

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA**

NÍVEL MESTRADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

**Imunoexpressão de Ki-67 e marcação de AgNOR no
Frente de Invasão Tumoral do Carcinoma
Espinocelular de boca e sua correlação com as
características clínico-morfológicas dos pacientes
tratados no período 2000-2010 no Instituto Nacional
del Cáncer de Montevideo - Uruguay**

AURITA VERONICA BEOVIDE CORTEGOSO

Porto Alegre

2013

AURITA VERONICA BEOVIDE CORTEGOSO

Imunoexpressão de Ki-67 e marcação de AgNOR no Fronte de Invasão Tumoral do Carcinoma Espinocelular de boca e sua correlação com as características clínico-morfológicas dos pacientes tratados no período 2000-2010 no Instituto Nacional del Cáncer de Montevideo - Uruguay

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração em Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Linha de pesquisa: Câncer Bucal

Porto Alegre

CIP - Catalogação na Publicação

CORTEGOSO, AURITA VERONICA BEOVIDE
Imunoexpressão de Ki-67 e marcação de AgNOR no
Frente de Invasão Tumoral do Carcinoma Espinocelular
de boca e sua correlação com as características clínico-
morfológicas dos pacientes tratados no período 2000-
2010 no Instituto Nacional del Câncer de Montevideo -
Uruguay / AURITA VERONICA BEOVIDE CORTEGOSO. --
2013.
48 f.

Orientador: Pantelis Varvaki Rados.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Carcinoma Espinocelular. 2. Proliferação
celular. 3. Prognóstico. 4. Ki-67. 5. AgNOR. I.
Rados, Pantelis Varvaki, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Para a minha família pelo apoio e compromisso neste importante estágio de formação no profissional, a Pablo pela companhia, compreensão e apoio, sem a sua ajuda teria sido impossível fazer esse trabalho, os meus filhos Federico, Sofia, Elisa e Rosina por sua compreensão, colaboração nesta longa travessia.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados, o mais profundo e sincero agradecimento pela oportunidade de me acompanhar no caminho da pesquisa, por sua orientação, o seu conhecimento científico dedicando seu tempo, paciência e, sobretudo, sua humildade de tão boa pessoa.

Ao Prof. Dr. Julio Carzoglio, pelo incentivo para fazer o mestrado, exemplo de competência e seriedade com quien apreendi gostar a patologia, e permitindo-me o acesso ao Laboratório de Anatomía Patologica do Instituto Nacional do Câncer Montevideo Uruguai, para fazer este trabalho.

Á Profa. Fernanda Visioli, agradeço a ajuda, o apoio constante, a tempo e dedicação, o conhecimento científico e a confiança oferecida em todos os momentos.

Á Profa.. Márcia Geiger Oliveira, por sua orientação, apoio tempo e dedicação para fazer consultas deste trabalho.

Às Técnicas Alessandra Selinger, Chris Krebs e Isabel Lauxen do Laboratório de Patologia, por seu trabalho com as laminas histopatológicas, por seu profissionalismo e tempo dedicado a este trabalho.

A Técnica Jimena Freire, do Laboratório de Anatomía Patológica do Instituto Nacional do Câncer por seu profissionalismo na realização do processamento de todo o material de estudo.

Às administrativas Virginia e Estela do Laboratório de Anatomía Patologica do Instituto Nacional do Câncer, pelo tempo dado na procura dos registros dos pacientes e dos blocos de parafina dos casos, deixando seu trabalho e sempre dispostos a ajudar.

Ao diretor do Instituto Nacional do Câncer, Dr. Alvaro Luongo muito obrigado por deixar fazer o meu trabalho com os dados dos pacientes com câncer bucal atendidos no instituto, ao Dr. Julio Balbi chefe do arquivo médico, por permitir o acesso aos prontuários médicos, a Celeste incansável na busca de registros médicos.

Ao Lic. Fernando Massa por sua ajuda com a análise estatística.

Aos professores, Manoela Domingues Martins, Vinícius Coelho Carrard, Manoel Sant'Ana Filho do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS por toda ajuda e apoio durante a realização deste trabalho e por todo tempo dado desde o início do Mestrado.

A Faculdade de Odontologia Udelar de Montevideú, Uruguai, por dar a professores desta universidade a oportunidade de aperfeiçoar e fazer os mestres em nossas áreas de especialização, no âmbito do acordo Udelar-UFRGS, formando a primeira grupo de professores em realizar esta importante experiência.

À todos meus companheiros de Pós-Graduação, com quem tive o grato prazer de compartilhar muitas instâncias deste mestre.

SUMARIO

Resumo	6
1- Introdução	7
2- Objetivos	20
2.1. Objetivo Geral	20
2.2. Objetivos Específicos	20
3- Referências	21
4 - Artigo Científico	28
Resumo	28
Abstract	29
Introdução	30
Materiais e Métodos	32
Resultados	36
Discussão	41
Referências	43
Considerações Finais	48

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o número de AgNORs por núcleo e a expressão de Ki-67 no frente de invasão tumoral e sua correlação com os parâmetros clínicos (TNM), morfológicos (frente de invasão tumoral, graduação histopatológica), do carcinoma de células escamosas da mucosa bucal. Foram incluídos 48 pacientes de um total de 109 pacientes analisados no período de 2000 a 2010. A idade média foi de 63 anos, a língua a localização mais comum representando 41,7% dos casos, e 79,2% dos casos eram os homens. Todos diagnosticados e tratados no Instituto Nacional do Câncer de Montevideo, Uruguai. Todos os espécimes incluídos neste estudo deviam ter presente o frente de invasão (FIT) claramente demonstrado com uma faixa de ilhas de tecido conjuntivo adjacente. Todas as amostras foram obtidas da peça de ressecção do tumor e foram submetidas às técnicas de hematoxilina/eosina, imunohistoquímica para anticorpo Ki-67 e técnica de AgNOR. Observou-se uma correlação significativa nos Carcinomas Espinocelulares localizados em áreas de alto risco (língua, assoalho da boca e trígono retromolar) em comparação com as áreas de baixo risco (mucosa labial, gengiva, palato), por meio da marcação de AgNOR ($p=0,0085$). Neste estudo foi encontrada uma associação do tamanho do tumor para T2 e T3 com a sobrevida dos pacientes ($p=0,036$). Na área de invasão tumoral foi observado que os pacientes com padrão IV do FIT apresentam 60% de grau III de diferenciação celular de acordo com a OMS, 80% eram T3 e 80% evoluíram para óbito. A média de células positivas para Ki-67 foi de $22,3\% \pm 11,89$. O padrão I-IV de FIT expressam positividade para Ki-67 com uma relação inversa ($p<0,032$). Não foi observada associação entre os parâmetros de proliferação celular estudados com o tipo de frente de invasão tumoral, nem com o grau de diferenciação celular.

Palavras-chave: Carcinoma Espinocelular, proliferação celular, prognóstico, Ki-67 e AgNORs.

1-INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CE) constitui aproximadamente 90% das patologias malignas bucais. No mundo, o câncer oral é um dos dez cânceres mais frequentes, com três quartos dos casos em países em vias de desenvolvimento (BARNES et al., 2005), representando de 2 a 4 % de todos os cânceres diagnosticados. Sua taxa bruta de mortalidade mundial é de 7,9 nos homens e de 2,2 nas mulheres por 100.000 habitantes/ano. Esta taxa aumenta com a idade. (GARCIA, GONZALEZ-MOLES, BASCONES, 2005).

A prevalência do câncer bucal na Espanha é de 11,4-17,4/100.000 habitantes, sendo as localizações intraorais mais frequentes: a língua (25,1%) e o assoalho da boca (10,2%) (GARCIA, GONZALEZ-MOLES, BASCONES, 2005).

Na Índia, o câncer da cavidade oral é um dos cinco locais principais de câncer em ambos os sexos. O banco de dados do registro de câncer oral estima que, anualmente, de 75.000 a 80.000 casos de câncer se desenvolvem na Índia; a maioria dos cânceres orais está associada com o hábito de mascar tabaco, e em geral são precedidos por lesões pré-malignas (TENI et al, 2002).

No Brasil, 40 % dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral. Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), o câncer oral ocupa o quinto lugar geral entre a população masculina (2014),

Estimam-se 15.290 novos casos de câncer da cavidade oral, em homens 11.280 e 4.010 em mulheres, para o Brasil, no ano de 2014. (INCA, 2014).

As taxas de mortalidade por câncer da cavidade oral apresentam um declínio na população masculina na maioria dos países. Em mulheres, esse comportamento ainda não pode ser observado, uma vez que o início do uso do tabaco pelas mulheres foi posterior ao dos homens. Contudo, as taxas de incidência para câncer da cavidade oral relacionado à infecção pelo HPV, como

amígdala, base da língua e orofaringe, aumentam entre adultos jovens em ambos os sexos. Parte desse aumento pode ser atribuída a mudanças no comportamento sexual (INCA, 2014).

No Uruguai, a taxa de mortalidade por câncer oral e faríngeo no período 2004-2008 é de 6,46 para homens e 1,16 para mulheres, expresso em taxas ajustadas por idade e por 100.000 habitantes (CHLCC, 2004-2008).

O CE é um tumor extremamente invasivo, constituído por epitélio escamoso maligno que degrada a membrana basal e a matriz extracelular, proliferando em ninhos epiteliais atípicos com diferentes graus de anaplasia celular, dentro do conjuntivo subjacente (NEVILLE et al., 2009).

O CE está fortemente associado a estilos de vida e a fatores de risco, como o hábito do tabaco, consumo de álcool, dieta pobre em antioxidantes, vitaminas e minerais, luz ultravioleta e exposição à radiação principalmente no câncer de lábio inferior, carcinógenos químicos e certos vírus (ANAND et al., 2008 ; DRAGOMIR et al., 2012).

As alterações genéticas que acontecem no desenvolvimento de lesões tumorais se concretizam, prioritariamente, em aberrações cromossômicas, ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (GARCIA, GONZALEZ-MOLES, BASCONES, 2005; PITIYAGE et al., 2009).

O aumento da capacidade proliferativa pode ser um dos primeiros indicadores de transformação maligna, sendo, dessa maneira, relevante analisar imunistoquimicamente as proteínas expressas durante o ciclo celular (DA ROCHA, GRILLO, DE QUEIROZ, 2004; COUTINHO et al., 2010; DRAGOMIR et al., 2012)

A carcinogênese oral é um processo molecular complexo, com múltiplos passos nos quais se acumula o dano genético que implica em uma alteração no ciclo celular e defeitos na reparação do DNA. (GARCIA, GONZALEZ-MOLES, BASCONES, 2005).

Os programas celulares de proliferação, diferenciação, senescência e apoptose estão estreitamente unidos com a regulação do ciclo celular, e as alterações de sua maquinaria foram descritas como uma marca no desenvolvimento do câncer oral (FREIER et al., 2010).

