

# Carcinoma de nasofaringe: análise da importância prognóstica da imunexpressão da galectina-3 e proteínas de matriz

*Nasopharynx Carcinoma: Analyse of the prognostic importance of the immunexpression of galectin-3 and matrix proteins*

José Vicente Tagliarini<sup>1</sup>  
 Jair Cortez Montovani<sup>2</sup>  
 Victor Nakajuma<sup>3</sup>  
 Emanuel Celice Castilho<sup>4</sup>  
 Maria Aparecida Custódio Domingues<sup>5</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Estudar a expressão da Galectina-3 e a distribuição das proteínas de matriz, laminina, fibronectina e colágeno IV, em 30 amostras teciduais de carcinoma de nasofaringe (CNF) e correlacionar com as características clinicopatológicas, agressividade tumoral e sobrevida dos indivíduos. **Forma de estudo:** clínico retrospectivo. **Material:** Foram estudadas por método imunohistoquímico a expressão das proteínas de matriz e a galectina-3 de 30 amostras teciduais de 26 pacientes com diagnóstico de Carcinoma de Nasofaringe. **Resultados:** A análise mostrou que a média etária foi de 48 anos, com o pico de prevalência entre 60 a 69 anos, e predominância do sexo masculino de 2:1. O Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Indiferenciado foi mais comum em 23 amostras (76,7%), o Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Diferenciado em 4 amostras (13,3%) e Carcinoma Escamoso Ceratinizante em 3 amostras (10,0%). A expressão da laminina que normalmente é restrita à parede dos vasos e na lâmina própria, estava muito aumentada na matriz das células neoplásicas em 23 amostras (76,7%); a fibronectina foi positiva em 13 amostras (43%) e a galectina-3 foi positiva em 21 amostras (70%). Tivemos correlação positiva da laminina, fibronectina e galectina-3 em 7 amostras (23,3%) e entre laminina e galectina-3 em 11 amostras (36,6%). **Conclusão:** A expressão positiva da Galectina-3 e da laminina não mostrou correlação significativa quanto à agressividade tumoral e a sobrevida dos pacientes, enquanto a expressão da fibronectina está associada a menor taxas de recidiva tumoral.

**Palavras-chave:** Neoplasias Nasofaríngeas; Galectina 3; Fibronectinas; Laminina.

## SUMMARY

**Objectives:** Analyse the expression of galectin-3 and distribution of matrix proteins, laminin, fibronectin and collagen IV, in 30 paraffinated samples of nasopharynx carcinoma (NFC); and correlate the to clinicopathological characteristics, as tumor aggressiveness and survival of individuals. **Study design:** retrospective clinical study. **Methods:** The analyses were performed by immunohistochemistry study the expression of the matrix protein and galectin-3 in 30 tissue samples of 26 patients diagnosed with nasopharyngeal carcinoma. **Results:** The analysis showed that the patients mean age was 48 years-old, with the age peak prevalence was from 60 to 69 years-old, with male predominance of 2:1. The undifferentiated non-keratinized squamous cell carcinoma was predominant in 23 samples (79%), differentiated non-keratinized squamous cell carcinoma was found in 4 samples (13.3%) and keratinized squamous cell carcinoma was found in 3 samples (10%). The laminin expression, which is normally restricted to the vessel walls and lamina propria, was increased in the neoplastic cell matrix in 23 samples (76.7%). Fibronectin was positive in 23 samples (43%). Galectin-3 was observed in 21 samples (70%). The laminin expression, which is normally restricted to the vessel walls and lamina propria, was increased in the neoplastic cell matrix in 23 samples (76.7%). Fibronectin was positive in 23 samples (43%). Galectin-3 was observed in 21 samples (70%). Seven cases showed positive correlation between all three proteins. Eleven cases presented positive correlation of laminin and galectin-3 immunexpression. **Conclusions:** Fibronectin presence seems to reduce the chance of tumor recurrence and also, increase the survival rate, differently from laminin and galectin-3.

**Keywords:** Nasopharyngeal Neoplasms; Galectin 3; Fibronectins; Laminin.

## INTRODUÇÃO

O Carcinoma de Nasofaringe (CNF) é uma neoplasia epitelial maligna, com evidências, à microscopia óptica e eletrônica, de diferenciação escamosa<sup>1</sup>. O CNF possui

uma distribuição geográfica e racial distinta e uma etiologia multi-fatorial<sup>2-3</sup>. É raro nos EUA e em europeus de origem caucasiana<sup>4-5</sup>. Nos EUA a incidência é de 01 a 07 casos para 100.000 indivíduos, com distribuição por sexo de 2.4:1 em relação sexo masculino e feminino. En-

1) Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia (Professor Assistente Doutor do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP).

2) Professor Titular (Professor Titular do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP).

3) Mestrado em Bases Gerais da Cirurgia (Professor Assistente do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP).

4) Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia (Médico Otorrinolaringologista do Hospital de Clínicas de Botucatu).

5) Doutorado em Patologia (Professor Assistente Doutor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP).

Instituição: Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.  
 Botucatu / SP – Brasil.

Correspondência: Distrito de Rubião Júnior s/n - Botucatu / SP – Brasil - CEP 18603-970.

Recebido em 13/06/2011; aceito para publicação em 20/09/2011; publicado online em 30/09/2011.

