

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
NÍVEL MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA BUCAL**

Linha de Pesquisa:

**Câncer Bucal**

**RELAÇÃO ENTRE ESTADIAMENTO, CARACTERÍSTICAS  
HISTOPATOLÓGICAS, PROLIFERAÇÃO CELULAR E  
PROGNÓSTICO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR  
DE LÍNGUA**

**Ana Luísa Homem de Carvalho**

*Orientador:*

**Prof Dr Manoel Sant'Ana Filho**

**Dissertação de mestrado  
apresentada como pré-  
requisito à obtenção do  
título de Mestre em  
Odontologia**

## DEDICATÓRIA

---

Aos meus pais, David e Sílvia, por sempre fazerem o possível e, muitas vezes,  
o impossível para que eu alcançasse meus objetivos.

*“Seja o que for que você  
possa fazer, ou sonhe em  
fazer, comece. A ousadia  
envolve talento, poder e  
magia.”(Göethe)*

## **AGRADECIMENTOS**

---

**Aos meus pais**, pelo apoio incondicional, pelo incentivo e pela sempre disposição em me ajudar. Ao meu pai, não mais aqui presente, o meu eterno agradecimento por tudo o que fizeste por mim durante o tempo em que convivemos.

**À minha família**, em especial aos meus irmãos (**Rafael e Clarissa**), agradeço por estarem sempre ao meu lado e torcendo muito para que as coisas dessem certo.

Ao querido **Rodrigo**: te agradeço não só pela ajuda constante nas questões técnicas deste trabalho, mas principalmente por todo o amor e compreensão que me dispensas. Isto te faz cada vez mais especial na minha vida.

Aos amigos **Alves Zandona** por vibrarem com minhas conquistas como se deles fossem. Vocês são muito especiais para mim.

Aos meus queridos amigos, desde a graduação: **Aline, Adriela, Alex, Aisha, Aurélio, Carolina, Diego, Caroline, Cristina, Cíntia, Daniela, Juliana Cervo, Juliana Rolla, Helena, Lica, Luciane, Márcia, Paulinha, Ramiro**, agradeço a vocês pela amizade incondicional, por tornarem minha vida mais divertida e por torcerem pelas minhas conquistas.

As minhas colegas de mestrado, **Laura, Luhana e Márcia**: agradeço a Deus por ter colocado na minha vida pessoas tão queridas, de tão bom coração e tão espetaculares. Foi muito bom ter convivido dia-a-dia com vocês e saibam que torço muito por cada uma e as desejo toda a felicidade do mundo.

Aos bolsistas **Guilherme e Tiago**, pela ajuda no que fosse preciso.

Á querida amiga e colega de Patologia, **Paula Luce Bohrer**, por todas as conversas e por toda a ajuda que a mim dispensaste nestes anos todos.

Ao meu orientador, professor **Manoel Sant'Ana Filho**: não existem palavras que expressem o mais profundo e sincero agradecimento por tudo o que me ensinaste e pela oportunidade de conviver por dois anos com uma pessoa tão inteligente. Obrigada pela orientação, pelas idéias, pelo espírito crítico, pela paciência e pela confiança.

À Professora **Anna Cecília Moraes Chaves**, pelos ensinamentos, principalmente no atendimento clínico.

Ao professor **Pantelis Varvaki Rados**, exemplo de competência e seriedade com quem aprendi gostar de patologia. Além de excelente professor, uma pessoa maravilhosa com quem tive a oportunidade de convívio mais próximo.

À **Isabel da Silva Lauxen**: tu sabes que se não fosse pela tua dedicação, paciência e seriedade, teria sido impossível realizar este trabalho. O meu mais sincero agradecimento pela realização das técnicas laboratoriais, pelos palpites e pela tua vontade que tudo desse certo.

À **Márcia Geiger Oliveira**, pela ajuda constante e à **Bianca P.Barbieri** pelo auxílio nas técnicas e no laboratório.

Aos funcionários de Programa de Pós Graduação, **Adriana Aguiar e Leandro Nunes**, por estarem sempre disponíveis. Faço uma deferência ao Leandro, pela boa vontade e prestatividade.

Ao professor **Marcos Martins Neto**, pelo pronto atendimento na solicitação dos prontuários.

Ao professor **Lauro Rosa**, por assumir o projeto enviado ao Hospital de Clínicas, para que eu pudesse usar o material e consultar os arquivos deste hospital.

Ao **Vinícius Carrard**, colega desde a graduação, por mostrar-se sempre disponível e prestativo a me ajudar nas minhas mais variadas dúvidas, principalmente no início do curso.