Os tumores de crescimento rápido demonstraram ser profundamente invasivos e com pior prognóstico em comparação com os tumores de lento crescimento. A evidência experimental sugere que o grau de proliferação celular dentro de um tumor é um indicador que permite estimar a sua agressividade biológica (FREIER et al., 2010; WATANABE et al., 2010).

A avaliação prognóstica do CE baseia-se em classificações clínicas e histológicas, embora a maioria dos profissionais tenda a apoiar-se exclusivamente na classificação clínica. Um problema importante com as classificações histológicas é a falta de acordo entre os diferentes observadores (BRYNE, 1991).

O prognóstico dos pacientes com CE é difícil de prever. Os profissionais que atuam em clínica não têm ferramentas ótimas para prever quais pacientes responderão ou não ao tratamento. As decisões terapêuticas são baseadas somente no sistema de gradação TNM, o qual tem suas limitações, não avalia comportamento biológico, não sendo suficiente para avaliar o prognóstico (BRYNE et al., 1989; BRYNE, 1991; BRYNE, 1998).

O sistema TNM é mundialmente aceito para classificar os tumores malignos, sendo T a medida da extensão do tumor primário, N avalia o comprometimento dos linfonodos regionais, M a presença de metástase à distância (AJCC, 2010). A avaliação prognóstica mediante o sistema TNM é limitada dado que avalia somente aspectos clínicos, não levando em consideração as características histopatológicas nem a relação hospedeiro-tumor (ANNEROTH, BATSAKIS, LUNA, 1987; BRYNE et al., 1991).

Uma avaliação que combine as características clínicas e citomorfológicas das neoplasias seria mais precisa para avaliar o comportamento clínico do tumor, oferecer ao paciente maior eficácia

terapêutica e prever melhor o prognóstico. (ANNEROTH, BATSAKIS, LUNA, 1987).

A alta taxa de fracasso no tratamento para os pacientes com CE sugere a necessidade de obter melhores marcadores de prognóstico para identificar tumores agressivos e tumores que não respondem ao tratamento atual, também a presença de células com alterações genéticas associadas com o processo de carcinogênese. Recentes estudos moleculares indicam uma evidência de que a maioria, se não todos, os CE da cabeça e pescoço são desenvolvidos em um campo contíguo de células pré-neoplásicas (BRAAKHUIS, BRAKENHOF, LEEMANS, 2005).

Bryne, em 1998, propõe a hipótese de que a área mais importante para determinar o prognóstico do CE é a zona mais profunda de invasão, frente de invasão tumoral (FIT), e analisa os eventos que ocorrem na FIT, que são: o baixo grau de diferenciação tumoral e o alto grau de dissociação celular. Este fenômeno é frequentemente observado no CE, melanomas e vários adenocarcinomas (gástrico colorretal e próstata). (ANNEROTH, BATSAKIS, LUNA, 1987; BRYNE et al., 1991; BRYNE et al., 1992; BRYNE, 1998; BANKFALVI, PIFFIKO, 2000; DISSANAYAKE et al., 2003; KUROKAWA et al., 2005).

O aumento da proliferação celular, a diminuição da apoptose e a perda da adesão célula-célula são características comuns dos tumores malignos (BRYNE, 1998); além disso, é necessário acrescentar que as interações entre o hospedeiro e a área da FIT são cruciais para a propagação do tumor .

As características histológicas do CE podem ser amplamente diferentes de uma zona a outra dentro do mesmo tumor (KUROKAWA et al., 1999; KUROKAWA et al., 2000; DISSANAYAKE et al., 2003). Acredita-se que a zona mais útil para prever o prognóstico é a frente invasiva dos tumores, pois nela, presumivelmente, residem as células mais agressivas (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987; BRYNE, 1998; SPIRO et al, 1998; DISSANAYAKE et al., 2003)

Soland et al. (2008) definem como a frente de invasão tumoral como o conjunto de células mais próximas (uma a duas camadas de células tumorais) do tecido conjuntivo, na zona mais profunda do tumor.

A atividade biológica do CE é avaliada e classificada como bem, moderada e pobremente diferenciada. Broder desenvolveu principalmente esta classificação quantitativa de câncer em 1920, sugerindo que os tumores pobremente diferenciados representam cânceres com pior prognóstico. A falta de correlação entre os graus de Broders e o prognóstico de CE tem sido explicada pelo fato de que o carcinoma normalmente exibe uma população heterogênea de células com prováveis diferenças na invasividade e no comportamento metastático (ANNEROTH, BATSAKIS, LUNA, 1987).

O grau histológico baseado na classificação de Broders tem sido uma ferramenta tradicional patológica com valor prognóstico documentado, mas não tem sido incorporado a estratégias padronizadas de planejamento terapêutico (ROLAND et al., 1992). Isso é devido, principalmente, à subjetividade do sistema de classificação e à falta de consenso em relação a seu valor prognóstico e sua reprodutibilidade (Bryne, 1992).

Bryne et al., 1989, desenvolveram uma classificação histológica da FIT em quatro grupos baseados nos critérios propostos por Anneroth et al., 1987:

- Grau 1: borda bem definida expansiva, que empurra “pushing”;
- Grau 2: borda de avanço do tumor infiltrante em cordões sólidos, banda , e fileiras;
- Grau 3: margens com pequenos grupos e cordões de células infiltrantes;
- Grau 4: margens com infiltração difusa e marcada dissociação celular em pequenos grupos ou, inclusive, células individuais (Figura 1).

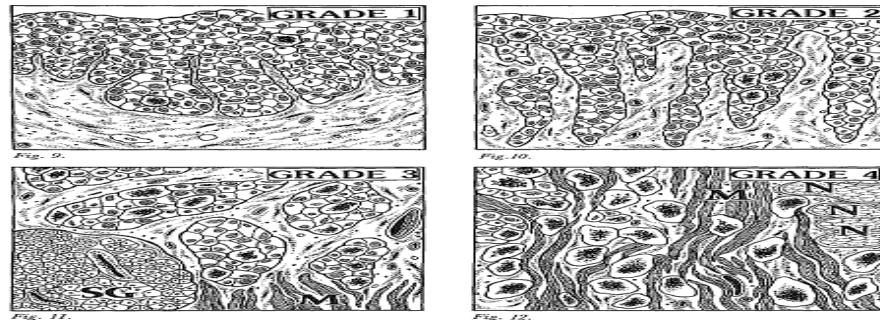


Fig.1-Esquema dos padrões de invasão retirado de Anneroth et. al., 1987.

Bryne et al., 1992, introduzem um sistema de classificação multifatorial de malignidade, em que a margem profunda de invasão do CE resultou ser de alto valor prognóstico. Nesse sistema de classificação, avaliam-se cinco aspectos morfológicos: grau de queratinização, polimorfismo nuclear, modo de invasão (frente de invasão) e infiltração linfo-plasmocitária. Cada um desses fatores é avaliado com um score de 1 a 4. Tabela 1 (ANNEROTH, BATSAKIS, LUNA, 1987; BRYNE et al., 1989; BRYNE et al., 1991; BRYNE et al., 1992).

Tabela 1- Sistema de graduação de malignidade (Bryne et al. 1992).

PROGNOSTIC VALUE OF INVASIVE CELLS				
	Score			377
Morphological feature	1	2	3	4
Degree of keratinization	Highly keratinized (> 50% of the cells)	Moderately keratinized (20–50% of the cells)	Minimal keratinization (5–20% of the cells)	No keratinization (0–5% of the cells)
Nuclear polymorphism	Little nuclear polymorphism (> 75% mature cells)	Moderately abundant nuclear polymorphism (50–75% mature cells)	Abundant nuclear polymorphism (25–50% mature cells)	Extreme nuclear polymorphism (0–25% mature cells)
Number of mitoses (high power field)*	0–1	2–3	4–5	> 5
Pattern of invasion	Pushing, well-delineated infiltrating borders	Infiltrating, solid cords, bands and/or strands	Small groups or cords of infiltrating cells ($n > 15$)	Marked and widespread cellular dissociation in small groups and/or in single cells ($n < 15$)
Lymphoplasmacytic infiltration	Marked	Moderate	Slight	None

*This parameter may be excluded from the grading (see Discussion).

Os eventos moleculares na frente de invasão incluem aumento da angiogênese, alteração das moléculas de adesão, superprodução de enzimas que degradam a matriz extracelular e um incremento na expressão de proteínas relacionadas com a proliferação celular (Figura 2) (BRYNE, 1998; TUMULURI, THOMAS, FRASER, 2002).

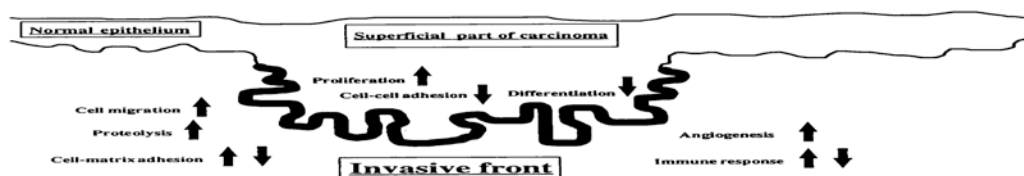


Figura 2-Esquema dos eventos que ocorrem na frente de invasão tumoral (retirado de Bryne, 1998).

As mudanças na degradação proteolítica nos tecidos adjacentes ao tumor são necessárias durante o processo de invasão tumoral (BRYNE, 1998). Portanto, os aspectos para determinar a agressividade biológica do CE mais promissores estão vinculados à zona de avanço do tumor hoje conhecido como frente de invasão tumoral (FIT), com suas características histopatológicas, funcionais e imunofenotípicas específicas (BRYNE, 1998).

A FIT tem demonstrado ser de alto valor prognóstico como um suplemento ao TNM, existindo provas suficientes para propor sua introdução em ensaios clínicos prospectivos. Os clínicos recomendam fazer biópsias de maior tamanho que incluam a área da FIT (BRYNE, 1998). Morfologicamente, a FIT reflete várias interações moleculares que são cruciais para a progressão do carcinoma (BRYNE, 1991; BRYNE et al., 1992; BRYNE, 1998).

Castro Araújo Júnior e Ramos, (2005) analisaram 38 casos de CE, avaliando a classificação clínica TNM e as características histológicas das áreas mais profundas do tumor conforme descrito por Bryne em 1998. Os autores concluíram que as áreas invasivas podem ser as responsáveis primárias pelo comportamento clínico do tumor, o que pode ser importante para escolher a terapia do carcinoma espinocelular.

Kurokawa et al., 2005, realizaram um estudo retrospectivo sobre os dados clínico-patológicos de 124 pacientes com carcinoma de língua para determinar os fatores preditivos de metástase ganglionar cervical e seu prognóstico. Para a gradação histológica da FIT, foram usados os critérios de Bryne, 1995. Os autores observaram que as taxas de sobrevida aos 5 anos diferiam significativamente conforme os seguintes fatores clínico-patológicos: tamanho tumoral, estágio clínico, espessura tumoral, aspecto microscópico, metástase ganglionar, invasão microvascular e o escore da FIT. A análise multivariável determinou que um escore ≥ 8 da FIT, uma profundidade tumoral ≥ 4 mm e a presença de metástases nodulares diminuíam a sobrevida dos pacientes e que a FIT ≥ 11 tinha um valor indicativo de metástase nodular em carcinoma espinocelular de língua. Os autores concluíram que um alto escore da FIT tem elevado valor prognóstico em câncer de língua (TUMULURI, THOMAS, FRASER, 2005).