Conflito de interesse: não há. Fonte de fomento: não há.

tretanto, em países asiáticos como China, Tailândia, Filipinas, Vietnã e outros países da África do Norte (Argélia e Marrocos), Canadá e Alaska a incidência é alta, de cerca de 150 a 500 casos por 01 milhão de habitantes/ano<sup>6,7,8</sup>. Em alguns lugares há maior incidência, como em Hong Kong, onde 01 a cada 40 homens desenvolvem CNF antes dos 75 anos de idade<sup>7</sup>. Outros autores notaram que o pico de maior incidência ocorre após os 30 anos, sendo maior entre os 40-60 anos, e com declínio após esta idade<sup>2</sup>.

O CNF é classificado, segundo OMS, nos sub-tipos: Carcinoma Escamoso Ceratinizante (CEC), Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Indiferenciado (CENCI), Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Diferenciado (CENCD) e o sub tipo Basalóide que perfaz menos de 0,2% dos casos. O sub-tipo mais comum é o Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Indiferenciado, que perfaz cerca de 9,2% dos casos<sup>7-8</sup>. Uma das principais características clínicas do CCECP, inclusive o CNF, é a sua capacidade de invadir tecidos adjacentes e dar metástases locorregionais. Invasão de células cancerosas, metástases e angiogêneses é um processo complexo envolvendo a cooperação de inúmeras enzimas proteolíticas secretadas pelo tumor ou pelas células do hospedeiro e cujos substratos incluem componentes extracelulares da matriz<sup>9</sup>. Evidências sugerem que essas "metaloproteinases matrix (MMPs)" e seus inibidores fisiológicos tissulares (TIMPs) podem ter um importante papel na progressão dos CCECP<sup>10-11</sup>.

As MMPs são uma família de endopeptases, dependentes do zinco e cálcio extracelulares, com ação enzimática contra quase todos os componentes proteicos da matriz extracelular. Baseando-se nas propriedades e estruturas proteicas e substratos específicos, as MMPs podem ser divididas em 4 subclasses<sup>9</sup>. A primeira subclasse, com tipos I, II e III de colágeno fibrilar, é composta de MMP1 (colágeno intersticial), MMP-13 (colagenase-3) e MMP-18 (colágeno neutrofílico). A segunda subclasse, lisinas estromáticas, incluem 4 membros: MMP-7 (Matrilysin) contendo um pequeno número de propriedades, como de atividades catalíticas, MMP-3 (Stromelysin-1) MMP-10 (Stromelysin-2), e MMP-11 (Stromelysin-3), que contém propriedades adicionais carboxílicas. Estas lisinas têm uma grande especificidade no substrato e são capazes de degradar muitos componentes extracelulares como as lamininas, fibronectinas e proteoglicinas<sup>12</sup>. Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase-A) e MMP-9 (gelatinase-B) são agrupadas em uma classe separada baseada na presença de propriedades semelhantes a fibronectina. Galectinas são capazes de clivar tanto as formas desnaturadas de colágenos como do colágeno tipo IV encontrados na membrana basal. Matrix metalloproteinase 2 e MMP9 também contém receptores para gelatinases. O último grupo de MMPs contém receptores de membranas (MT-MMPs), os quais são compostos de MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMPs), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP) e MMP-24

(MT5-MMP). Essas MMPs tem como propriedades clínicas processar a sequência hidrofóbica no C-terminal, o qual permite a inserção de proteínas dentro da membrana celular.

A galectina-3 previamente descrita como proteína de ligação IgE, CBP35, Mac-8, L-29, L3 1, L-34. Na ligação com a B-galactoside, une-se a porção de carboidratos das glicoproteínas e ou de glicolipídios da superfície celular. A galectina-3 não está presente no microdomínio transmembrana, mas sim na superfície celular e nos componentes extracelulares em 3 domínios: NH<sub>2</sub>-terminal, COOH-terminal e em uma sequência de colágeno que é rica em glicina, prolina e tirosina.

Estudos recentes mostraram que as galectinas-3 e as proteínas de matriz são expressas largamente em células normais e neoplásicas, e regulam o crescimento celular, a adesão celular, a diferenciação e morte celular. Está bem demonstrado que a expressão da galectina-3 correlaciona-se com a transformação neoplásica em alguns tipos de células e com o potencial metastático<sup>13</sup>.

Outra proteína de matriz, a laminina é a principal glicoproteína da membrana basal e regula várias funções celulares por meio de suas ligações com integrinas e não-integrinas lamininas ligadas a proteínas, galectina-3 e outras laminina não integrinas ligada a proteínas. Elas estão presentes na superfície celular e faltam na modulação da adesão das células de cânceres como melanoma<sup>12</sup>.

Wu et al., em 2006<sup>14</sup>, observaram que a fibronectina, uma das principais proteínas de matriz, estava em quantidade aumentada no sangue periférico de animais com CNF induzidos experimentalmente. Já as galectinas, que são proteínas intra e extra celulares, estariam envolvidas nos processos de diferenciação, proliferação e migração celular. Para autores, como Keryer-Bibbens et al., em 2006<sup>15</sup>, a galectina-9 em casos de CNF, modularia a resposta dos linfócitos T induzindo a maior eficiência da infecção pelo EBV localizado nas células epiteliais tumorais.