À **IBCM**, em nome de sua Diretoria e da chefe da Odontologia, Dra Mariza, que sempre permitiram minhas trocas de turno durante o curso. Em especial ao colega Gilberto, pelas trocas de horário. Sem a compreensão de vocês, não teria sido possível.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a correlação entre parâmetros clínicos (TNM), graduação histopatológica, número de AgNORs por núcleo e expressão de Ki-67 na zona de invasão com o prognóstico de carcinoma espinocelular de língua. Foram selecionados dez casos de carcinoma espinocelular de língua e divididos em dois grupos: bom prognóstico (ausência de metástases á distância e/ou regionais, sobrevida livre de doença) e mau prognóstico (presença de metástases, recidiva, óbito). O material de biópsia foi submetido às técnicas de hematoxilina/eosina, de impregnação pela prata para evidenciação das NORs e de detecção imunohistoquímica do antígeno de proliferação nuclear Ki-67. Concluiu-se que T4 por si só já é um indicador de mau prognóstico e que nos tumores de grau II, a proliferação celular pode refletir o prognóstico do tumor.

## **ABSTRACT**

This study aims to evaluate the correlation between clinical parameters (TNM), histopathologic grading, quantity of AgNORs and Ki-67 expression within the invasive tumor front with prognostic of oral squamous cell carcinoma. Ten cases of squamous cell carcinoma of the tongue were selected and split into two groups: good prognostic and bad prognostic. The biopsy material was submitted to hematoxylin/eosin technique, silver impregnation aiming at the evidence of NORs and immunohistochemical detection of the Ki-67 nuclear proliferation antigen. It has been concluded that the T4 per se is a prognostic indicator and that, on grade II, cell proliferation may reflect the prognostic of tumor.

## SUMÁRIO

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	09
REFERÊNCIAS.....	20
PROPOSIÇÃO.....	28
ARTIGO CIENTÍFICO*.....	29
Introdução.....	29
Metodologia.....	31
Resultados.....	34
Discussão.....	39
Agradecimentos.....	40
Referências .....	41
ANEXO.....	45

## **ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA**

---

O carcinoma da boca representa de 3 a 5% do total das neoplasias malignas, sendo o espinocelular o mais freqüente na cavidade bucal. A estimativa de incidência de câncer para o ano de 2005 no Brasil aponta este tumor como o 8º mais freqüente entre os homens (com 9.985 casos estimados) e o 9º entre as mulheres (com 3.895 casos estimados) (INCA,2005). Os sítios anatômicos mais afetados são a língua, o lábio inferior e o assoalho bucal. A maioria dos acometidos por esta neoplasia tem mais de 45 anos, e o uso de álcool e tabaco são os mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento desta também associados com o curso da doença e com um pior prognóstico (LINE et al.,1995; BELTRÃO et al.,1999; GERVÁSIO et al.,2001).

A importância do estudo de fatores prognósticos reside no fato de se estabelecer o comportamento biológico de uma lesão, cancerizável ou neoplásica. O primeiro critério de avaliação prognóstica é o clínico e classicamente usa-se o sistema TNM. Este sistema é mundialmente aceito na classificação dos tumores malignos, sendo que T mensura a extensão do tumor primário, o N avalia o comprometimento de linfonodos regionais e o M a presença de metástases à distância. A avaliação prognóstica pelo TNM é limitada por avaliar o tumor em duas dimensões, não levando em conta as características histopatológicas do tumor e nem a relação imunológica entre tumor e hospedeiro. Desde sua criação, muitos estudos objetivaram revisar o sistema TNM e tratando-se de carcinomas orais, tentaram incluir a espessura do tumor no sistema, mas este parâmetro ainda não foi incorporado, mesmo tendo um importante valor prognóstico (BAREDES et al.,1993; DIB et al.,1994; AMBROSCH;BRINCK,1996; PARISSE JÚNIOR, 2000; BETTENDORF; HERMANN, 2002).

Então, uma avaliação combinada entre estadiamento clínico e citomorfologia das neoplasias mostram uma avaliação mais precisa na predição do comportamento clínico destes tumores, a fim de poder oferecer aos pacientes maior eficácia terapêutica e expectativas prognósticas mais realistas (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA,1986).

O segundo critério utilizado para avaliação prognóstica são as características histopatológicas da população celular tumoral sendo Broders (1940) o primeiro a classificar os carcinomas espinocelulares de acordo com suas características morfológicas, levando em conta a proporção de células neoplásicas que se assemelhavam as do epitélio normal. A falta de correlação entre a graduação de Broders (1940) e prognóstico mostrou que carcinomas espinocelulares exibem uma população celular heterogênea com diferenças no grau de diferenciação. Desde então, algumas classificações foram propostas, sendo a de Anneroth, Batsakis e Luna (1987) uma das mais utilizadas, uma vez que se baseia em dois aspectos: na população celular tumoral (grau de queratinização, pleomorfismo nuclear e o número de mitoses) e na relação entre tumor e hospedeiro (estágio da invasão, padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário reacional). Estudos relacionando graduação histopatológica e sistema TNM foram realizados por alguns autores (PINTO JÚNIOR,1991; DIB et al.1994; MARTINS NETO, 1996; COSTA et al., 2002; DANTAS et al., 2003).