Noguchi et al., 2002, comprovaram a importância da FIT através da análise de DNA das células da FIT em 195 pacientes com CE. Os autores determinaram que o conteúdo anormal de DNA na FIT, o estágio clínico e o tipo de crescimento tumoral são fatores prognósticos independentes que influenciam significativamente a sobrevida dos pacientes.

Sawair et al., 2003, analisaram 102 casos de CE e avaliaram a reprodutibilidade do sistema de gradação da FIT e seu valor prognóstico. Observou-se que o padrão de invasão estava significativamente associado com a presença de metástase. Dessa maneira, os autores confirmam o valor potencial da FIT como fator prognóstico nos pacientes com CE, sugerindo a importância no planejamento terapêutico e na identificação dos pacientes com mais risco de sofrer metástase.

Lindenblatt et al., 2012, compararam quatro sistemas de classificação: multi parâmetros de classificação, classificação das margens de invasão, sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde, e avaliação histológica de riscos; para carcinomas de células escamosas bucais e avaliaram cada sistema com base em parâmetros clínico-patológicos e

sobrevida dos pacientes. A avaliação de riscos histológica demonstrou os melhores resultados para a previsão de sobrevivência em carcinomas bucais. Para a avaliação do risco histológico, o pior padrão de invasão, infiltrado linfocítico e invasão perineural foram avaliados.

Santos et al., 2013, avaliaram o grau histopatológico de malignidade em uma série de carcinomas do lábio inferior, usando três sistemas de classificação histopatológicos (sistema do fronte de invasão, sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) e avaliação de risco histológico), e sugerem que a melhor opção para prever o comportamento biológico é a avaliação histopatológica de risco desenvolvido por Brandwein-Gensler.

Geralmente, a maioria dos tumores consiste em populações celulares heterogêneas com comportamento biológico variável, por sua vez o comportamento do tumor depende de uma complexa inter-relação entre o tumor e o hospedeiro. A evidência sugere que as células presentes na FIT do carcinoma têm diferentes características moleculares do que nas áreas superficiais do tumor, o que torna a FIT a área mais importante do tumor para avaliar o prognóstico (BRYNE et al., 1989; BRYNE et al., 1991).

Mudanças na degradação proteolítica nos tecidos adjacentes ao tumor são necessários durante o processo de invasão tumoral. As MMP-2 e MMP-9 são as enzimas proteolíticas, responsáveis pela degradação do colágeno e pela gelatina da matriz extracelular, seus níveis de expressão se relacionam com as metástases aos linfonodos linfáticos e com um pior prognóstico nos pacientes com carcinomas de cabeça e de pescoço, afetando diretamente a invasividade do tumor e as metástases (WU MH et al., 2009).

Os distúrbios nos mecanismos de controle da diferenciação celular, na migração, na renovação celular, além da morte (apoptose), bem como as alterações na interação epitélio-mesênquima e na interface hospedeiro-tumor correspondem ao comportamento maligno dos carcinomas (BANKFALVI, PIFFKO, 2000).

Sabe-se que o crescimento da população de células tumorais depende ao menos de três fatores:

- 1- Porcentagem de células em ciclo celular (parâmetro estático);
- 2- Duração do ciclo celular (parâmetro dinâmico); e
- 3- Velocidade de perda celular (apoptose).

Portanto, é difícil entender a biologia da proliferação celular e encontrar correlação clinicamente relevante em relação à evolução dos pacientes avaliando separadamente os “marcadores de proliferação”, como: contagem mitótica, fração de crescimento da fase S, nível de Ki-67, etc. (BANKFALVI; PIFFKO, 2000).

O melhoramento atual das técnicas de recuperação antigênica em estudos imunoistoquímicos em material de arquivo (BANKFALVI et al., 1994) e a determinação das proteínas associadas à regiões organizadoras nucleolares mediante técnicas de impregnação por prata (AgNORs) (OFNE et al., 1994) resultaram em métodos reproduzíveis para a avaliação de ambos os parâmetros, estático (Ki-67/MIB1, fator de crescimento) e dinâmico da proliferação celular (AgNORs) .

A expressão de Ki-67 carece de valor prognóstico, provavelmente devido ao fato de que é um marcador da fração total de células proliferantes, que corresponde não somente às células em proliferação constante, mas também à proliferação das células destinadas à diferenciação terminal (GONZALEZ-MOLES et al., 2010).

O autor apresenta a controvérsia dos resultados nos diferentes estudos, devido, em parte a diferenças na metodologia para medir a proliferação celular, incluindo: diferentes critérios para a quantificação do Ki-67, a avaliação da expressão na zona de frente de invasão do tumor contra outras zonas do tumor e as variações no enfoque adotado para a recontagem de células positivas, entre outros (GONZALEZ-MOLES et al., 2010).

O Ki-67 é um antígeno nuclear humano presente na matriz nuclear de células proliferantes, que se expressa em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2, M), exceto em G0, com um pico máximo de concentração em G2 e M; é um indicador de células tumorais em fração de crescimento, relaciona-se com a progressão da doença e com um pobre prognóstico (WATANABE et al.; 2010).

Os marcadores de proliferação podem ser agrupados em três categorias:

- 1- Marcador de fração de crescimento (Ki-67);
- 2- Marcadores específicos de fases do ciclo celular; e
- 3- Marcadores do tempo do ciclo celular, que medem a velocidade da atividade proliferativa (AgNOR) (GONZALEZ-MOLES et al., 2010).

Piffko et al., 1999, observam que a frente de invasão tumoral do CE está composto por subpopulações com alta atividade proliferativa.

Tumuluri et al., 2004, reportam que a atividade proliferativa (Ki-67) na frente de invasão tumoral está fortemente correlacionada com o grau histológico de malignidade do CE.

Há estudos que demonstram uma correlação significativa entre os níveis de imunoreatividade do antígeno Ki-67 com os escores da FIT em CE, indicando que altos índices de Ki-67 podem indicar malignidade biológica (KUROKAWA et al., 2005).

Interessantemente, outros autores analisam os AgNORs em linhas celulares de carcinomas espinocelulares, considerando-os um marcador de velocidade de proliferação celular, com valor prognóstico (DONG et al., 1997).

Um dos métodos para análise da proliferação celular é a técnica da impregnação pela prata das regiões organizadoras nucleolares (NORs). Os NORs são argirofílicos e podem ser visualizados com essa técnica de coloração, o que resultou no termo AgNOR (CANO et al., 2002; HANEMANN, MIYAZAWA, SOUZA, 2011).

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são segmentos de DNA que em humanos localizam-se no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 e servem de molde para a codificação do RNA ribossômico (CANO et al., 2002; ESLAMI, et. al. 2006). Com a técnica de impregnação pela prata, observa-se as NORs que estão sendo ativamente transcritas (HERNADEZ-VERDUN, 1983) visualizadas como pequenos pontos pretos no interior do núcleo amarronzado.

A impregnação com prata das regiões ativas dos AgNORs, foi aplicada a uma variedade de lesões com o fim de proporcionar mais informação sobre sua atividade nucleolar (PLOTON et al., 1986).

O nucléolo é a zona onde o ribossomo RNA (rRNA) se transcreve. Em geral, os nucléolos de células cancerosas são maiores e mais numerosos em comparação com as células normais. Nos últimos anos, grupos de pesquisa desenvolveram estudos das possíveis aplicações para o diagnóstico e o prognóstico com a impregnação de AgNOR. Aumento nas estruturas nucleolares (AgNORs), resulta na síntese de rRNA, sendo esta a razão pela qual foi proposto o parâmetro AgNOR como um marcador confiável para a avaliação da rapidez da proliferação celular (HANEMANN; MIYAZAWA; SOUZA, 2011). Esta técnica de impregnação com prata está diretamente relacionada com o nível de r-DNA (DNA ribossômico) e a contagem de NORs em células com proliferação ativa aumenta (OLIVEIRA et al., 2005).

Portanto, o estudo dos AgNORs proporciona um melhor entendimento do comportamento tumoral. Foi reportado como um fator de discriminação entre certas lesões benignas e malignas, o que reflete a atividade das células proliferativas. (OLIVEIRA et al., 2005; KHIAMI et al., 2012).

Uma correlação entre o aumento de AgNORs, diminuição da diferenciação e o aumento da malignidade é conhecida. Esta correlação foi observada em linfomas não Hodgkin, lesões melanocíticas de pele, tumores de mama, tumores cutâneos, neoplasia óssea maxilar, carcinomas nasofaríngeos e tumores das glândulas salivares (CROKER, EGAN, 1988).

O número de AgNORs por núcleo se relaciona com a velocidade de progressão do ciclo celular. Uma alta contagem de AgNOR caracteriza os tumores com atividade metabólica aumentada, que provavelmente tenham um alto conteúdo de DNA ou tumores pobremente diferenciados que proliferam rapidamente. Portanto, indicam um prognóstico desfavorável (PICH et al., 2000).

Oliveira et al., 2005, analisaram a relação entre o valor médio total de AgNORs (mAgNOR) e/ou a porcentagem de células com 1, 2, 3, 4 ou mais AgNORs (pAgNOR) com a gradação histopatológica do carcinoma de células escamosas da língua de acordo com a classificação Wahi. Os autores confirmaram que a contagem de mAgNORs e/ou pAgNOR tem uma relação direta com a classificação histopatológica Wahi e sugeriram a técnica AgNOR para ser utilizada como um marcador biológico de progressão tumoral em carcinomas de células escamosas de língua, especialmente nos tumores de grau II.

Na pesquisa do câncer, um dos principais objetivos é o estudo de marcadores moleculares que possam predizer o prognóstico ou a resposta ao tratamento de forma individual.

O objetivo deste trabalho é avaliar o número de AgNORs por núcleo e a expressão de Ki-67 no fronte de invasão tumoral e sua correlação com os parâmetros clínicos (TNM), morfológicos (gradação histopatológica), do carcinoma de células escamosas da mucosa bucal.

2- OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Investigar a imunexpressão de KI-67 e a marcação de AgNORs no fronte de invasão tumoral do carcinoma espinocelular e sua correlação com os parâmetros clínicos (gênero, idade, localização, TNM, estágio clínico (I – IV, sobrevida) e morfológicos (grau de diferenciação do CE conforme a OMS, padrão da fronte de invasão tumoral).