Instigante para a ciência é a transferência desses conhecimentos biomoleculares para a prática clínica. Atualmente a classificação TNM para neoplasias de cabeça e pescoço, embora muito útil, não é mais suficiente para estabelecer melhores prognósticos clínicos. Por isso, o estudo de marcadores genéticos moleculares é relevante no sentido de melhorar e complementar a classificação TNM de estadiamento tumoral<sup>16</sup>.

Assim, o objetivo de nossa pesquisa é correlacionar se a expressão da galectina-3 e outras proteínas de matriz poderiam ter valor para o prognóstico em indivíduos com Carcinoma de Nasofaringe.

## MÉTODO

### Caracterização da amostra:

Foram selecionadas 30 lâminas e blocos parafinados, do período de 1990 a 2008, arquivados no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de

Botucatu-UNESP, São Paulo, Brasil, cujos laudos anatomopatológicos foram de Carcinoma de Nasofaringe. As lâminas foram revisadas por um único patologista e reclassificadas segundo Classificação da WHO-2005. Todos os casos incluídos eram pré-tratamento e as biópsias analisadas correspondiam a do diagnóstico inicial (Apêndice 1).

### Estudo Imunohistoquímico:

Foram estudadas por método imunohistoquímico as proteínas de matriz (laminina, fibronectina e colágeno IV) e a galectina-3 em 30 amostras teciduais de 26 pacientes com diagnóstico de Carcinoma de Nasofaringe (CNF) (Apêndice 2).

A reação de imunohistoquímica foi realizada pelo método de Avidina Biotina Peroxidase<sup>17</sup> utilizando-se anticorpos anti-laminina (monoclonal-DAKO clone M7262), anti-fibronectina beta (policlonal-DAKO clone AO245), anti-colágeno IV (monoclonal-DAKO clone MO785), anti-galectina-3 (monoclonal-RDI clone 9C4), em lâminas

separadas e devidamente marcadas, na concentração de 1:800, 1:50, 1:50, 1:50 diluídos em tampão específico (DAKO-S3022). A reativação antigênica foi realizada pelo calor, utilizando-se forno de microondas (SHARP 900 W) em tampão citrato pH 6.00/0,01mM (MERCK, 1.00244) por 15 minutos.

As lâminas foram incubadas por 18 horas em câmara úmida a 8°C. Utilizou-se o anticorpo secundário associado ao KIT-EnVision (DAKO K4003 e 4001), com tempo de incubação de 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi revelada pelo cromógeno e pelo substrato 3,3-diaminobenzidina (KIT DAKO-K3468) e contra corada com hematoxilina de Mayer (MERCK 1.09249).

As lâminas foram lidas em microscopia óptica, considerando-se a positividade e negatividade de cada marcador bem como sua distribuição, comparando ao tecido controle. A positividade foi dividida em graus semi-quantitativos, conforme a intensidade da imunexpressão: grau I intensidade fraca, grau II moderada e grau III forte. A distribuição foi descrita como estromal e/ou

### Apêndice 1.

R G	sexo	idade	natural.	profissão	tamanho	Linfonodo	tratamento	Recidiva	sobrevida	biópsia		histologia
223339	M	59	Tejupá	lavrador	T1N2M0	Direita	Rxt,exclus	negativo	mais de 8	5044/90		CENCI
50797-0	M	50	Botucatu	secretário	T3N0M0	Ausente	Qxt+Rxt	negativo	mais de 7	5682/01		CENCD
444174-5	F	67	Bebedouro							4518/02	trat.fora	CENCI
369143	F	50	Peru	professora	T4N3M0	Direita	Qxt+Rxt	negativo	mais de 5	1757/03		CENCI
412493	F	15	Pernamb.		T3N3M0	Bilateral	Qxt+Rxt	negativo	03anos	8266/06		CENCI
525804	M	51	Avaré	vendedor	T4N1M0	Esquerda	Qxt+Rxt	positivo	02anos?	2481/07		CENCI
318131	M	37	Botucatu	lavrador	T4N1M0	Esquerda	Qxt+Rxt		menos 5	3886/08		CENCI
260088	F	77								513/99		CENCI
251401-0	M	64	VigoSpain	com/edit	T2N0M0	Ausente	Qxt+Rxt	negativo	mais de 7	1139/99		CENCI
415299-9	M	59	Itapetinin.	ferroviário	T4N3M0	Bilateral	Rxt	obito	03mes.?	302/02		CENCI
353179-1	M	66	Areiópolis		TxN3M0	Esquerda	Rxt(Jau)	obito	01ano	2186/03		CENCI
381354-1	M	37	Goio-Ere	lavrador	T2N2M0	Bilateral	Qxt+Rxt	negativo	mais de 9	988/99		CENCI
238974-6	M	67	Botucatu	açougueir	T1N3M0	Esquerda	Qxt+Rxt			2635/99		CENCI
S/RG	F	60								7119/02		CEC
453883-8	M	54	Santos	engenheir	T2N2M0	Bilateral	Qxt+Rxt	positivo	04anos	9134/02	refratário	CENCI
32321-7	F	52	Botucatu	do lar	TxN2M0	Bilateral	Qxt+Rxt	positivo	mais de 4	3920/03		CENCI
469684-0	M	14	Paraiba		T4N2M0	Ausente	Qxt+Rxt	negativo	mais de 5	9819/03		CENCI
453883-8	M	54	Santos	engenheir	T2N2M0	Bilateral	Qxt+Rxt	positivo	04anos	546/04	alta a pedi	CENCI
248895-7	M	74	São Manu	pedreiro	T4N0M0	Direita	Qxt+Rxt	positivo	02 anos	10049/04		CENCI
322457	M	35	São Manu	lavrador	T3N3M0	Direita	Qxt+Rxt	obito	01ª S	3125/05		CENCI
525804	M	51	Avaré	vendedor	T2N2M0	Esquerda	Qxt+Rxt	positivo	03 anos	6288/06		CENCD
106989-6	F	64	Lucianóp	do lar	T2N0Mo	Esquerda	Qxt+Rxt	obito	01ª	10506/07		CENCI
570710	M	29			T3N1M0			positivo	menos 5	8729/08		CENCI
32321-7	F	52	Botucatu	do lar	TxN2M0	Bilateral	Qxt+Rxt	positivo	mais de 4	8497/07		CENCI
196356	F	60	Laranjal P	do lar	T4N3M0	Direita				3585/08		CEC
557953	M	9						negativo	menos 5	1821/08		CENCI
19303-8	M	17	Botucatu	pedreiro	T2N2M0	Esquerda	Rxt	negativo	mais 20a	35/80	alcoo- lism	CENCI
392016-0	M	40	Goias	correios	T2N2Mo	Ausente	Qxt+Rxt	positivo	mais de5	5828/99		CENCD
392016-0	M	40	Goias	correios	T2N2M0	Ausente	Qxt+Rxt	positivo	mais de 5	2674/00		CEC
358749	F	35	Piaui		T3N0M0	Ausente	Qxt+Rxt	negativo	mais de 2	8932/07		CENCD