Martins Neto (1996) avaliou a associação entre os estadiamentos clínicos T1, T2, T3 e T4 e a graduação histopatológica de 65 casos de carcinomas espinocelulares de língua. A graduação histopatológica foi realizada seguindo os critérios de malignidade desenvolvidos por Wahi (1971). Concluiu que não houve associação estatisticamente significativa entre os estadiamentos clínicos T1, T2, T3 e T4 e a graduação histopatológica do carcinoma espinocelular de língua.

Costa et al., (2002) buscaram correlacionar a classificação clínica TNM com a graduação histológica de malignidade e a localização anatômica de 120 carcinomas espinocelulares de

boca. Concluíram que existe correlação estatisticamente significativa entre o estadiamento clínico TNM e a graduação histológica de malignidade, pois a maioria dos casos T1 e T2 exibiram grau de malignidade 1 e 2 e os T3 exibiram graduação entre 2 e 3. Apesar disto, a maioria dos classificados como T4 exibiram graduação grau 2, discordando da tendência que vinha sendo observada. Também houve correlação significativa entre estadiamento clínico e localização anatômica da lesão, sendo a maioria dos casos localizados no lábio inferior classificados como T1 e como T4, a maioria dos localizados em língua.

Dantas et al., (2003) avaliaram a correlação entre a classificação TNM e a graduação histológica de malignidade usando os critérios de Anneroth, Batsakis e Luna (1987) em 16 casos de carcinomas espinocelulares de língua a fim de correlacionar estes parâmetros com o prognóstico, avaliado como sobrevida em 5 anos. O parâmetro estágio de invasão foi omitido, conforme recomendou Pinto Júnior (1991), por tratar-se de biópsias incisionais. Encontraram correlação estatisticamente significativa entre a classificação TNM e prognóstico e não entre escores de malignidade e prognóstico, concluindo que o estadiamento clínico TNM constitui-se em um indicador de prognóstico em carcinomas espinocelulares de língua.

Têm-se observado que a morfologia celular nas partes mais invasivas do tumor- zona de invasão- é diferente das áreas centrais ou superficiais dos mesmos tumores. Constituem a zona de invasão as três ou seis camadas celulares tumorais mais invasivas ou os grupos de células tumorais isolados, caracterizados por apresentarem menos diferenciação do que outras zonas do tumor (PIFFKÓ et al.,1997). Assim, a morfologia celular da zona de invasão reflete as principais interações moleculares cruciais para a progressão tumoral. A graduação da zona de invasão e a expressão de marcadores de proliferação podem ter valor prognóstico não só para carcinomas espinocelulares, mas também para outros tumores (BRYNE, 1998).

Sabe-se que a população celular tumoral é heterogênea e que as células localizadas mais profundamente, correspondendo às margens mais invasivas dos carcinomas espinocelulares e também de outros tumores apresentam características diferentes das células da porção central (BRYNE et al.,1989; BRYNE et al.,1992). Baseados nas características morfológicas da zona de invasão, Bryne et al. (1989) propuseram um sistema de graduação histopatológica para carcinomas espinocelulares de boca. Utilizaram o sistema de graduação desenvolvido por Anneroth, Batsakis e Luna (1987) na zona de invasão tumoral, sendo esta característica o que diferencia os dois sistemas. O parâmetro estágio de invasão foi omitido, por tratarem-se de biópsias incisionais, assim como a contagem de mitoses, por estas apresentarem-se em menor quantidade na zona de invasão e por a supressão deste item, aumentar a reprodutibilidade do sistema. As biópsias não precisam necessariamente ser representativas para utilizar este sistema, mas o valor prognóstico aumenta quando tem-se peças maiores (BRYNE et al.,1998; BÁNKALFI; PIFFKÓ, 2000).

Outro critério mais recente para avaliação prognóstica busca analisar a proliferação celular, que é uma das características mais importantes do fenótipo maligno. No câncer, a proliferação encontra-se desregulada e, por isto, o entendimento sobre os mecanismos reguladores do ciclo celular é um importante parâmetro para a compreensão do mecanismo biológico dos tumores (LAM et al., 1996).

Um dos métodos para análise da proliferação celular é a técnica da impregnação pela prata das regiões organizadoras nucleolares (AgNORs). 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 (GIRI et al.,1989). 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. Muitos estudos mostraram

que a quantidade de AgNORs por núcleo está relacionada com a velocidade de progressão do ciclo celular indicando que há relação entre o número de AgNORs por núcleo e prognóstico (TRERÉ,1994; DERENZINI,2000).

A relação positiva entre média do número de AgNORs/núcleo (mAgNOR) e prognóstico foi demonstrada por alguns autores (SANO et al.,1991; PICH;CHIUSA;MARGARIA, 2000; DERENZINI et al., 2004).