Objetivos Específicos

- Descrever a imunomarcagem de Ki-67 nos 4 padrões de classificação do fronte de invasão tumoral do carcinoma espinocelular bucal.
- Contagem de AgNOR (mAgNOR e pAgNOR) nos 4 padrões de classificação da fronte de invasão tumoral do Carcinoma espinocelular.
- Analisar a correlação existente entre a marcação de Ki-67 e AgNOR na fronte de invasão do Carcinoma espinocelular.
- Analisar a correlação existente entre a marcação de Ki-67 e AgNOR na fronte de invasão e os parâmetros clínico-morfológicos do Carcinoma espinocelular.
- Analisar a correlação existente entre a sobrevivência dos pacientes e o tamanho do tumor.

3- REFERÊNCIAS

AJCC Cáncer Staging Handbook (ed. 7), **New York, Springer, 2010.**

ANAND PREETHA, KUNNUMAKARA AJAIKUMAR B., SUNDARAM CHITRA, HARIKUMAR KUZHUVELIL B., THARAKAN SHEEJA T., LAI OIKI S., SUNG BOKYUNG, AND AGGARWAL BHARAT B.. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. ***Pharmaceutical Research, September 2008; Vol. 25, No. 9.***

ANNEROTH G, BATSAKIS J, LUNA M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. ***Scand J Dent Res. 1987;95:229–49.***

BANKFALVI A, OFNER D, PIFFKO J, SCHMID KW. Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma of human oral mucosa. ***Cancer. 1994, Dec 15;74 (12):3245-7.***

BANKFALVI A, PIFFKO J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumor front. ***J Oral Pathol Med. 2000; 29: 291–8.***

BARNES L., Eveson J.W., Reichart P., Sidransky D. (Eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours ***IARC Press: Lyon 2005***

BRAAKHUIS BJM, BRAKENHOFF RH, LEEMANS CR. Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention? ***Oncologist 2005, 10; 493–500.***

BRANDWEIN-GENSLER M., TEIXEIRA MD., MING LEWIS C., et al. Oral Squamous Cell Carcinoma. Histologic Risk Assessment, but Not Margin Status, Is Strongly Predictive of Local Disease-free and Overall Survival. ***Am J. Surg Pathol 2005;29:167-178.***

BRODERS AC. Squamous-cell epithelioma of the lip. *J Am Med As.mc.* **1920;74: 656-64.**

BRYNE M, KOPPANG HS, LILLENG R, STENE T, BANG G, DABELSTEEN E . New malignancy grading is a better prognostic indicator than Borders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* **1989;18, 432.**

BRYNE M, NIELSEN K, KOPPANG HS, DABELSTEEN E .Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. *J. Oral Pathol. Med.* **1991;20, 369.**

BRYNE M. Prognostic value of various molecular and cellular features in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **1991; 20: 413–20.**

BRYNE, M.; KOPPANG, H.S.; LILENG, R.; KJAERHEIM,A. Malignancy Grading of the Deep Invasive Margins of Oral Squamous Carcinoma Has High Prognostic Value. *J Pathol*, **1992; v.166, no 4, p.375-381.**

BRYNE M, JENSSEN N, BOYSEN M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch* **1995; 427: 277–81.**

BRYNE, M. Is the Invasive Front of an Oral Carcinoma the Most Important Area for Prognostication? *Oral Diseases*, **1998; v.4, no 2 , p.70-77.**

CANO LC, ÁLVAREZ GJ, VALENCIA WA, RAMÍREZ JA PRADA CA. Análisis del marcador AgNOR en leucoplasia carcinoma escamolecular oral. *Medicina Oral* **2002; 7: 17-25 .**

CHLCC- COMISION HONORARIA DE LUCHA CONTRA EL CANCER –RNC Registro Nacional de Cáncer. BARRIOS,E;VASSALLO,J.A.et al. **IV ATLAS DE MORTALIDAD POR CANCER EN EL URUGUAY 2004-2008**

COUTHINO-CAMILO CM, LORENZO SV, NISHIMOTO IN, KOWALSKI LP & SOARES FA. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristic of squamous cell carcinomas. ***Histopathology*** **2010;57,304-316.**

CROCKER J, EGAN MJ. Correlation between NOR sizes and numbers in Non-Hodgkin's lymphomas. ***J Pathol*** **1988; 56:223–39.**

DA ROCHA B.,GRILLO M.,DE QUEIROZ S. Oral squamous cell carcinoma contribution of oncogenic virus and some molecular markers in the development and prognosis of the lesion: a review .***Rev Bras Otorrinolaringol.*** **2004;V.70, n.3, 385-92.**

De P Santos HB, do Ó Silva AL, de A Cavalcante LH, M Alves P, P Godoy G, W Nonaka CF. Histopathological grading systems and their relationship with clinical parameters in lower lip squamous cell carcinoma. ***Int J Oral Maxillofac Surg.*** **2013 Nov 26. pii: S0901-5027 (13) 01160-0. doi:10.1016/j.ijom.2013.10.021.**

DISSANAYAKE U, JOHNSON NW, WARNAKULASURIYA KA. Comparison of cell proliferation in the centre and advancing fronts of oral squamous cell carcinomas using Ki-67 index. ***Cell Prof.f.:*****2003;36:255-264.**

DONG H, BERTLER C, SCHNEIDER E, RITTER MA. Assessment of cell proliferation by AgNOR scores and Ki-67 labeling indices and a comparison with potential doubling times. ***Cytometry*** **1997; 28:280–8.**

DRAGOMIR L.P., SIMIONESCU, MĂRGĂRITESCU CL., STEPAN A., DRAGOMIR IULIANA MANUELA, POPESCUM. R. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. ***Rom J Morphol Embryol.*** **2012, 53(1):89–93.**

ESLAMI B., RAHIMI H., RAHIMI F., KHIAMI M. M., EBADIFAR A..Diagnostic value of silver nitrate staining for nucleolar organizer regions in selected head and neck tumors. **J. Cancer Res.Ther. 2006 ; (2)3:129-131.**

FREIER K, HOFELE C, KNOEPFLE K, GROSS M, DEVENS F, DYCKHOFF G, PLINKERT P, HEROLD-MENDE C. Cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma cell lines as model systems for the functional analyses of tumor-associated genes.**J Oral Pathol Med. 2010; May;39:382-9.**

GARCIA GARCIA, V; GONZALEZ-MOLES, MA; BASCONES MARTINEZ, A. Bases moleculares del cáncer oral: Revisión bibliográfica. **Av Odontoestomatol, 2005, Madrid, v. 21, n. 6, dic.**

GONZALEZ-MOLES M.A., RUIZ-AVILA I., GIL-MONTOYA J.A , ESTEBAN F., BRAVO M. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: Why Ki-67 is not a prognostic indicator .**Oral Oncology 2010,46: 525–530.**

HANEMANN JOÃO ADOLFO COSTA, MIYAZAWA MARTA , SOUZA MIREILE SÃO GERALDO DOS SANTOS.Histologic grading and nucleolar organizer regions in oral squamous cell carcinomas. **J Appl Oral Sci. 2011; 19(3):280-5**

HERNANDEZ-VERDUN,D. The Nucleolar Organizer Regions. **Biol Cell, France.1983 (49), no 3: 191-202.**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em URL: **<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?>**

KHIAMI M. M., VOSOUGHHOSSEINI S. , HALIMI M., MAHMOUDI S. M., YARAHMADI A.Nucleolar Organizer Regions in Oral Squamous Cell Carcinoma.**Journal Dental Research Dental Clinics Dental Prospects 2012;(6),1:17-20.**

KUROKAWA H, YAMASHITA Y, TAKEDA S, ET AL. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 protein correlate with prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma. ***Fukuoka Acta Med* 1999; 90:6–13.**

KUROKAWA H, YAKASHITA Y, TAKEDA S, ET AL. Estimation of tumor necrosis factor and manganese superoxide dismutase in oral squamous cell carcinoma available methods for predicting the prognosis and monitoring the treatment. ***Asian J Oral Maxillofac Surg* 2000; 12: 141–8.**

KUROKAWA H, ZHANG M, MATSUMOTO S, YAMASHITA Y, TOMOYOSE T, TANAKA T, FUKUYAMA H, TAKAHASHI T. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of the tongue squamous cell carcinoma. ***J. Oral Pathol. Med.* 2005; v.34.nº 6, p. 329-333.**

NEVILLE B, DAMM D, ALLEN C, BOUQUOT J. ORAL AND MAXILLOFACIAL PATHOLOGY. **3RD ED. PHILADELPHIA, PA, USA: WB SAUNDERS; 2009.**

NOGUCHI M, KINJYO H, KOHAMA GI, NAKAMORI K. Invasive front in oral squamous cell carcinoma: Imagen and flow cytometric analysis with clinocopathologic correlation. ***Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod*, 2002; v.93, nº 6, p. 682-687.**

OFNER D, BANKFALVI A, RIEHEMANN K, BIER B, BÖCKER W, SCHMID KW. Wet autoclave pretreatment improves the visualization of silver-stained nucleolar organizer-region-associated proteins in routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. ***Mod Pathol.* 1994 Dec;7(9):946-50.**

OLIVEIRA, M.G.; LAUXEN, I.S.; NETO, M. M.; RADOS, P.V.; JAEGER, F.; KAIZER, M.R.; SANT'ANA FILHO, M. Tongue Squamous Cell Carcinoma: Relationship Between Argyrophilic Nucleolar Organizer (AgNORs) and

Histopathologic Grading. Applied Cancer Research, 2005;São Paulo, v. 25, n.1, p.20-24.

PICH, A.; CHIUSA., L.; MARGARIA, E. Prognostic Relevance of AgNORs in Tumor Pathology Micron, Oxford,2000;v. 31, p. 133-141.