## Apêndice 2.

	SEXO	IDADE	histol	linfon	TNM	trat	Lam	Fibr	col IV	Gal 3	rec	sobr
1	1	59	2	1	3	1	1	1	0	1	0	0
2	1	50	3	0	3	2	1	1	0	1	0	0
3	0	67	2				1	1	0	1	10	10
4	0	50	2	1	4	2	1	1	0	1	0	0
5	0	15	2	2	3	2	1	1	0	1	0	1
6	1	51	2	1	4	2	1	1	0	1	1	1
7	1	37	2	1	4	2	1	1	0	1	10	1
8	0	77	2				1	1	0	0	10	10
9	1	64	2	0	2	2	1	1	0	0	0	0
10	1	59	2	2	4	1	1	1	0	0	obito	1
11	1	66	2	1	4	1	1	1	0	0	10	1
12	1	37	2	2	3	2	1	0	0	1	0	0
13	1	67	2	1	4	2	1	0	0	1	10	10
14	0	60	1				1	0	0	1	10	10
15	1	54	2	2	3	2	1	0	0	1	1	1
16	0	52	2	2	3	2	1	0	0	1	1	1
17	1	14	2	0	4	2	1	0	0	1	0	0
18	1	54	2	2	3	2	1	0	0	1	1	1
19	1	74	2	1	4	2	1	0	0	1	1	1
20	1	35	2	1	4	2	1	0	0	1	10	1
21	1	51	3	1	3	2	1	0	0	1	1	1
22	0	64	2	1	2	2	1	0	0	1	10	1
23	1	29	2	1	3	0	1	0	0	0	1	1
24	0	52	2	2	3	2	0	1	0	1	1	1
25	0	60	1	1	4		0	1	0	1	obito	obito
26	1	9	2	1		2	0	0	0	1	0	1
27	1	17	2	1	3	1	0	0	0	0	0	0
28	1	40	3	0	3	2	0	0	0	0	1	0
29	1	40	1	0	3	2	0	0	0	0	1	0
30	0	35	3	0	3	2	0	0	0	0	0	1

Sexo M-1 Histologia : CEC-----1 Linfonodo : Positivo-- F-0 : CENCI 2 : Negativo-0  
: CENCD-3

Recidiva : Positiva-----1 Sobrevida : Mais de 5 anos----0  
: Negativa----2 : Menos de 5 anos--1  
: Sem dados-10 : Sem dados-----10

Tratamento : Rxt-----1  
Rxt+Qxt----2

ESTADIAMENTO AJCC-2010\*

1 T1N0M0

2 T1N1M0  
T2N0M0  
T2N1M0

3 T1N2M0  
T2N2M0  
T3N0M0  
T3N1M0  
T3N2M0

4 T4N0M0  
T4N1M0  
T4N2M0  
N3....  
M1..

\*AJCC: American Joint Committee Cancer

citoplasmática e/ou nuclear. Porém para a análise estatística, devido ao tamanho da casuística, optou-se por considerar resultado positivo ou negativo, independente da distribuição.

### Análise estatística

As associações entre sexo, características do tumor, presença de proteínas de matriz e tempo de sobrevida e recidiva foram estimados pelo teste exato de Fisher com o objetivo de identificar possíveis variáveis/fatores confundimento.

A segunda etapa da análise foi à estimativa do efeito da presença das proteínas de matriz sobre a recidiva até os 5 primeiros anos após início do tratamento pela estimativa pontual e intervalar do *Odds-Ratio* e o estudo do efeito das combinações de proteína de matriz pelo teste exato de Fisher.