Sano et al., (1991) investigaram a quantidade de AgNORs em 39 casos de carcinomas espinocelulares de boca e relacionaram este dado com a graduação histológica e prognóstico dos referidos casos. A quantidade das AgNORs foi dada através da média da quantidade de AgNORs por núcleo (mAgNOR), por tratar-se de um método simples e de boa reprodutibilidade. Os casos foram divididos em bom prognóstico (sem recidiva e ausência de metástases em cinco anos) e mau prognóstico (óbito em dois anos após o diagnóstico). Os casos foram classificados de acordo com o sistema TNM e todos se apresentavam como M0. Concluíram que altas quantidades de AgNORs poderiam ser consideradas um marcador de prognóstico desfavorável, uma vez que o grupo classificado como mau prognóstico apresentou as maiores quantidades de AgNORs. Carcinomas graduados como grau II tiveram altas médias de AgNORs assim como prognóstico desfavorável.

Pich, Chiusa e Margaria (2000) avaliaram se, em algumas neoplasias humanas, a quantidade de AgNORs era realmente um fator prognóstico importante. Mostrou que além de ser um fator independente de prognóstico em alguns tumores humanos também contribui na estratificação de pacientes nos diferentes grupos de risco (presença ou não de metástase) a fim de oferecer-lhe as diferentes terapias. Concluiu que grandes quantidades de AgNORs por núcleo caracterizam um aumento da atividade metabólica e de conteúdo de DNA de uma célula pouco diferenciada .

Derenzini et al., (2004) avaliaram a expressão das proteínas dos gens Rb (retinoblastoma) e p53 (proteína p53), supressores de tumor, em 335 casos de carcinoma de mama assim como a média da área de AgNORs, por considerar esta mensuração um método mais reprodutível. O prognóstico foi avaliado de acordo com a presença de metástases nodais (N+) e ausência das mesmas (N0) em 4 grupos: p53+, p53-, pRb+ e pRb-. A média da área de AgNORs correlacionou-se com o tamanho do tumor e com sua graduação histopatológica, não se correlacionando com as metástases nodais. Tumores com maior média da área de AgNORs foram caracterizados com um pior prognóstico, em função de seu crescimento mais rápido. Há uma estreita associação entre alterações em pRb (+) e em p53 (+) e maior média de área de AgNORs, sugerindo que alterações em gens supressores são responsáveis por pior prognóstico.

Outro método para avaliação das AgNORs é a porcentagem de células com 1, 2, 3, 4 ou mais AgNORs por núcleo (pAgNOR), introduzido por Xie et al., (1997). Mostraram que tanto pAgNOR quanto mAgNOR permitem a distinção entre epitélio normal, displasia e carcinomas espinocelulares de boca e que pAgNOR maior que 1 é um indicador de recidiva e sobrevida curta em casos classificados como T1 e T2, sugerindo que a contagem das AgNORs deveria fazer parte da rotina histopatológica nos casos de carcinoma espinocelular de boca.

Ray, Chattopadhyay e Caplan (2003) selecionaram 52 casos de leucoplasias localizadas na cavidade bucal e por meio de lâminas coradas por hematoxilina-eosina (H/E) os classificaram em displásicos e não displásicos. Estes mesmos casos foram submetidos à técnica de AgNOR e as NORs ativas quantificadas utilizando-se os parâmetros de média (mAgNOR) e percentual (pAgNOR). Os dois métodos, contagem de AgNORs por núcleo e diagnóstico histopatológico, discordaram em 37% dos diagnósticos. Tanto displasias quanto não displasias mostraram grandes médias de AgNORs, sendo que pAgNOR foi insuficiente para o

diagnóstico de displasia, diferente de mAgNOR. A média de AgNORs constitui-se um critério para definir o diagnóstico de displasias epiteliais.

Oliveira et al., (2005) também avaliaram a contagem das AgNORs através de mAgNOR e pAgNOR em 18 casos de carcinoma espinocelular de língua e relacionaram tais parâmetros com a graduação histopatológica (WAHI, 1971) destes tumores. Concluíram que as AgNORs têm relação direta com a classificação histopatológica de Wahi (1971), sugerindo que a técnica de AgNOR apresenta-se como um marcador biológico. A média da contagem das AgNORs por núcleo (mAgNOR) e principalmente pAgNOR podem ser usados para avaliar o comportamento proliferativo dos carcinomas espinocelulares de língua, principalmente naqueles classificados como grau II.

Nos últimos anos, a técnica de AgNOR tem sido usada para avaliar prognóstico de lesões malignas (PIFFKÓ et al.,1997; YUE; IWAI; FURUDA,1998).