PITIYAGE G, TILAKARATNE WM, TAVASSOLI M, WARNAKULASURIYA S.Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. ***J Oral Pathol Med.*** 2009 Nov;**38(10):737-52.**

PLOTON D, MENAGER M, JEANNESSON P, HIMBER G, PIGEON F, ADNET JJ. Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. ***Histochem J.*** 1986;**18:5-14.**

SAWAIR ,F. ET AL.Invasive front grading:reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma.***J.Oral Pathol. Med.*** 2003;**V.32,nº 1,1-9.**

SØLAND T.M., HUSVIK C., STRØMME KOPPANG A. et al. A study of phosphorylated ERK1/2 and COX-2 in early stage (T1–T2) oral squamous cell carcinomas. ***J. Oral Pathol.Med.*** 2008;**37: 535–542.**

SPIRO R.H., GUILLAMONDEGUI O., PAULINO A.F., HUVOS A.G.Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer.***Head & Neck*** 1999;**21 (5):408-413.**

TENI T.,PAWAR S., SANGHVI V., SARANAT D.;HExpresión of Bcl-2 and Bax In Chewing Tobacco-Induced Oral Cancers and Oral Lesions from India. ***Pathology Oncology Research*** 2002; **Vol 8, No 2: 109-14.**

TUMULURI V, THOMAS GA, FRASER IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. ***J Oral Pathol Med* 2002; 31:598-604.**

TUMULURI V, THOMAS GA, FRASER IS. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. ***J Oral Pathol Med.* 2004 Apr;33(4):204-8.**

WATANABE S, WATANABE R, OTON-LEITE AF, ALENCAR RDE C, OLIVEIRA JC, LELES CR, BATISTA AC, MENDONÇA EF. Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. ***J Oral Sci.* 2010 Sep;52(3):417-24.**

WU MH, HONG TM, CHENG HW, PAN SH, LIANG YR, HONG HC, CHIANG WF, WONG TY, SHIEH DB, SHIAU AL, JIN YT, CHEN YL. Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. ***Mol Cancer Res.* 2009 Mar; 7(3):311-8.**

Expressão imunoistoquímica de Ki-67 e marcação de AgNOR no frente de Invasão Tumoral (FIT) do carcinoma espinocelular de boca e a correlação com parâmetros clínico-morfológicos

Artigo a ser submetido ao periódico Oral Diseases.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o número de AgNORs por núcleo e a expressão de Ki-67 no frente de invasão tumoral e sua correlação com os parâmetros clínicos (TNM), morfológicos (frente de invasão tumoral, graduação histopatológica), do carcinoma de células escamosas da mucosa bucal. Foram incluídos 48 pacientes de um total de 109 pacientes analisados no período de 2000 a 2010. A idade média foi de 63 anos, a língua a localização mais comum representando 41,7% dos casos, e 79,2% dos casos eram os homens. Todos diagnosticados e tratados no Instituto Nacional do Câncer de Montevideo, Uruguai. Todos os espécimes incluídos neste estudo deviam ter presente o frente de invasão (FIT) claramente demonstrado com uma faixa de ilhas de tecido conjuntivo adjacente. Todas as amostras foram obtidas da peça de ressecção do tumor e foram submetidas às técnicas de hematoxilina/eosina, imunoistoquímica para anticorpo Ki-67 e técnica de AgNOR. Observou-se uma correlação significativa nos Carcinomas Espinocelulares localizados em áreas de alto risco (língua, assoalho da boca e trígono retromolar) em comparação com as áreas de baixo risco (mucosa labial, gengiva, palato), por meio da marcação de AgNOR ($p=0,0085$). Neste estudo foi encontrada uma associação do tamanho do tumor para T2 e T3 com a sobrevida dos pacientes ($p=0,036$). Na área de invasão tumoral foi observado que os pacientes com padrão IV do FIT apresentam 60% de grau III de diferenciação celular de acordo com a OMS, 80% eram T3 e 80% evoluíram para óbito. A média de células positivas para Ki-67 foi de $22,3\% \pm 11,89$. O padrão I-IV de FIT expressam positividade para Ki-67 com uma relação

inversa ($p < 0,032$). Não foi observada associação entre os parâmetros de proliferação celular estudados com o tipo de frente de invasão tumoral, nem com o grau de diferenciação celular.

Palavras-chave: Carcinoma Espinocelular, proliferação celular, prognóstico, Ki-67 e AgNORs.

Immunohistochemical expression of Ki-67 and AgNOR marking the forehead of Tumor Invasion (FIT) of squamous cell carcinoma and correlation with clinical and morphological parameters

Abstract

The aim of this study was to evaluate the AgNORs count per nucleus and the expression of Ki-67 in the front of tumor invasion and their correlation with clinical (TNM), morphological (front tumor invasion, histological classification) parameters of squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. 48 of a total of 109 patients analyzed in the period from 2000 to 2010 were included. The average age was 63 years old, the most common location was the tongue representing 41,7% of cases, and 79,2% were men. All the patients were diagnosed and treated at the National Cancer Institute of Montevideo, Uruguay. All specimens included in this study should have the invasive front (FIT) clearly demonstrated with a range of islands adjacent connective tissue. All samples were subjected to the techniques of hematoxylin / eosin staining, immunohistochemistry for Ki-67 and AgNOR technique. There was a significant correlation of squamous cell carcinoma localized in high-risk areas (tongue, floor of mouth and retromolar trigone) with AgNOR quantification ($p = 0.0085$). In this study an association of tumor size for T2 and T3 with the patients survival ($p=0,036$) was found. In the area of tumor invasion was observed that 60% of patients with pattern IV of FIT were grade III of cell differentiation according to the WHO, 80% were T3 and 80% died during follow-up. The average number of cells positive for Ki-67 was $22.3 \pm 11.89 \%$. The I - IV standard FIT showed an inverse relationship ($p < 0.032$) with expression of Ki-67. No association was observed between the studied parameters of cell

proliferation with the type of tumor invasion front, or with the degree of cell differentiation.

Key-words: squamous cell carcinoma, cell proliferation, prognosis, Ki-67 and AgNORs.

Introdução

O Carcinoma espinocelular (CE) é uma neoplasia maligna que se desenvolve a partir da mucosa saudável ou de lesões pré-existentes da cavidade oral. A nível mundial o câncer oral é um dos dez tipos mais frequente, representa de 2 a 4% de todos os cânceres diagnosticados (1).

O CE está fortemente associado com estilos de vida e fatores de risco como o hábito de fumar; etilismo; dieta pobre em antioxidantes, vitaminas e minerais; exposição à luz ultravioleta, especialmente nos casos de lábio inferior, a carcinógenos químicos e certos vírus. A carcinogênese oral é um processo molecular complexo, com múltiplos passos onde o dano genético se acumula levando a uma alteração celular com perda da regulação do ciclo celular e defeitos no reparo do DNA (2-5).

A avaliação prognóstica mediante o sistema TNM é limitada, pois avalia somente aspectos clínicos, não leva em consideração as características histopatológicas, nem a relação tumor-hospedeiro (6-9).

Bryne em 1992 lançou a hipótese de que a área mais importante para determinar o prognóstico do CE é a zona mais profunda de invasão, o fronte de invasão tumoral (FIT) e analisa os aspectos morfológicos como: grau de queratinização, polimorfismo nuclear, padrão de invasão (fronte de invasão) e infiltrado linfoplasmocitário (7,9,10-12).

Os eventos moleculares no fronte de invasão incluem aumento de angiogênese, alteração das moléculas de adesão, superprodução de enzimas que degradam a matriz extracelular e um incremento na expressão de proteínas relacionadas à proliferação celular (6,10,13).

O melhoramento atual das técnicas de recuperação antigênica em estudos imunoistoquímicos em material de arquivo (14) e a determinação das proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares mediante técnicas de impregnação por prata (AgNORs) (15), resultaram em métodos reprodutíveis para a avaliação de parâmetros, estático (Ki-67/MIB1 fator de crescimento) e dinâmico da proliferação celular (AgNORs) (9,16)

O Ki-67 é um antígeno nuclear humano que se expressa em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2, M), exceto em G0, com um pico máximo de concentração em G2 e M; estando relacionado com a progressão da lesão e prognóstico pobre (17). Há estudos que demonstraram uma correlação significativa entre os níveis de imunoreatividade do antígeno Ki-67 com os escores do FIT em CE, indicando que altos índices de Ki-67 podem indicar malignidade biológica (8,9,13,18).

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são segmentos de DNA que em humanos localizam-se no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 e servem de molde para a codificação do RNA ribossômico (19-21). Com a técnica de impregnação pela prata, observa-se as NORs que estão sendo ativamente transcritas (23) visualizadas como pequenos pontos pretos no interior do núcleo marron (19,24)

A impregnação por prata das regiões organizadoras nucleolares ativas (NORs), que são conhecidas como AgNORs, tem sido aplicada a uma variedade de lesões com o propósito de proporcionar mais informações sobre sua atividade nucleolar (23,24).

Uma alta contagem de AgNOR caracteriza os tumores com atividade metabólica aumentada, que provavelmente tem um alto conteúdo de DNA ou tumores pobremente diferenciados e que proliferam rapidamente. Portanto, indicam um prognóstico desfavorável (21,24-26).

O objetivo deste trabalho é avaliar o número de AgNORs por núcleo e a expressão de Ki-67 no fronte de invasão tumoral e sua correlação com os parâmetros clínicos (TNM), morfológicos (fronte de invasão tumoral, graduação histopatológica), do carcinoma espinocelular da mucosa bucal.

Materiais e Métodos

Este é um estudo retrospectivo, analítico. No levantamento total foram identificados 109 pacientes com CE obtidos do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto do Câncer (INCA) (Montevideo, Uruguay), entre janeiro de 2000 a dezembro de 2010. Depois da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, descritos no quadro 1, foram excluídos 61 pacientes, e a amostra final foi composta por quarenta e oito espécimes de CE.

Todos os pacientes foram submetidos em primeira instância ao tratamento cirúrgico e outras modalidades de tratamento após cirurgia, como radioterapia e/ou quimioterapia. Os casos com extensas áreas de necrose ou má preservação estrutural (observadas microscopicamente) foram excluídos. Os dados gênero, idade, localização (foram agrupados por áreas de melhor e pior prognóstico nos dois grupos: de alto risco e de baixo risco), TNM, estadiamento clínico e o acompanhamento (vivos/mortos), foram obtidos dos arquivos médicos.

Todos os espécimes incluídos neste estudo deviam ter presente o fronte de invasão tumoral (FIT) claramente demonstrado com uma faixa de tecido conjuntivo adjacente. Todas as amostras foram obtidas da peça de ressecção do tumor, o que garantiu maior probabilidade de observação da área do FIT .

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia da Universidade da República Montevideo, Uruguai (Decreto 379/08, expediente 091900/000274-13).

Foi selecionado um bloco de parafina de cada caso contendo o FIT. O FIT foi definido como as últimas seis camadas de células em contato com uma faixa de tecido conjuntivo normal para cada caso. A partir de cada bloco de parafina do espécime de tumor obteve-se três cortes consecutivos de 3 mm. O primeiro corte foi corado com hematoxilina e eosina (H & E) para confirmar a área de invasão tumoral e classificação histológica. (Figura 1), a segunda foi submetida à técnica imunistoquímica para a detecção de Ki-67 (clone MIB-1, Dako, Carpinteria, CA, EUA), e o terceiro foi impregnado por prata para a detecção de AgNORs de acordo com o protocolo Ploton et al. (1986) (24).

Quadro 1- Critérios para a seleção da amostra.