## RESULTADOS

Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2.

A idade média dos pacientes avaliados foi de 48 anos, com uma variação entre 9 a 74 anos. Cerca de 50% dos casos tinham menos de 51 anos e 25% tinham mais de 61 anos. Houve predomínio do sexo masculino em relação ao sexo feminino na proporção de 2:1. Em quatro casos obtivemos apenas os dados idade, sexo e o diagnóstico anatomopatológico. As características clínicas e variáveis dos 26 pacientes estão resumidas na Tabela 1.

Dentre os 30 casos estudados, 76,7% eram do subtipo Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Indiferenciado (CENCI) (Figura 1A e 1B). Os subtipos Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Diferenciado (CENCID) (Figura 1C) e o Carcinoma Escamoso Ceratinizante (CEC) foram encontrados em percentuais semelhantes e em menor frequência (Tabela 1).

Quanto ao sexo e a idade dos 23 casos de subtipo CENCI, 69,6% eram homens e a idade média, independentemente do sexo, foi de 48 anos com um desvio-padrão de 20,15, o que indica uma alta variabilidade da idade no momento da classificação histopatológica. O caso mais jovem tinha 9 anos enquanto que o caso mais velho, 77 anos. Cerca de 25% dos casos do subtipo CENCI tinham idade abaixo 35 anos e 25% dos casos mais velhos apresentaram idade acima dos 64 anos.

Dentre as amostras analisadas a laminina foi a proteína de matriz mais presente (76,7% de amostras positivas), seguida da galectina-3 (70%) e da fibronectina em 43,3% das amostras positivas (Figura D, E, F e G). O colágeno IV não foi positivo em nenhuma das amostras analisadas.

Das 18 amostras com a presença simultânea da laminina e da galectina-3, 15 eram de subtipo morfológico CENCI, 2 eram de subtipo CENCID e 1 era de subtipo CEC. Em 9 amostras foram observadas a presença simultânea das proteínas fibronectina e galectina-3 sendo que 7 destas 9 amostras eram de subtipo CENCI.

**Tabela 1.** Caracterização da casuística.

Variável	Freq. absoluta	% Relativo <sup>(2)</sup>
Sexo masculino (♂) e feminino (♀)	20(♂) / 10(♀)	66,7/33,3
Idade <sup>(1)</sup>	9/77	47,9±18,1 51,5 (36,5;61,0)
Características do tumor		
Tipo histopatológico		
CEC	3	10,0
CENCI	23	76,7
CENCID	4	13,3
Presença de linfonodo	21	77,8
Extensão do linfonodo		
Unilateral	14	66,7
Bilateral	7	33,3
Estadiamento TNM		
2	2	7,7
3	14	53,8
4	10	38,5
Tipo de tratamento		
Somente quimioterapia	1	3,8
Somente radioterapia	4	15,4
Ambos	21	80,8
Proteínas de matriz		
Presença de laminina	23	76,7
Presença de fibronectina	13	43,3
Presença de galectina-3	21	70,0
Presença de colágeno IV	0	0,0
Prognóstico		
Tempo de acompanhamento		
Acompanhados por um período menor que 5 anos		
Informação sobre recidiva	11	42,3
Recidiva durante o período de acompanhamento	8	72,7%
Acompanhados por um período maior que 5 anos		
Informação sobre recidiva	9	36,0
Recidiva antes de 5 anos	0	0,0%
Recidiva após 5 anos	2	100,0%

(1) Resumo descritivo em mínimo/máximo, média, desvio-padrão e quartis.

(2) Ao total de unidades observacionais com a informação.

A imunexpressão revelou variações de grau I, intensidade fraca, ao grau III forte, localizadas ao redor da célula neoplásica para as proteínas laminina e da fibronectina (Figura 1D e 1G). A mesma variação foi encontrada para galectina-3 porém, localizada na matriz e nas células neoplásicas (Figura 1E e 1F). Apesar das imunexpressões terem sido analisadas conforme os graus, devido à pequena amostragem, a análise estatística foi realizada desconsiderando o grau e levando-se em consideração apenas o resultado positivo e negativo da mesma.

Quanto à sobrevida dos pacientes, 16 tiveram seguimento até 5 anos, dos quais 8 tiveram recidiva nesse período. Outros 9 pacientes, foram seguidos por mais

**Tabela 2.** Distribuição dos pacientes segundo recidiva geral e recidiva antes dos 5 anos.

Situação	Recidiva	p <sup>(*)</sup>	Recidiva em 5 anos	p <sup>(*)</sup>
Presença de alguma proteína				
Não	2/4 (50,0%)	1,000	0/3 (0,0%)	0,206
Sim	8/16 (50,0%)		8/14 (57,1%)	
Apenas Laminina				
Não	9/19 (47,4%)	1,000	7/16 (43,8%)	
0,471				
Sim	1/1 (100,0%)		1/1 (100,0%)	
Apenas Laminina e Fibronectina				
Não	10/19 (52,6%)	1,000	8/16	1,000
Sim	0/1 (0,0%)		0/1	
Apenas Laminina e Galectina-3				
Não	5/13 (38,5%)	0,350	3/10 (30,0%)	0,153
Sim	5/7 (71,4%)		5/7 (71,4%)	
Apenas Fibronectina e Galectina-3				
Não	9/19 (47,4%)	1,000	7/16 (43,8%)	0,471
Sim	1/1 (100,0%)		1/1 (100,0%)	
Laminina, Fibronectina e Galectina-3				
Não	9/15 (60,0%)	0,303	7/13 (53,8%)	0,576
Sim	1/5 (20,0%)		1/4 (25,0%)	
Total de proteínas presentes				
0	2/4 (50,0%)		0/3 (0,0%)	
1	1/2 (50,0%)		1/1 (100,0%)	
2	6/9 (66,6%)		6/9 (66,6%)	
3	1/5 (20,0%)		1/4 (25,0%)	
4	0/0		0/0	

(\*) Teste exato de Fisher.