Piffkó et al., (1997) avaliaram o valor prognóstico e a possível relação deste com o número de AgNORs e com a graduação histopatológica na zona de invasão de 94 casos de carcinoma espinocelular de diversas localizações da cavidade bucal com acompanhamento de 61 meses. A graduação histopatológica foi realizada seguindo os critérios de BRYNE (1992). Para avaliação das AgNORs, foram utilizados os parâmetros de média de contagem e média de AgNORs por núcleo e média da área de AgNORs por núcleo. Concluíram que o grau histopatológico da zona de invasão representa um importante fator prognóstico (tumores com escore de malignidade maior apresentaram pior prognóstico).Carcinomas que apresentaram menor média de AgNORs por núcleo assim como a menor área média de AgNORs mostraram prognóstico melhor. Tumores que apresentam maior extensão (T3 e T4) indicam maior probabilidade de recorrência local. A média de AgNORs na zona de invasão mostra-se um indicador independente de prognóstico na predição de sobrevida e potencial metastático.

Yue, Iwai e Furuda (1998) avaliaram a relação da quantidade das AgNORs (mAgNOR) e a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) com grau de malignidade de acordo com a classificação de Wahi (1971) e de Jacobson et al., (1973) com parâmetros clínicos, dados pelo sistema TNM e pelo prognóstico. Este último foi avaliado por dois fatores: recidiva e taxa de sobrevida em cinco anos. A mAgNOR apresentou relação direta com TNM, padrão de invasão tumoral, expressão de PCNA, maior taxa de óbitos e prognóstico desfavorável.

Outro método de análise de prognóstico é quantificar a expressão do antígeno de proliferação nuclear Ki-67. O antígeno Ki-67 é uma proteína histônica localizado no braço curto do cromossomo 10. O Ki-67 está presente nas células em proliferação, expresso exclusivamente a partir do final da fase G1, até a fase M (GERDES et al.,1983). Está associado à proliferação celular e se expressa em todas as fases do ciclo celular, menos em G0, aumentando sua expressão na última metade da fase S, atinge seu pico em G2 e M (mitose) e é rapidamente degradado após a mitose, tendo sua meia vida estimada em uma hora ou menos (BRUNO S.; DASYNKIEWICZ Z.,1992;VAN DIEST;BRUGAL;BAAK., 1998). Sua relação com a proliferação celular e com prognóstico de tumores vem sendo amplamente estudada.

Diversos estudos observaram a correlação entre expressão de Ki-67 e prognóstico, assim como a associação do Ki-67 com outros marcadores. Dentre estes se destaca o de Nördgard et al.,(1997) que avaliou a relação entre graduação histopatológica, parâmetros clínicos (estadiamento, tamanho e localização do tumor) com a expressão de Ki-67 (MIB-1) em 44 casos de carcinomas adenóide císticos. A expressão do antígeno foi maior nos tumores onde houve fracasso no tratamento (recorrência do tumor durante o tempo de acompanhamento-6,2 anos) e menor nos casos de sucesso da terapia (sem evidência do tumor no último controle).

Concluíram então que a expressão do Ki-67 é um potente instrumento prognóstico a curto prazo em pacientes portadores de carcinoma adenóide cístico.

Xie et al., (1999) investigaram os marcadores de proliferação celular Ki-67 e AgNORs e marcadores de apoptose (proteína Bax) em 220 pacientes com carcinoma espinocelular de língua classificados conforme o sistema TNM. Todos os casos apresentaram-se como M0. Tais achados foram relacionados com parâmetros clínicos e resposta ao tratamento. Falhas no tratamento, ou seja, tumores que não responderam à terapia tiveram maiores porcentagens de células positivas para Ki-67, assim como a média da contagem das AgNORs (mAgNOR) e o percentual de AgNORs por núcleo (pAgNOR). A classificação T e N não tiveram correlação com o número de AgNORs e com as células positivas para Ki-67.

Sitel et al., (1999) investigaram o valor prognóstico dos marcadores de proliferação Ki-67(MIB-I), PCNA e p53 em carcinomas espinocelulares da cavidade bucal e orofaringe tratados somente com cirurgia e com a combinação de cirurgia e radioterapia. Os casos foram classificados de acordo com o sistema TNM e graduados de acordo com suas características histopatológicas em graus I, II e III. O tempo de acompanhamento foi de 48 meses para aqueles que não apresentaram recorrência e de 35,8 meses para aqueles com recorrência. Os resultados sugerem que a expressão aumentada de células Ki-67 positivas são um indicador válido de insucesso no tratamento destes tumores.

Vicente et al., (2002) avaliaram a expressão da ciclina D1 e do Ki-67 em 35 casos de carcinomas espinocelulares de boca em diferentes localizações. A expressão aumentada da ciclina D1 correlacionou-se com o tamanho do tumor e com a presença de metástases nodais, mostrando que uma maior expressão desta proteína está não só relacionada com o prognóstico, mas também como um marcador para determinar o tratamento apropriado. O aumento da expressão de Ki-67 mostrou-se relacionada com os casos classificados

histologicamente como pouco diferenciados. O aumento da expressão tanto da proteína quanto do antígeno correlacionaram-se.