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Casos com dados clínicos completos (sexo, idade, localização, TNM).	Presença de extensas áreas de necroses.
Casos com dados patológicos completos (estágio clínico, grau de diferenciação).	Preservação ruim das estruturais histológicas
Fronte de invasão claramente demonstrado	
Blocos de parafina em boas condições e com material suficiente para as Técnicas	

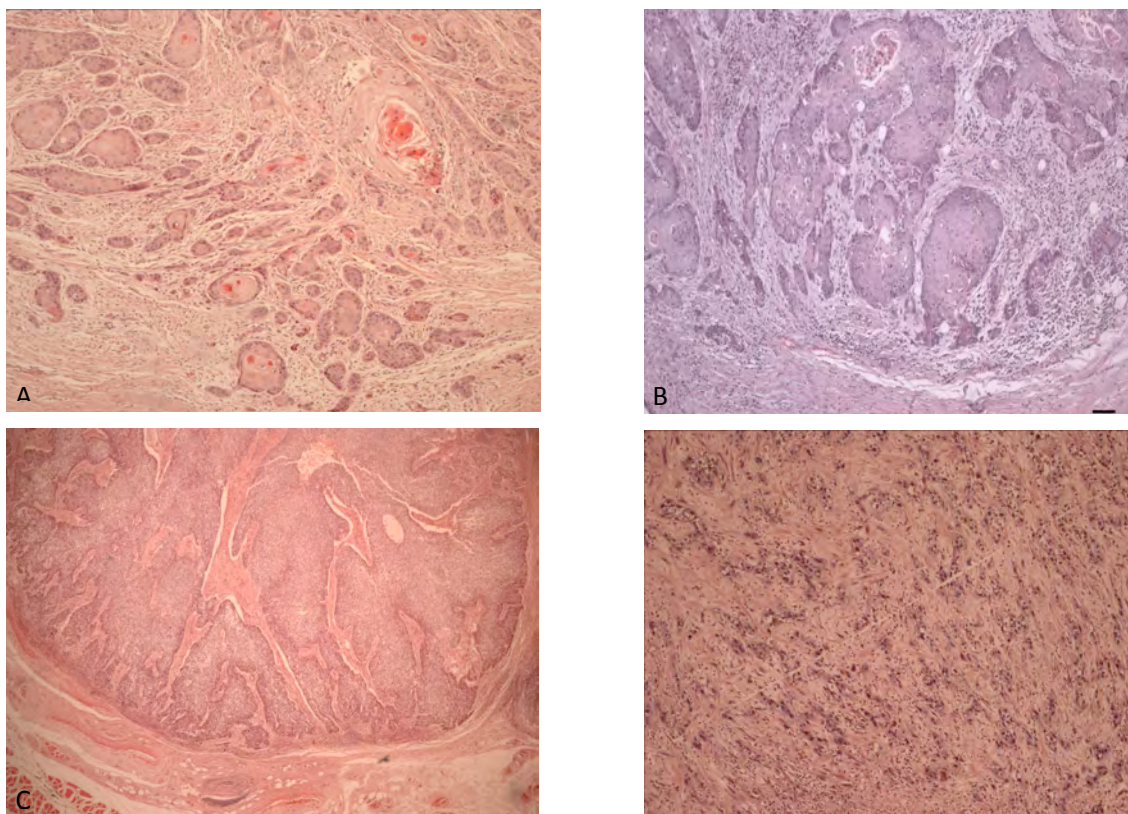


Figura 1- Carcinoma espinocelular - frente de invasão tumoral; coloração HE: A- Padrão de invasão tumoral padrão I, H&E x40., B- Padrão de invasão tumoral padrão II, H&E, 100x, C- Padrão de invasão tumoral padrão III, H&E 100x, D- Padrão de invasão tumoral padrão IV H&E, 100x. Critérios propostos por Anneroth, Batsakis e Luna em 1987 (6).

A técnica de imunoistoquímica e marcação do AgNOR foi realizada no laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em álcool. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada utilizando 3% de peróxido de hidrogênio em metanol em dois banhos de 15 min. Recuperação antigênica foi realizada usando solução de pH 9.0 (S1699, DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA) numa panela de pressão (123°C por 03:30 minutos). Subsequentemente, os cortes foram incubados durante 60 minutos à temperatura ambiente com anticorpo Ki-67 na concentração 1:25, (monoclonal anti-humano, clone MIB-1, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) e, em seguida, lavado em solução salina tamponada fosfato (PBS). O sistema de detecção utilizado foi Envision (DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA) e o cromógeno foi DAB líquido (DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA). Os cortes foram lavados, contra-corados com hematoxilina de Harris, reidratados e diafanizados em xilol e as lâminas montadas com Entellan, (Merck, Daarmstadt, Alemanha). Os controles negativos foram obtidos omitindo-se o anticorpo primário.

Os tumores foram classificados como padrão I, II, III ou IV de acordo com as características morfológicas da zona de invasão tumoral ou FIT, por dois patologistas (A.V.B.C.; P.V.R), de acordo com o método descrito por Anneroth, Batsakis e Luna em 1987 (6) . Campos microscópicos do FIT foram capturados em aumento de 400x usando uma câmera de vídeo (Q-color5™, Olympus America, Inc., Center Valley, PA, EUA), acoplado a um microscópio binocular (CX41RF, Olympus Latin America, Inc., Miami , FL, EUA).

O software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) foi utilizado para contagem das células Ki-67 positivas e para a quantificação de AgNORs, usando a ferramenta de contagem manual do software. Para a análise de Ki-67, 1000 células foram quantificadas para o cálculo da percentagem de células positivas. As células com um núcleo castanho foram consideradas positivas, independentemente da intensidade da cor (Figura 2). Para a análise de AgNOR, 100 células foram quantificadas, em aumento 1000x (com óleo de imersão). As contagens de AgNOR foram registradas como média do número de AgNORs por núcleo (mAgNOR), e percentagem de células com mais de um, dois, três ou quatro AgNORs por núcleo (pAgNOR) (Figura 3). Pontos, que não podiam ser distinguidos uns dos

outros foram contados como um único ponto, seguindo o método de contagem padronizado descrito por Crocker, Boldy e Egan em 1989 (27).

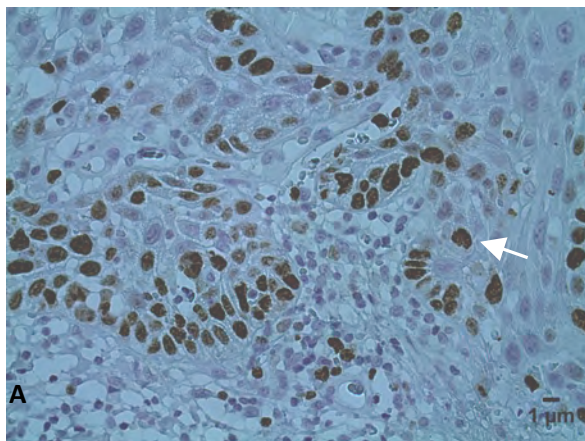


Figura 2- Expressão imunoistoquímica de Ki-67 em Carcinoma Espinocelular, marcação nuclear marrom (flecha) H&E, x400.

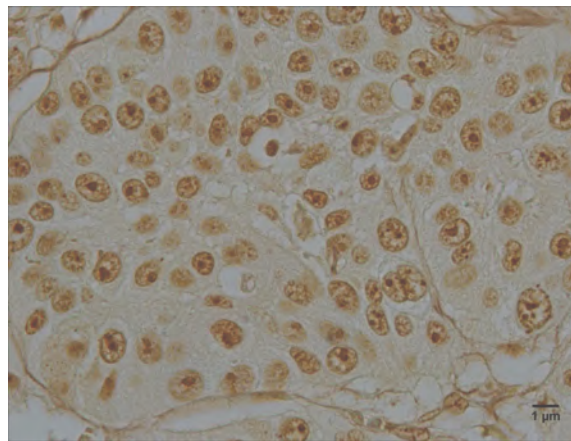


Figura 3- Marcação de AgNORs em carcinoma espinocelular x1000.

Foi realizada calibragem intraexaminador para a classificação do FIT de acordo com o método descrito por Anneroth, Batsakis e Luna em 1987(6), (Kappa=0,87) e para graduação histológica do CE de acordo com classificação da OMS(1) interobservador (Kappa=0,75). Toda a quantificação do Ki-67 e AgNORs foi realizada por um único observador, cego.

Os dados do presente estudo foram computados no Software Graph Pad Prims 5 a fim de realizar a análise estatística. Foi testada a normalidade da distribuição dos dados obtidos nos diferentes desfechos e a partir disso foram escolhidos os testes estatísticos. A comparação da imunomarcagem de Ki-67 e da marcação de AgNORs de acordo com as diferentes classificações dos tumores foi realizada pelo teste ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey. Foi considerado um nível de significância estatística de 95% ($p < 0.05$). O teste Jonckheere-Terpstra foi usado para medir a tendência entre variáveis quantitativas (Ki-67 e mAgNOR, pAgNOR) e qualitativas (FIT). Para as curvas de sobrevida de pacientes foi utilizado um teste não paramétrico como teste de long-rank.

Resultados

As características demográficas e clínicas dos pacientes (n = 48) estão descritos na Tabela 1.

Se analisarmos a diferenciação celular (OMS) no FIT, foi observado que no padrão I do FIT, 50% dos casos são indiferenciadas, em padrão II 42,1% foram moderadamente diferenciados, no padrão III 44,4% eram moderadamente diferenciados e no padrão IV 60% são indiferenciados.

Na correlação entre o padrão do FIT e o tamanho (T) tumoral, observamos que no padrão I do FIT 50% são T2, no padrão II 47,4% são T2, no padrão III 44,4% são T2 e no padrão IV 80% são T3 Gráfico 1.

Analisando o FIT em relação à evolução do paciente, no padrão IV do FIT, 80% dos pacientes morreram.

Para a imunomarcção Ki-67 houve positividade nuclear evidente em 69% dos casos. Porcentagem média de positividade no FIT para Ki-67 foi de 22,3% \pm 11,89.

Para a marcação de AgNORs, a média foi de 1,90 com uma variação de 1.75 a 3.23. Não houve associação estatisticamente significativa em relação ao FIT (I-IV) e a média percentual de Ki-67 e a média do AgNOR (Tabela 2).

Analisando a imunomarcção para Ki-67 e média de AgNORs de acordo com o grau de diferenciação celular no FIT observou-se que não houve diferença estatística (Tabela 3)

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos pacientes (n=48).