**Tabela 3.** Estimativa do efeito das proteínas de matriz.

Proteína	Prognóstico	p	OR	IC (OR; 95%)
Presença de Laminina	Recidiva	1,000	1,00	(0,14 – 6,77)
	Recidiva antes dos 5 anos	0,328	3,50	(0,28 – 43,16)
Presença de Fibronectina	Recidiva	0,171	0,25	(0,03 – 1,81)
	Recidiva antes dos 5 anos	0,407	0,41	(0,05 – 3,30)
Presença de Galectina-3	Recidiva	0,223	4,37	(0,40 – 47,01)
	Recidiva antes dos 5 anos	0,172	5,60	(0,47 – 66,44)

de 5 anos com 2 recidivas. Um paciente não tinha informações.

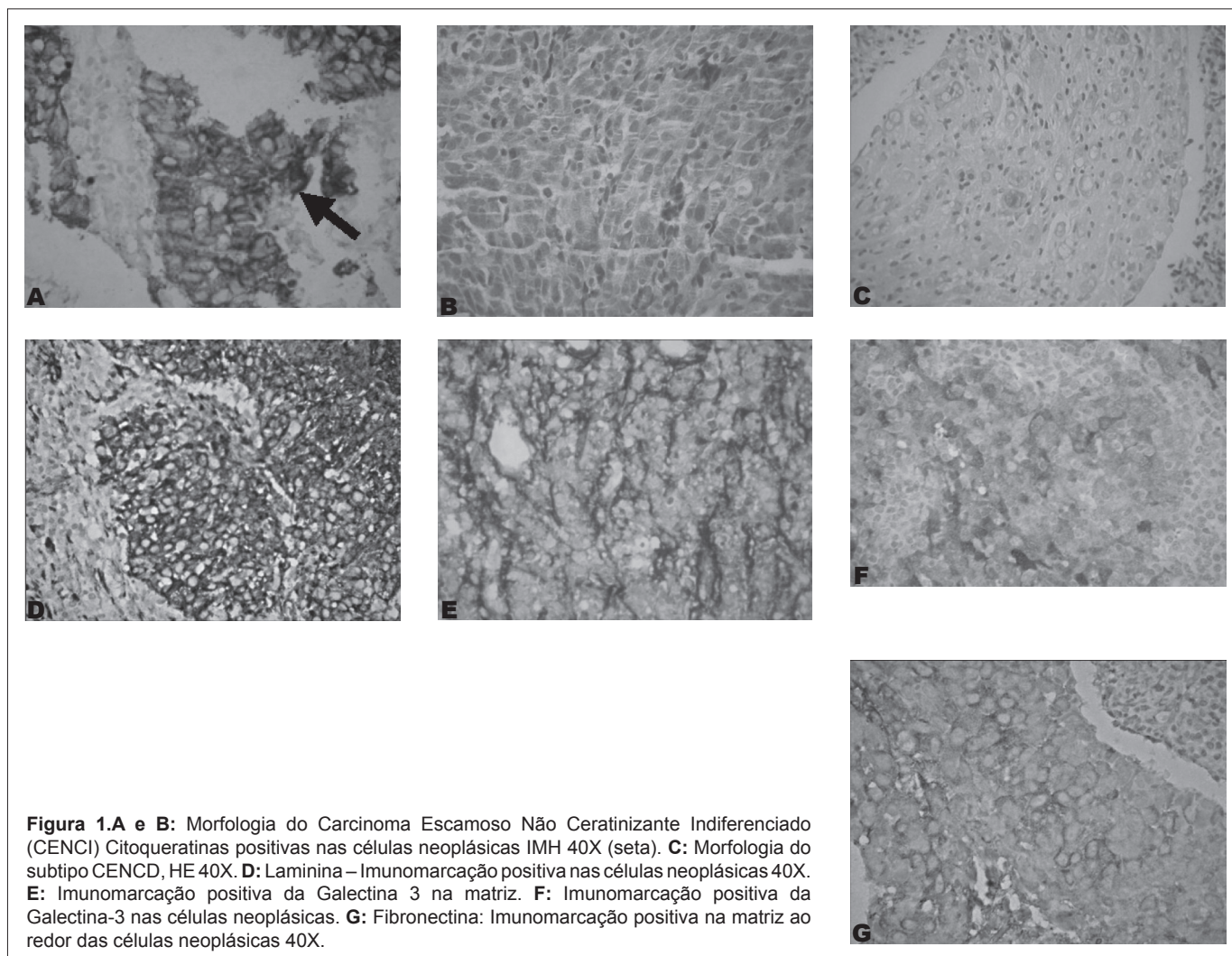
Uma das associações estudadas, foi à comparação entre pacientes que apresentaram apenas as proteínas laminina e galectina-3 e os demais pacientes em relação ao percentual de casos de recidiva antes dos 5 anos ( $p = 0,153$ ) e o estudo do efeito do total de proteínas sobre a chance de recidiva. O estudo mostrou que, uma proteína a mais aumentou, porém, não significativamente, a chance de recidiva em 5%, OR = 1,05 IC (OR;95%) = (0,99 – 1,13),  $p = 0,083$ .