A zona de invasão também foi objeto de estudo por apresentar características mais agressivas que o restante do tumor como verificou Ramalho (2000), que avaliou a expressão imunohistoquímica da ciclina D1, Ki-67 e PCNA nas zonas central e de invasão em 30 casos de carcinomas espinocelulares de boca com diferentes graus histológicos de malignidade. Concluiu que não existe relação estatisticamente significativa entre a graduação histológica de malignidade (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987) e a expressão da ciclina D1, PCNA e Ki-67 nas zonas analisadas, assim como não existe correlação entre os marcadores e as zonas. Encontrou um maior número de células marcadas com Ki-67 e PCNA na zona de invasão, em função desta apresentar características morfológicas e moleculares mais agressivas, o que ofereceria melhor informação prognóstica.

Silva et al., (2004) avaliaram a expressão da FAZ (fatty acid synthase: enzima multifuncional cuja expressão aumentada é observada em vários tumores malignos e está relacionada como indicador prognóstico), ErbB2 (proteína membro da família Erb sendo que a alta expressão desta tem sido mostrada em tumores de mama, ovários e carcinomas de cabeça e pescoço) e do Ki-67 em 62 casos de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (língua, assoalho bucal, palato, região retromolar e mucosa jugal). Encontraram expressão concomitante de FAS e ErbB2 assim como altos índices de expressão positiva de Ki-67 naqueles casos onde a sobrevida foi menor.

A falta de relação da expressão de Ki-67 com prognóstico foi relatada por Bettendorf e Herrmann (2002). Examinaram o significado prognóstico da expressão do Ki-67 com parâmetros morfológicos tumorais e sobrevida de 5 anos pós tratamento em 329 casos de carcinoma espinocelular de boca. A expressão do Ki-67, sozinha, não teve valor prognóstico

uma vez que a correlação entre positividade de Ki-67 e média de sobrevida não foi significativa. Este fato pode ser explicado pelo Ki-67 ser um marcador estático, não trazendo informações sobre o real dinamismo do ciclo celular, além de não sofrer influência dos fatores de crescimento, como o PCNA, e por ter uma meia vida curta.

Tumuluri, Graham e Fraser (2004) avaliaram a proliferação celular através da expressão do Ki-67 na zona de invasão de 47 casos de carcinomas espinocelulares de boca. Não foi encontrada correlação positiva entre uma maior expressão do antígeno e o envolvimento de linfonodos regionais, tamanho do tumor e presença de metástases à distância. Este fato foi explicado pelo baixo número de casos e falta de estratificação entre os estes, sugerindo que estudos como este devem ser realizados em grandes centros, a fim de ter uma amostra significativa com possibilidade de acompanhamento dos pacientes. Assim, pode-se tentar relacionar a proliferação celular e sobrevida dos pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular de boca.

## **REFERÊNCIAS**

---

ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Malignancy Grading of Squamous Cell Carcinoma in the Floor of the Mouth Related to Clinical Evaluation. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 94, p. 347-358, 1986.

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**, Copenhagen, v. 95, p. 229-249, June 1987.

AMBROSCH, P.; BRINCK, U. Detection of Nodal Micrometastases in Head and Neck Cancer by Serial Sectioning and Immunostaining. **Oncology**, Switzerland, v.10, no 8, p.1221-1226,1996.

BÁNKFALVI, A.; PIFFKÓ, J. Prognostic and Predictive Factors in Oral Cancer: the Role of the Invasive Front. **J. Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.29, p. 291-298, 2000

BAREDES, S.; LEEMAN, D. J.; CHEN, T.S.; MOHIT-TABATABI, M.A. Significance of Tumour Thickness in Soft Palate Carcinoma. **Laryngoscope**, United States, v. 103, p.389-393, 1993.

BELTRÃO, V.;SAMPAIO,C.; XAVIER, M.; DUARTE, C. Clinical- Pathological Parameters in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 14, n.14 (1), 2003.

BETTENDORF,O; HERMANN, G. Prognostic Relevance of Ki-67 Antigen Expression in 329 Cases of Oral Squamous Cell Carcinoma. **ORL**, Switzerland, v.64, p.200-205, 2002.

BRODERS, A. C. The microscopic grading of cancer. **Surg Clin North Am** ,Philadelphia, v.21, p.947-951, 1941.

BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell Cycle Dependent Expression and Stability of the Nuclear Protein Detected by ki-67 Antibody in HL-60 Cells. **Cell Prolif** , Oxford, v. 25, p. 31-40, Jan,1992.

BRYNE, M.; KOPPANG, H.; STENE,T.; BANG,G.; DABELSTEEN, E. New Malignancy Grading is a Better Prognostic Indicator than Broders' Grading in Oral Squamous Carcinoma. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 18, p. 432-437, Sep.1989.