		GRUPO CE	
		n	%
IDADE	>=60	20	41,7%
	<60	28	58,3%
GÊNERO	Homens	38	79,2%
	Mulheres	10	20,8%
LOCALIZAÇÃO	Língua	20	41,7%
	Lábios	7	14,6%
	Palato	6	12,5%
	Mucosa bucal	7	14,6%
	A Assoalho da boca	2	4,2%
	O Orofaringe	1	2,1%
	Trigono retromolar	5	10,3%
EVOLUÇÃO	V Vivos	20	41,7%
	Mortos	28	58,3%
T	1	0	0%
	2	21	43,8%
	3	17	35,4%
	4	10	20,8%
N	N0	30	62,5%
	N1	9	18,7%
	N2	7	14,6%
	N2b	1	2,1%
	N2c	1	2,1%
M	M0	48	100%
ESTÁGIO CLÍNICO	I	0	0%
	II	15	31,3%
	III	17	35,4%
	IV	16	33,3%

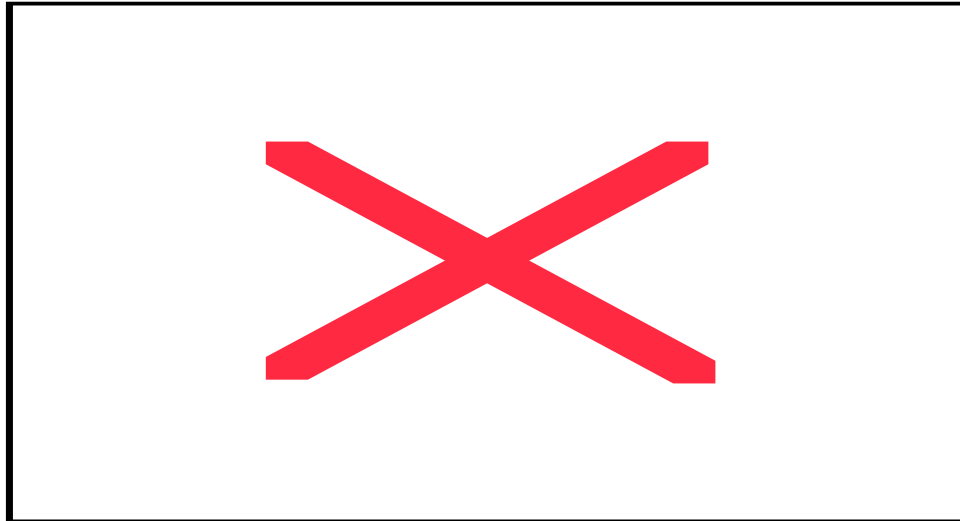


Grafico 1- Padrão de Invasão em relação a tamanho tumoral.

Tabela 2- Fronte de invasão tumoral, marcação do AgNORs e porcentagem do Ki-67.

Aneroth et al. 1987 (6).

Fronte de invasão	I n=6	II n=19	III n=18	IV n=5	<i>p</i>
mAgNOR	2.047(±0.4838)	1.887(±0.3588)	1.875(±0.5140)	1.954(±0.1885)	0.8434
pAgNOR	-				-
p>1	62.67(±17.86)	54.33(±15.83)	51.06 (±17.57)	58.00 (±11.05)	0.4822
p>2	30.83(±21.25)	24.94(±13.22)	23.22 (±18.33)	28.00 (±10.72)	0.7699
p>3	11.00(±9.757)	8.72(±7.820)	9.944 (±15.17)	8.800 (±2.168)	0.9705
p≥4	0.167(±0.408)	0.667(±1.749)	0.8889(±1.410)	0.400(±0.8944)	0.7272
Mean % Ki-67	29.99(±11.77)	22.43(±12.32)	22.18 (±12.21)	12.27(±5.736)	0.1877

Tabela 3- Imunoexpressão de Ki-67 e AgNORs no Fronte de invasão tumoral relacionado ao grau diferenciação celular.

OMS	Bem Diferenciados n=11	Moderadamente Diferenciados n=20	Pobrememente Diferenciados n=17	P
mAgNOR	1.920 (±0.542)	1.946 (±0.430)	1.862(±0.3458)	0.8389
pAgNOR				
p>1	54.30(±16.87)	56.05(±17.85)	52.88(±14.93)	0.8461
p>2	26.20(±21.43)	26.60(±15.89)	23.41(±12.91)	0.8243
p>3	11.40 (±18.46)	8.800 (±7.150)	9.176 (±9.316)	0.8250
p≥4	0.100(±0.3162)	1.100 (±1.861)	0.4706 (±1.068)	0.1511
Mean % Ki-67	23.56(±14.65)	23.41(±11.81)	19.89(±10.84)	0.7102

Observando a marcação de AgNORs e Ki-67 no FIT agrupados em áreas de alto risco (língua, assoalho da boca e trígono retromolar) e baixo risco (mucosa bucal, lábio, gengiva, palato). Casos de alto risco tiveram um percentual maior de Ki-67 positivo, mas não estatisticamente significativa (24.53% $p < 0,2898$), observou-se uma relação estatisticamente significativa com mAgNORS ($p < 0.0085$), e pAgNORs para $p > 1$ ($p < 0.0086$), $p > 2$ ($p < 0.0236$), $p > 3$ ($p < 0.0272$) (Tabela 4).

Tabela 4- Expressão de AgNORs e Ki-67 no frente de invasão em áreas de alto e baixo risco.

	Alto-risco n=27	Baixo-risco n=21	p
mAgNOR	2.052 (±0.4530)	1.734(±0.3035)	0.0085
pAgNOR			
p>1	60.04 (15.87)	47.71 (14.51)	0.0086
p>2	30.04 (17.62)	19.57 (11.55)	0.0236
p>3	12.62 (13.31)	5.619 (4.894)	0.0272
p≥4	0.8846 (1.774)	0.3810 (0.7400)	0.2301
Mean % Ki-67	20.08 (±9.730)	24.53(±13.56)	0.2898

Em relação à evolução dos pacientes (vivos e mortos), mAgNORs foi estatisticamente significativa ($p < 0.0447$) e pAgNORs foi significativo para $p > 1$ ($p < 0.0318$), para $p > 2$ ($p < 0.0492$) (Tabela 5).

Tabela 5- Expressão de AgNORs e Ki-67 e evolução dos pacientes.

	Vivo n=20	Falecido n=28	P
mAgNOR	2.052(±0.4828)	1.808(±0.3348)	0.0447
pAgNOR			
p>1	60.50 (±17.20)	50.43 (±14.26)	0.0318
p>2	31.70 (±19.25)	20.68 (±10.99)	0.0492
p>3	12.40 (±14.62)	7.393 (±6.448)	0.3247
p≥4	0.500 (±1.606)	0.7500(±1.266)	0.1447
Mean % Ki-67	22.71(±12.46)	22.15(±11.84)	0.8983

Se analisamos a sobrevivência dos pacientes em relação ao tamanho do tumor foi encontrada uma associação, em T2 os pacientes têm uma sobrevivência média de 8 anos e T3 de três anos (p -valor 0,036) (Gráfico 2).

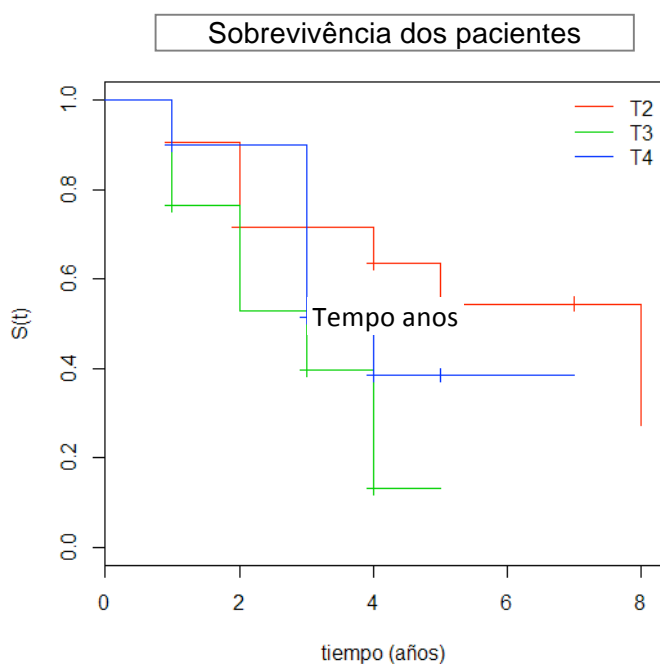


Gráfico 2- Sobrevivência dos pacientes de acordo com Tamanho do tumor.

Discussão

A proliferação celular é um processo biológico fundamental, é definida como o aumento no número de células resultado de um ciclo celular completo, e desempenha um papel no crescimento e conservação da homeostase do tecido (14). A proliferação no câncer é tradicionalmente pesquisada para tentar prever o comportamento biológico dos tumores, assim como a possibilidade de recorrência local e potencial de metástase dos mesmos.

Vários métodos estão disponíveis para avaliação da proliferação celular que são aplicáveis na prática histopatológica, como a avaliação por meio de marcadores de baixo custo, como a AgNOR e marcadores moleculares, como Ki-67, p53, p16, PCNA, ciclina B1(18,30).

A evidência sugere que as células presentes na FIT do CE têm características moleculares diferentes quando comparadas às áreas de superfície do tumor, sendo a área mais importante para determinar o prognóstico (7-11). Neste estudo observou-se uma alta percentagem média de células Ki-67 positivas (69%) no FIT do CE, semelhante à descrita na literatura (9, 18,31), indicando uma alta atividade de proliferação celular.

Tumuluri et al., relataram uma forte correlação da proliferação celular avaliada pela expressão de Ki-67, no FIT com o grau histológico de malignidade e os parâmetros TNM (14) do CE. Estes achados estão em concordância com nossos resultados, os quais mostraram que 80% dos CE padrão IV de FIT eram tumores T3.

Piffiko et al. referem que nas áreas de FIT residem subpopulações de células com elevada atividade proliferativa (32). Enquanto que nosso estudo mostrou uma relação inversa entre percentagem de Ki-67 e o padrão FIT, sugerindo que as células do fronte de invasão grau IV gastam mais energia para realizar a migração e invasão do que realizar a proliferação celular.

No presente estudo observou-se uma correlação significativa da marcação de AgNORs , mAgNORs e pAgNORs ($p > 1$, $p > 2$, $p > 3$) em CE localizados em áreas

de alto risco (língua, assoalho da boca e trígono retromolar) em comparação com as áreas de baixo risco (mucosa labial, gengiva, palato), indicando maior velocidade de proliferação nas áreas de risco, e conseqüentemente pior prognóstico (17). O aumento de mAgNORs observado nas zonas de alto risco do CE sugere que há um subconjunto de células tumorais com aumentada atividade de síntese de proteínas nucleolares e correlaciona-se com a percentagem de aneuploidia, a fase clínica e sobrevida (36,37).

Nossos resultados não mostraram associação significativa entre a expressão do Ki-67 e a sobrevida dos pacientes e isto está de acordo com o observado por Bettendorf et al., que examinaram o significado prognóstico da expressão desta molécula com parâmetros morfológicos tumorais e sobrevida de 5 anos pós tratamento em 329 casos de CE de boca e a expressão do Ki-67, sozinha, não teve valor prognóstico. Este fato pode ser explicado pelo Ki-67 ser um marcador estático e por ter uma meia vida curta (34).

Assim como, Gonzalez-Moles et al. que analisaram o valor prognóstico do Ki-67 no carcinoma espinocelular bucal e observaram que este não tem valor prognóstico, provavelmente porque é um marcador da fração total de células em proliferação (17).

Assim, parece que o Ki-67 pode não ser relevante no prognóstico de pacientes com câncer bucal, embora os resultados variam muito e poucos estudos têm mostrado algum valor prognóstico, a grande maioria encontram uma sobreexpressão de Ki-67 e não tem relevância prognóstica (17,32). Alguns estudos têm maior valor atribuído à combinação de Ki-67 com outros marcadores, tais como relações Mcm2/Ki-67 e Gemini/Ki-67(17,33).