Não houve evidências entre a presença de cada uma das proteínas de matriz, independentemente da presença das demais sobre a chance de recidiva geral e recidiva em 5 anos, para concluir acerca de uma associação positiva entre presença de uma proteína de matriz e a

chance de recidiva neoplásica. Entretanto, observa-se que, embora não significativa, a presença de fibronectina reduziu a chance de recidiva geral e recidiva em 5 anos, ao contrário das demais proteínas.

Dentre os pacientes com galectina-3, 71,4% dos 07 pacientes que também tinham laminina recidivaram antes dos 05 anos após o início do tratamento (Quadros 2 e 3). Isto mostra apenas tendência, visto que por utilizarmos frequências absolutas não é possível a aplicação de técnica estatística para a comparação entre os grupos de pacientes que possuem apenas laminina em relação ao grupo de pacientes que possuem apenas fibronectina.

Em relação à presença da Fibronectina, 25,0% dos pacientes recidivaram antes dos 05 anos após o início do tratamento, enquanto que, dos 07 pacientes que possuíam a laminina e galectina-3 somente, cerca de 71,4% recidivaram. Apesar da diferença de quase 50% entre os



**Figura 1.** A e B: Morfologia do Carcinoma Escamoso Não Ceratinizante Indiferenciado (CENCI) Citoqueratinas positivas nas células neoplásicas IMH 40X (seta). C: Morfologia do subtipo CENCD, HE 40X. D: Laminina – Imunomarcção positiva nas células neoplásicas 40X. E: Imunomarcção positiva da Galectina 3 na matriz. F: Imunomarcção positiva da Galectina-3 nas células neoplásicas. G: Fibronectina: Imunomarcção positiva na matriz ao redor das células neoplásicas 40X.

dois grupos de pacientes, não foi detectada uma diferença significativa sob ponto de vista estatístico, devido ao “n” pequeno de amostras. Entretanto, simulação mostra que em uma casuística 2 vezes maior, o mesmo teste estatístico apresentaria um p-valor igual a 0,036 desde que as proporções de recidiva fossem mantidas.

## DISCUSSÃO

O CNF é uma neoplasia maligna que apresenta características distintas em relação às outras que ocorrem em cabeça e pescoço, devido a seus aspectos epidemiológicos, entre eles os fatores raciais, alimentares e a resposta terapêutica. É uma entidade rara na maioria das regiões do nosso planeta, correspondendo a 0,7% do câncer no mundo<sup>18</sup>. Nos EUA a incidência é de 07 casos diagnosticados a cada um milhão de pessoas. No entanto, no sudoeste da China, na região central da província de Guangdong, no sudoeste asiático, em nativos da região Ártica, em árabes do norte da África e em partes do Mediterrâneo a incidência é alta, chegando a 300 a 800 indivíduos por milhão de habitantes<sup>2,4,19</sup>.

Carvalho et al., em 2008<sup>20</sup>, numa série de 16 pacientes avaliados no período de 15 anos (1991 a 2006), observaram oito casos de CNF dentre 16 tumores de nasofaringe. Nossa casuística de 26 pacientes, em um total de 30 lâminas analisadas, diagnosticados no período de 1990 a 2008, mostra características epidemiológicas semelhantes aos de outros autores<sup>20,21</sup>. A idade média foi de 48 anos (9 a 77 anos) e predominância de sexo masculino para o feminino. Somente quatro tinham menos de 18 anos de idade, e a maioria dos indivíduos, estavam entre a quinta e a sexta década de vida. Nosso estudo, mesmo com “n” pequeno, demonstra que os indivíduos de baixo risco para esta neoplasia mostram uma tendência de distribuição bimodal, com primeiro pico na adolescência e um segundo pico após os 65 anos. Quanto ao estágio da neoplasia, encontramos uma distribuição dos pacientes nos estádios Tx=3, T1=02, T2=09, T3=05 e T4=07. Dados descritos na Figura 01, e na Tabela 02, mostra que a análise estatística é significativa nos 26 pacientes quanto ao seu estágio e comprometimento dos linfonodos. Cinco deles com estágio N0M0, apenas 02 tiveram sobrevida maior que 05 anos, sem recidiva. Outro paciente foi a óbito por complicação cardiopulmonar após

a quimioterapia e radioterapia. Dos outros 20 indivíduos, em 11 a presença de linfonodos era positiva, e tiveram recidiva e sobrevida menor que 05 anos. Outros 04 foram a óbito no primeiro ano após o diagnóstico, mostrando uma grande agressividade tumoral. Khanfir et al., 2007<sup>22</sup>, relataram que a presença da metástase regional e com linfonodos positivo a distância, são importantes fatores prognóstico e de sobrevida dos pacientes.