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**, Chinchester, v.166, no 4, p.375-381, Apr 1992.

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

COSTA, A.L.; PEREIRA, J.C.; NUNES, A.,A.; ARRUDA, M.L. Correlação entre a Classificação TNM, Graduação Histológica e Localização Anatômica em Carcinoma Epidermóide Oral.

**Pesqui Odontolol Bras**, São Paulo, v.16, n. 3, p.216-220, 2002.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A.; EGAN, M. J. How Should We Count AgNORs? Proposals For A Standardized Approach. **J Pathol**, London, v.58, p.185-188, July 1989.

DANTAS, D.; RAMOS, C.; COSTA, A.; SOUZA, L.; PINTO, L. Clinical-Pathological Parameters in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v.14, n.1, 2003.

DERENZINI, M.; TRERÉ, D.; PESSION, A.; GOVONI, M.; SIRRI, V.; CHIECO, P. Nucleolar Size Indicates the Rapidity of Cell Proliferation in Cancer Tissues. **J Pathol**, London, v.191, no 2, p.181-186, Jun 2000.

DERENZINI, M.; CECCARELLI, C.; SANTINI, D.; TAFFURELLI, M.; TRERÉ, D. The Prognostic Value of the AgNOR Parameter in Human Breast Cancer Depends on the pRB and p53 Status. **J Clin Pathol**, London, v. 57, p.755-761, 2004.

DIB, L.L.; SABBA, L.M.B.; MARQUES, L.A.; ARAÚJO, N.S. Fatores Prognósticos em Carcinoma de Borda de Língua: Análise Clínica e Histopatológica. **Acta Oncol Bras**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 88-93, Abr-Mai, 1994.

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.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse Monoclonal Antibody Reactive With a Human Nuclear Antigen Associated with Cell Proliferation.

**Int J Cancer**, New York, v.31, no1, p.13-20, Jan 1983.

GERVÁSIO, O.; DUTRA, R.; TARTAGLIA, S.; VASCONCELLOS, W.; BARBOSA, A.  
Oral Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Study of 740 Cases in a Brazilian  
Population. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v.12, n.1, p. 57-61, 2001.

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**, London, v.157, p.307-313,  
1989.

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

INCA -Instituto Nacional do Câncer- [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) Acessado em junho de 2005.

JACKOBSSON, P.; ENNEROTH, C; KILLANDERS,D.;MORBERGER,G.; MARTENSON,  
B. Histologic Classification and Grading of Malignancy in Carcinoma of the Larynx ( a pilot  
study). **Acta Radiol Ther Phys Biol**, Stocholm, v.12, no 1, p.1-8, Feb 1973.

LAM, K.; LAW, S. Y.; SO, M. K.; FOK, M.; MA, L.T.; WONG,J. Prognostic Implication of  
Proliferative Markers MIB-1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer**, New  
York, v.77, no 1, Jan 1996.

LINE, S.; LOPES, M.; ZAIA, A.; JÚNIOR, J. As Alterações Gênicas e o Desenvolvimento do Câncer Bucal. **Rev da APCD**, São Paulo, v. 49, jan/fev 2005.

MARTINS NETO, M. **Associação entre os Estadiamentos Clínicos T1, T2, T3 e T4 e a Gradação Histopatológica do Carcinoma Epidermóide de Língua**. Porto Alegre, 1996. 73p. Tese- Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

NÖRDGARD, S.; FRANZÉN, G.; BOYSEN, M.; HALVORSEN, T. Ki-67 As a Prognostic Marker in Adenoid Cystic Carcinoma Assessed With the Monoclonal Antibody MIB1 in Parafin Sections. **Laryngoscope**, United States, v. 107, no 4, April 1997.

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**, São Paulo, v. 25, n.1, p.20-24, Jun 2005.

PARISSE JÚNIOR, O. **Câncer de Boca: Aspectos Biológicos e Terapêuticos**. 1.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 255p.

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

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, v. 76, no 10, p. 1543-1546, 1997.

PINTO JÚNIOR, D.S. **Crítérios de Avaliação de Prognóstico-Tipo Histológico, Marcadores Imunohistoquímicos-em Biópsias de Carcinoma Epidermóide de Boca**. São Paulo, 1994 86p. Tese-Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

RAMALHO, L. M.P. **Expressão Imunohistoquímica da Ciclina D1, Ki-67 e PCNA em Carcinomas Espinocelulares de Boca-Análise Comparativa da Zona Central e da Zona de Invasão**, Porto Alegre, 2000 113p. Tese- Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

RAY, J.; CHATTOPADHYAY, A.; CAPLAN, D. Usefulness of AgNOR Counts in Diagnosing Epithelial Dysplasia. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 32, no 2 p.71-76, Feb. 2003.

SANO, K.; TAKAHASHI, H.; FUJITA,S.; INOKUCHI,T.; PE,M.B.; OKABE,H.; TSUDA,N. Prognostic Implication of Silver-Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Oral Squamous Cell Carcinoma. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 20, no 2, p. 53-56, Feb.1991.