Neste estudo também foi observada uma associação do tamanho do tumor (T) com a sobrevida dos pacientes, em tumores T2 a sobrevida foi de 8 anos e em T3 de 3 anos. No padrão IV do FIT 60% foram estadiados como grau III da OMS, 80% eram T3 e 80% dos pacientes evoluíram para óbito. Estes resultados estão de acordo com a literatura que concluíram que o tamanho do tumor, extensão extracapsular e

invasão vascular podem predizer um pior prognóstico e menor sobrevida em pacientes com CE, do que somente o TNM (17, 31, 35).

As diferenças entre o presente estudo e a literatura podem eventualmente ser devido a diferenças nos critérios para a quantificação de Ki-67 e AgNOR.

Assim, não foi observado associação entre os parâmetros de proliferação celular com o tipo de frente de invasão tumoral, nem com o grau de diferenciação celular. Além disso, foi observada uma associação entre o mAgNOR e a localização de maior risco do carcinoma espinocelular de boca e menor média de mAgNOR no frente de invasão tumoral foi associado com melhor prognóstico.

Referências

1-BARNES L., Eveson J.W., Reichart P., Sidransky D. (Eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours **IARC Press: Lyon 2005**

2-DIEST, P.J.V.; BRUGAL, G.; BAAK, J.P.A. Proliferation Markers in Tumours: Interpretation and Clinical Value. **J Clin Pathol, London, v. 51, p. 716-724, 1998**

3-GARCIA GARCIA, V; GONZALEZ-MOLES, MA; BASCONES MARTINEZ, A. Bases moleculares del cáncer oral: Revisión bibliográfica. **Av Odontoestomatol, 2005;v. 21, n. 6, dic. 2005.**

4-GONZÁLEZ-MOLES MA, GIL-MONTOYA JA, RUIZ-ÁVILA I. Bases moleculares de la cancerización de cavidad oral. **Av.Odontoestomatol 2008; 24 (1): 55-60.**

5-ROS LLUCH, N., CHIMENOS KÜSTNER, E. AND LÓPEZ LÓPEZ, J. Alimentos contra el cáncer oral. **Av Odontoestomatol, Jun 2009, vol.25, no.3.**

6- ANNEROTH G, BATSAKIS J, LUNA M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res. 1987;95:229-49.**

7-BRYNE M, NIELSEN K, KOPPANG HS, DABELSTEEN E .Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. **J. Oral Pathol. Med.** 1991;20, 369.

8-TUMULURI V, THOMAS GA, FRASER IS.The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma.**J Oral Pathol Med.** 2004 Apr;33(4):204-8.

9-KUROKAWA H, ZHANG M, MATSUMOTO S, YAMASHITA Y, TOMOYOSE T, TANAKA T, FUKUYAMA H, TAKAHASHI T.The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of the tongue squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol.Med.**2005; v.34.nº 6,p. 329-333.

10-BRYNE, M.; KOPPANG, H.S.; LILENG, R.; KJAERHEIM,A. Malignancy Grading of the Deep Invasive Margins of Oral Squamous Carcinoma Has High Prognostic Value. **J Pathol**, 1992; v.166, no 4, p.375-381.

11-BRYNE M, KOPPANG HS, LILLENG R, STENE T, BANG G, DABELSTEEN E . New malignancy grading is a better prognostic indicator than Borders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**1989;18, 432.

12- BRYNE, M. Is the Invasive Front of an Oral Carcinoma the Most Important Area for Prognostication? **Oral Diseases**,1998; v.4, no 2 , p.70-77.

13-BANKFALVI A, PIFFKO J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumor front. **J Oral Pathol Med** 2000; 29: 291–8.

14-TUMULURI V, THOMAS GA, FRASER IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2002;31:598-604.

15-BANKFALVI A, OFNER D, PIFFKO J, SCHMID KW. Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma of human oral mucosa.**Cancer.** 1994 Dec 15;74 (12):3245-7.

16- OFNER D, BANKFALVI A, RIEHEMANN K, BIER B, BÖCKER W, SCHMID KW. Wet autoclave pretreatment improves the visualization of silver-stained nucleolar organizer-

region-associated proteins in routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. **Mod Pathol. 1994 Dec;7(9):946-50.**

17-GONZALEZ-MOLES M.A., RUIZ-AVILA I., GIL-MONTOYA J.A , ESTEBAN F., BRAVO M. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: Why Ki-67 is not a prognostic indicator .**Oral Oncology 46 (2010) 525–530.**

18-WATANABE S, WATANABE R, OTON-LEITE AF, ALENCAR RDE C, OLIVEIRA JC, LELES CR, BATISTA AC, MENDONÇA EF. Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Sci. 2010 Sep;52(3):417-24.**

19-MORADZADEH KHIAMI M, VOSOUGHHOSSEINI S, HALIMI M, MAHMOUDI SM, YARAHMADI A.A. Nucleolar Organizer Regions in Oral Squamous Cell Carcinoma. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2012 Winter;6(1):17-20.**

20-GIRI, D., D.; NOTTINGHAM, J.F.; LAWRY, J. DUNDAS, S.A.C. Silver-Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Benign and Malignant Breast Lesions: Correlation with Ploidy and Growth Phase by DNA Flow Citometry. **J Pathol, v.157, p.307-313,1989.**

21-CANO LC, ÁLVAREZ GJ, VALENCIA WA, RAMÍREZ JA PRADA CA. Análisis del marcador AgNOR en leucoplasia carcinoma escamolecular oral. **Medicina Oral 2002; 7: 17-25 .**

22-ESLAMI B., RAHIMI H., RAHIMI F., KHIAMI M. M., EBADIFAR A.. Diagnostic value of silver nitrate staining for nucleolar organizer regions in selected head and neck tumors. **J. Cancer Res. Ther. 2006 ; (2)3:129-131.**

23-HERNANDEZ-VERDUN, D. The Nucleolar Organizer Regions. **Biol Cell, France. 1983 (49), no 3: 191-202.**

24- PLOTON D, MENAGER M, JEANNESSON P, HIMBER G, PIGEON F, ADNET JJ. Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem J. 1986;18:5-14.**

- 25- CHATTOPADHYAY A., RAY JAY G., CAPLAN DANIEL J. AGNOR COUNT AS OBJECTIVE MARKER FOR DYSPLASIC FEATURES IN ORAL LEUKOPLAKIA .**J ORAL PATHOL MED,2002; 31:512-7.**
- 26- PICH, A.; CHIUUSA., L.; MARGARIA, E. Prognostic Relevance of AgNORs in Tumor **Pathology Micron, Oxford,2000;v. 31, p. 133-141.**
- 27- CROCKER J, EGAN MJ. Correlation between NOR sizes and numbers in Non-Hodgking's limphomas. **J Pathol 1988; 56:223–39.**
- 28-BRODERS AC. Squamous-cell epithelioma of the lip. **J Am Med As.mc 1920;74: 656-64.**
- 29- AJCC Cáncer Staging Handbook (ed. 7), **New York, Springer, 2010.**
- 30-DRAGOMIR L.P., SIMIONESCU, MĂRGĂRITESCU CL., STEPAN A., DRAGOMIR IULIANA MANUELA, POPESCUM. R. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas.**ROM J MORPHOL EMBRYOL 2012, 53(1):89–93.**
- 31-MYOUNG H., KIM M.J., LEE J.H., OK Y. J., PAENG J. Y., YUN P.Y. Correlation of proliferative markers (ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. **Int. J. Oral and Maxillofac. Surg. 2006;35:1005-1010.**
- 32-PIFFKÓ, J.; BÁNKALVI, A.; OFNER, D.; BRYNE, M.; RASCH, D.; JOOS,U.; BOCKER, W.; SCHMID, K.W. Prognostic Value of Histobiological Factors (Malignancy Grading and AgNOR Content) Assessed at the Invasive Tumour Front of Oral Squamous Cell Carcinomas.**Br J Cancer, Edinburg, 1997; v. 76, no 10, p. 1543-1546.**
- 33-TORRES-RENDON A, ROY S, CRAIG GT, SPEIGHT PM. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. **Br J Cancer 2009;100:1128–3.**
- 34-BETTENDORF.O; HERMANN, G. Prognostic Relevance of ki-67 Antigen Expression in 329 Cases of Oral Squamous Cell Carcinoma. **ORL.2002, v.64; p.200-205.**

35-OKUYEMI OT, PICCIRILLO JF, SPITZNAGEL E. TNM staging compared to a new clinicopathological model in predicting oral tongue squamous cell carcinoma survival. **Head Neck. 2013 Aug 30. doi: 10.1002/hed.23486.**

36-HANEMANN, JOÃO ADOLFO COSTA, MIYAZAWA, MARTA, & SOUZA, MIREILE SÃO GERALDO DOS SANTOS. Histologic grading and nucleolar organizer regions in oral squamous cell carcinomas. **Journal of Applied Oral Science, 2011;19(3), 280-285.**

37-PIFFKÒ J, BÀNKFALVI A, OFNER D, RASCH D, JOOS U, SCHMID KW. Standardized demonstration of silver-stained nucleolar organizer regions-associated proteins in archival oral squamous cell carcinomas and adjacent non-neoplastic mucosa. **Mod Pathol. 1997 Feb;10(2):98-104.**

38-PIFFKÒ J, BÀNKFALVI A, OFNER D, RASCH D, JOOS U, SCHMID KW. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinomas. **J Pathol. 1997 Aug;182(4):450-6.**

39- GONZALEZ-MOLES MA, BRAVO M, RUIZ-AVILA I, ESTEBAN F, RODRIGUEZ-ARCHILLA A, GONZALEZ-MOLES S, et al. Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in tongue cancer. **Anticancer Res. 2003; 23 (6D) :5197–202.**

40- DE VICENTE JC, FRESNO MF, VILLALAIN L, VEGA JA, HERNÁNDEZ VALLEJO G. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol 2005;41(3):283–93.**

41-MACKENZIE IC. Stem cell properties and epithelial malignancies. **Eur J Cancer, 2006;42(9):1204–12.**

Considerações finais

Ki-67 é uma proteína que expressa a fração total de células em proliferação, isto é, a proporção de células tumorais que estão em ciclo celular (8,9,17,18). Portanto, as células proliferativas seriam responsáveis pelo crescimento maligno, enquanto outras poderiam seguir para diferenciação terminal, o que pode ser considerado um mecanismo de proteção contra a aquisição de eventos oncogênicos, responsáveis pelo prognóstico ruim e assim poucas células desenvolveriam um fenótipo maligno (17, 41).

A expressão de AgNORs é relacionada com velocidade de proliferação celular e marca a população de células tumorais que proliferam rapidamente, situação em que seria mais provável a acumulação de erros oncogênicos e um pior prognóstico (17,19-21).

Estudos futuros com critérios de quantificação uniformes para imunohistoquímica e maior número de casos são necessários para avaliar o prognóstico de pacientes com câncer de boca, e outros marcadores devem ser avaliados na área do frente de invasão tumoral dos carcinomas espinocelulares.