalho é pioneiro, na medida em analisou a expressão de beta-catenina em displasias e carcinomas em camundongos GAL3^{-/-}. Portanto, nossos dados indicam que a regulação dos níveis protéicos de beta-catenina não membranosa não está sob influência da GAL3.

Em relação à expressão imuno-histoquímica da GAL3, nossos achados mostraram que houve um predomínio de imunoreatividade citoplasmática em ambas as lesões, em especial nos carcinomas. Contudo, esses resultados não atingiram um nível de significância. Não obstante a isso, uma maior positividade citoplasmática para GAL3 tem sido observada em outros tumores, como carcinoma de pequenas células de pulmão e carcinomas de língua.^{13,31} No estudo de Honjo et al (2000), por exemplo, a positividade nuclear para a GAL3 em carcinomas de língua foi de 4,3% e a citoplasmática foi de 84,9%. Por outro lado, nós encontramos que o índice de positividade nuclear aumentou significativamente na transição de uma condição pré-neoplásica para neoplásica (9% para 15,7%, respectivamente). O aumento da expressão nuclear de GAL3 na transição de uma displasia para um carcinoma tem sido observado na literatura.^{31,38} Somado a isso, alguns estudos têm sugerido que localização subcelular de GAL3 pode estar relacionada com progressão tumoral para certas neoplasias.^{7,19,20,26,32} No estudo de Puglisi et al (2004), uma associação entre GAL3 nuclear e prognóstico ruim para carcinomas de pequenas células de pulmão foi encontrado. Similarmente, outro estudo relatou uma associação entre GAL3 nuclear e recorrência para carcinomas epidermóides e adenocarcinomas de pulmão.²² De fato, estudos têm mostrado que a GAL3 nuclear induz proliferação celular atuando como agente mitogênico.^{12,15,24} Paron et al (2003), por exemplo, mostraram que a GAL3 modula e interage no núcleo com o homeodomínio do fator de transcrição TTF-1, um importante fator de transcrição gênica

envolvido na proliferação de células tireoidiana. Nesse sentido, é possível prever que o aumento da expressão de GAL3 nuclear entre as lesões displásicas e carcinomas poderia indicar um evento inicial no processo de transformação maligna durante a carcinogênese bucal, desencadeando a ativação da proliferação celular.¹¹ Por fim, a análise entre GAL3 nuclear/citoplasmática e beta-catenina não membranosa/ membranosa mostrou nenhuma correlação entre elas. Esses resultados são diferentes do encontrado por Weinberger et al (2007), em que mostrou uma forte correlação entre GAL3 e beta-catenina não membranosa em amostras de carcinomas de tireóide. Por outro lado, são similares aos encontrados por Ferrazzo et al (2009) em que não encontrou nenhuma correlação entre beta-catenina não membranosa e GAL3 em uma amostra de tumores de glândula salivar.

Em conclusão, nosso estudo mostrou que o processo de carcinogênese bucal foi mais evidente nos camundongos GAL3^{+/+}. Além disso, comparando os nossos resultados com aqueles da literatura sobre a expressão de beta-catenina e GAL3, é possível prever que a via de sinalização Wnt está ativa em ambos os camundongos e que a ausência de GAL3 parece não interferir na mediação dessa importante via em lesões displásicas e carcinomas. Assim, outros estudos são necessários para compreender melhor os mecanismos envolvidos no processo de carcinogênese bucal em camundongos GAL3^{-/-}.

REFERÊNCIAS

1. ABDEL-AZIZ, H. O.; MURAI, Y.; TAKASAKI, I.; TABUCHI, Y.; ZHENG, H.; NOMOTO, K.; TAKAHASHI, H.; TSUNEYAMA, K.; KATO, I.; HSU, D. K. LIU, F.; HIRAGA, K.; TAKANO, T.. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to NNK-induced lung tumorigenesis: an oligonucleotide microarray study. *J Cancer Res Clin Oncol*, n. 134, p. 777-788, 2008.
2. BARNES, L et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. IARC Press, Lyon, 2005.
3. BOOTH, D. R. A relationship found between intra-oral sites of 4NQO reductase activity and chemical carcinogenesis. *Cell Tissue Kinet*, n.23, p. 331-340, 1990.
4. CHIARIOTTI, L.; SALVATORE, P.; BENVENUTO, G.; BRUNI C.B. Control of galectin gene expression. *Biochimie, França*, v. 81, n. 4, p. 381-388, 1999.
5. COLI, A.; BIGOTTI, G.; ZUCCHETTI, F.; NEGRO, F.; MASSI, G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules

- with cytological atypia. *Histopathology*, Inglaterra, v. 40, n. 1, p. 80-87, 2002.
6. CVEJIC, D.; SAVIN, S.; PETROVIC, I.; SELEMETJEV, S.; PAUNOVIC, I.; TATIC, S.; HAVELKA, M. Galectin-3 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in papillary thyroid carcinoma. *Exp Oncol*, v. 27, p. 210-14, 2005.
 7. DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLOGEL, M. Galectin-3: An open-ended story. *Biochim Biophys Acta*, v. 1760, p. 616-35, 2006.
 8. FARIA, P. R.; CARDOSO, S. V. NISHIOKA, S. A.; SILVA, S. J. LOYOLA, A. M. Clinical presentation of patients with oral squamous cell carcinoma when first seen by dentists or physicians in a teaching hospital in Brazil. *Clinical Oral Invest*, n.7, p. 46-51, 2003.
 9. FARIA, P. R. Carcinogênese bucal induzida pelo 4NQO em língua de camundongos knockout para o gene da galectina-3 Tese de Doutorado. Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, 2006.
 10. FERRAZZO, K. L.; NETO, M. M.; SANTOS, E.; SANTOS PINTO, D.; SOUSA, O. M. Differential expression of Gal3, beta-catenin and cyclin D₁ in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma of salivary glands. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v.38, p.701-707, 2009.
 11. GILLENWATER, A.; XU, C.; EL-NAGGAR, A. R.; CLAYMAN, G. L.; LOTAN, R. Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck*, v.18, p.422-432, 1996.
 12. GONG, H.C.; HONJO, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; HOGAN, V.; MAZURAK, N.; BRESALIER, R.S.; RAZ, A. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Research*, Estados Unidos, v.59, n.24, p.6239-6245, 1999.
 13. HONJO, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; INOHARA, H.; RAZ, A. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*, Estados Unidos, v.7, n.3, p.661-668, 2001.
 14. HSU, D.; YANG, R.Y.; YU, L.; PAN, Z.; SALOMON, D.R.; FUNGLEUNG, W.P.; LIU, F.T. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *The American Journal of Pathology*, USA, v.156, n.3, p.1073-1083, 2000

15. INOHARA, H.; AKAHANI, S.; RAZ, A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. *Experimental Cell Research*, Estados Unidos, v.245, n.2, p.294-302, 1998.
16. KANDARKAR, S.V.; SAWANT, S.S.; READE, P.C. Ultrastructural changes to the palatal mucosa of rats following the application of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) and vitamin C. *Oral Oncology*, Inglaterra, v.34, n.4, p.247-252, 1998.
17. KANOJIA, D.; VAIDYA, M.M. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental carcinogenesis. *Oral Oncology*, Inglaterra, v.42, n.7, p.655-667, 2006.
18. LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; MENEZES, R. P.; POLISELI, F.; CHAVES, V. N.; KUASNE, H.; LEICHSENDRING, A.; MACIEL, M. E.; LOSI-GUEMBAROVSKI, A.; OLIVEIRA, B. W.; MIZUNO, L. T.; CAVALLI, I. J.; RIBEIRO, E. M. S. F.; CÓLUS, I. M. S. Oral carcinoma epidemiology in Paraná State, Southern Brazil. *Cad Saúde Publica*. Rio de Janeiro, v.25, n.2, p.393-400, 2009.
19. LIU, F.T. Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin Immunol*, v.97, p.79-88, 2000.
20. LIU, F.T.; RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*, v.5, p.29-41, 2005.
21. LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.79, p.321-29, 1995.
22. MATHIEU, A.; SAAL, I.; VUCKOVIC, A.; RANSY, V.; VEREERSTRATEN, P.; KALTNER, H.; GABIUS, H.J.; KISS, R.; DECAESTECKER, C.; SALMON, I.; REMMELINK, M. Nuclear galectin-3 expression is an independent predictive factor of recurrence for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Modern Pathology*, Estados Unidos, v.18, n.9, p.1264-1271, 2005.
23. MIRZAYANS, R.; BASHIR, S.; MURRAY, D.; PATERSON, M.C. Inverse correlation between p53 protein levels and DNA repair efficiency in human fibroblast strains treated with 4-nitroquinoline 1-oxide: evidence that lesions other than DNA strand breaks trigger the p53 response. *Carcinogenesis*, Inglaterra, v.20, n.6, p.941-946, 1999.
24. MOUTSATSOS, I.K.; WADE, M.; SCHINDLER, M.; WANG J.L. Endogenous

- lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Estados Unidos*, v.84, n.18, p.6452-6456, 1987.
25. NAKAHARA, S.; OKA, N.; RAZ, A. On the role of galectin-3 in cancer progression. *Apoptosis*, v.10, p.267-75, 2005.
26. OCHIENG, J.; FURTAK, V.; LUKYANOV, P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconjugate Journal, Estados Unidos*, v.19, n.7-9, p.527-535, 2004.
27. PARON, I.; SCALONI, A.; PINES, A.; BACHI, A.; LIU, F.T.; PUPPIN, C.; PANDOLFI, M.; LEDDA, L.; DI LORETO, C.; DAMANTE, G.; TELL, G. Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Estados Unidos*, v.302, n.3, p.545-553, 2003.
28. PEREIRA, M. C.; OLIVEIRA, D. T.; LANDMAN, G.; KOWALSKI, L. P. Hystologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance *JCDA, May*, v.73, n.4, 2007.
29. PETERS, J; LOUD, J; DIMOND, E; JENKINS, J. *Cancer Genetics Fundamentals*. Lippincott Willians & Wilkins, Inc., Philadelphia, 2001.
30. PRONZA, G.; CAMPOMENOSI, P.; TANNONE, R.; ABBONDANDOLO, A. The 4-nitroquinoline 1-oxide mutation spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic Acids Reserch*, v.20, n.6, p.1283-1287, 1992.
31. PUGLISI, F.; MINISINI, A.M.; BARBONE, F.; INTERSIMONE, D.; APRILE, G.; PUPPIN, C.; DAMANTE, G.; PARON, I.; TELL, G.; PIGA, A.; LORETO, C.D. Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Letters, Irlanda*, v.212, n.2, p.233-239, 2004.
32. RABINOVICH, G.A.; BAUM, L.G.; TINARI, N.; PAGANELLI, R.; NATOLI, C.; LIU, F.T.; IACOBELLI, S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends in Immunology, Inglaterra*, v.23, n.6, p.313-320, 2002.
33. SANO, D.; MYERS, J. N. Matastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Rev*, 2007.

34. SATO, K.; OKAZAKI, Y.; TONOGI, M.; TANAKA, Y.; YAMANE, GY. Expression of b-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oral Oncol*, v.38, p.772–78, 2002.
35. SCHNETLER, J.C.F. Oral câncer diagnosis and delays in referrals. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v.30, p.210-13, 1992.
36. SHIMURA, T.; TAKENAKA, Y.; TSUTSUMI, S.; HOGAN, V.; KIKUCHI, A.; RAZ, A. Galectin-3, a novel binding partner of β -catenin. *Cancer Res*, v.64, p.6363-67, 2004.
37. SHIMURA, T.; TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; TSUTSUMI, S.; OKADA, K.; HOGAN, V.; KIKUCHI, A.; KUWANO, H.; RAZ, A. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. *Cancer Res*, v.65, p.3535-37, 2005.
38. SAUSSEZ, S.; DECAESTECKER, C.; MAHILLON, V.; CLUDTS, S.; CAPOUILLEZ, A.; CHEVALIER, D.; VET, H. K.; ANDRÉ, S.; TOUBEAU, G.; LEROY, X.; GABIUS, H. Galectin-3 upregulation during tumor progression in head and neck cancer. *The Laryngoscope*, 2008.
39. SILVA, L. A. S. R. Estimativa 2010:Incidência de câncer na Brasil. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link Acesso em: 23/02/2010.
40. STEIDLER, N.E.; READE, P.C. Initiation and promotion of experimental oral mucosa carcinogenesis in mice. *Journal Oral Pathology & Medicine*, Dinamarca, v.15, n.1, p.43-47, 1986.
41. TANG, X.H.; KNUDSEN, B.; BEMIS, D.; TICKOO, S.; GUDAS, L.J. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clinical Cancer Research*, Estados Unidos, v.10, n.1, p.301-313, 2004.
42. URAGUCHI, M.; MORIKAWA, M.; SHIRAKAWA, M.; SANADA, K.; IMAI, K. Activation of Wnt family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Dent Res*, v.83, p.327-32, 2004.
43. WEIBERGER, P. M.; ADAM, B.; GOURIN, C. G.; MORETZ, W. Association of nuclear, cytoplasmic expression of galectin-3 with beta-catenin/Wnt-pathway activation in thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngology Head Neck Surgery*, v.133, 2007.
44. YOSHII, T.; FUKUMORI, T.; HONJO, Y.; INOHARA, H.; KIM, H.R.; RAZ, A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. *The Journal of Biological Chemistry*, Estados Unidos, v.277, n.9,

p.6852-6857, 2002.