Em relação as galectinas cujos dados estão nas tabelas 07 a 10, observamos um aumento da expressão da galectina-3, positiva em 70% dos casos, o que revela uma positividade citoplasmática e nuclear focal comum em casos de CENCI. Isto nos induz a crer que esta proteína, principalmente quando associada a laminina, possa provocar alterações dos mecanismos de controle de replicação celular como as provocadas pelo EBV. Em 18 de nossos casos a laminina e a galectina-3 tiveram correlação positiva de imunexpressão (tabela 07), demonstrando ações conjuntas que possam estar envolvidas na progressão do CENCI<sup>23</sup>. Em outros 07 casos observou-se correlação positiva entre as três proteínas laminina, fibronectina e galectina-3, sendo que em somente 01 caso era CENCD, e os demais eram CENCI. Esses achados confirmaram que na patogenia do CNF, principalmente no subtipo CENCI, as proteínas de matriz tem importante papel, provavelmente modulado pelas proteínas virais de latência como a LMP1 e 2A.

Todavia, a caracterização dos padrões de expressão das proteínas de matriz em pacientes com CNF, ainda é controversa, com diferentes achados em outros sítios ou órgãos da cabeça e pescoço<sup>10,13,22,24,25,26</sup>.

A análise estatística mostra valores de “p” decrescentes, embora não ainda significantes, para uma expressão maior da galectina-3. Isso seria sugestivo de uma neoplasia mais agressiva do ponto de vista biológico.

Essas observações, com divergências da literatura mostram que há necessidade de mais evidências clínicas para que a galectina-3 e as proteínas de matriz possam ser utilizadas como biomarcadores para prognóstico em carcinoma de nasofaringe.

## REFERÊNCIAS

- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics the head and neck tumors. Lyon: IARC Press; 2005
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. Lyon: IARC Press; 2001. IARC Cancer Bases.
- Chan JKC, Bray F, McCarron P, Foo W, Lee AWM, Yip T, et al. Nasopharyngeal carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology e genetics head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p.85-97.
- Davies L, Welch HG. Epidemiology of head and neck cancer in the United States. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;135(3):451-7.
- Ou SH, Zell JÁ, Ziogas A, Anton-Culver H. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in the United States: improved survival of Chinese patients within the keratinizing squamous cell carcinoma histology. *Ann Oncol.* 2007;18(1):29-35.
- Yu MC, Yuan JM. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(6):421-9.
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay Parkin J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents. Lyon: IARC Press; 2003. v. 8. (IARC Scientific Publication, 155).
- Ayadi W, Khabir A, Hadhri-Guiga B, Fkil L, Toumi N, Siala W, et al. North African and Southeast Asian nasopharyngeal carcinomas : between the resemblance and the dissemblance. *Bull Câncer.* 2010;97(4):475-82.
- Mignatti P, Rifkin DB. Nonenzymatic interaction between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv Cancer Res.* 2000;78:103-57.
- Kusukawa J, Sasaguri Y, Morimatsu M, Kameyama T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(5):530-4.
- O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;127:813-20.
- Keil-Dlouha V, Plauchenaute T, Imhoff JM, Emod I, Blondeaux X, Lambert-Vidmar S. Proteolytic potential of fibronectin and degradation of extracellular matrix. *Pathol Biol (Paris).* 1990;38(10):993-8.
- Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J.* 2004;19(7-9):543-9.
- Wu CC, Chien KY, Tsang NM, Chang KP, Hao SP, Tsao CH, et al. Cancer cell-secreted proteomes as a basis for searching potential tumor markers: nasopharyngeal carcinoma as a model. *Proteomics.* 2005;5(12):3173-82.
- Keryer-Bibens C, Pioche-Durieu C, Villemant C, Souquère S, Nishi N, Hirashima M, et al. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer.* 2006;6:283-290.
- Bockmühl U, Kuchler I, Petersen I. Improved prognostic assessment of head-neck carcinomas by new genetic markers. *HNO.* 2000;48(6):451-6.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in peroxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4):577-80.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
- Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124(9):951-62.
- Carvalho MA, Pinheiro SD, Freitas MR, Silva VC, Lima RC. Biópsia de nasofaringe em serviço de otorrinolaringologia: Correlação clínico histológico. *Arq Int Otorrinolaringol.* 2008;12(1):1-6.
- Chedid HM, Frauzi AS, Dedivitis RA. Avaliação dos fatores clínicos e do tratamento em pacientes com Carcinoma Indiferenciado da Nasofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2008; 74(4):1-18.
- Khanfir A, Frikha M, Ghorbeal A, Driha MM, Daoud J. Prognostic factors in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Radiother.* 2007;11(8):461-4.
- Niedobitek G, Herbst H, Young LS. Epstein-Barr virus and carcinomas. *Int J Clin Lab Res.* 1993;23:17-24.
- McCaffery JD, Gapany M, Faust RA, Davis AT, Adams GL, Ahmed K. Nuclear matrix proteins as malignant markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123(3):283-8.
- Jin C, Jin Y, Wenniberg J, Akervall J, Victor M, Martins F. Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Cytogenet.* 2002;132:85-96.
- Inki P, Joensuu H, Gränman R, Klemi P, Jalkanen M. Association between syndecan-1 expression and outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer.* 1994;70(2):319-23.
- Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, et al. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck.* 1999;21(7):627-38.