SILVA, S.D.; AGOSTINI, M.; NISHIMOTO,I. N.; COLETTA,R.; ALVES, F.A; LOPES,M.A.;KOWALSKI,L.P.; GRANER,E. Expression of Fatty Acid Synthase, ErbB2 and Ki-67 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. A Clinicopathological Study. **Oral Oncology**, Oxford, n. 40, p.688-696, Aug, 2004.

SITTEL, C.; RUIZ, S.; VOLLING, P.; KVASNICKA, M.; JUNGEHULSING, M.; ECKEL, H. E. Prognostic Significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in Cancer of the Oropharynx and Oral Cavity. **Oral Oncology**, Oxford, v.35, no p. 583-589, Nov. 1999.

TEIXEIRA, G.; ANTONANGELO, L.; KOWALSKI, L .P.; SALDIVA, P.; FERRAZ, G.; FILHO, G. S. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions Staining Is Useful in Predicting Recurrence-Free Interval in Oral Tongue and Floor of Mouth Squamous Cell Carcinoma. **Am J Surg**, United States, no 172, p. 684-688, 1996.

TRERÉ, D. AgNO<sub>r</sub> Staining and Quantification. **Micron**, Oxford, v.31, no p. 127-131, Apr.2000.

TUMULURI, V.; GRAHAM, A. T.; FRASER, I. S. 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**, Copenhagen, v.33, no p.204-208, 2004.

UICC. **TNM-Classificação dos Tumores Malignos**. 6 ed. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 2002, 281 p.

VICENTE, J.C.; ZAPATERO-HERRERO, A.; FRESNO, M.F.; ARRANZ, J.S. Expression of Cyclin D1 and Ki-67 in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity: Clinicopathological and Prognostic Significance. **Oral Oncol**, Oxford, v.38, p.301-308, Apr, 2002.

WAHI, P. N. Tipos Histológicos de Tumores Orales y Orofaringeos. **Genebra**: Organización Mundial de la Salud, 1971.

XIE, X.; CLAUSEN, O. P.; BOYSEN, M. Diagnostic and Prognostic Value of Nucleolar Organizer Regions in Normal Epithelium, Dysplasia, and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. **Cancer**, New York, v.79, no11, p. 2200-2208, June, 1997.

XIE, X.; ANGELIS, P.; SUDBÖ, J; CLAUSEN, O. P. F.; BOYSEN, M. Prognostic Significance of Proliferative and Apoptotic Markers in Oral Tongue Squamous Cell Carcinomas. **Oral Oncol**, Oxford, no35, p.502-509, Sept, 1999.

YUE, L. IWAI, M.; FURUDA, I. Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Tongue Squamous Cell Carcinoma. **Oral Oncol**, Oxford, v. 35, p.70-76, Jan,1999.

## **PROPOSIÇÃO**

---

Avaliar a correlação entre parâmetros clínicos (TNM), graduação histopatológica, número de AgNORs por núcleo (mAgNOR e pAgNOR) e a expressão de Ki-67 na zona de invasão de dez casos de carcinoma espinocelular de língua com respectivo prognóstico.

**ARTIGO CIENTÍFICO**

---

**Relação entre Estadiamento, Características Histopatológicas, Proliferação Celular e Prognóstico de Carcinoma Espinocelular de Língua****CARVALHO, A.L.H.; LAUXEN, I.S.; SANT' ANA FILHO, M.**

Programa de Pós-Graduação em Odontologia- Mestrado em Patologia Bucal

Faculdade de Odontologia ,UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

**PALAVRAS-CHAVE**

Carcinoma espinocelular, proliferação celular, prognóstico, AgNOR e Ki-67

**INTRODUÇÃO**

O carcinoma da cavidade bucal representa de 3% a 5% do total das neoplasias malignas, sendo o espinocelular o mais freqüente. Os sítios anatômicos mais afetados são a língua, o lábio inferior e o assoalho bucal. O uso de álcool e tabaco são os fatores extrínsecos mais importantes para o desenvolvimento desta neoplasia, também associados com o curso da doença e um pior prognóstico (1,2,3).

O conhecimento dos fatores prognósticos é relevante por auxiliar a estabelecer o comportamento biológico de uma lesão, seja cancerizável ou neoplásica. O primeiro critério utilizado para avaliação prognóstica é o clínico, mundialmente conhecido como sistema TNM (4). Este sistema, não leva em consideração as características histopatológicas dos tumores e nem a relação imunológica entre tumor e hospedeiro (5,6,7,8,9).

As características histopatológicas dos tumores são também uma maneira de avaliar prognóstico, uma vez que analisam as características da população tumoral e sua relação com o hospedeiro. Muitos autores classificam os carcinomas espinocelulares de acordo com suas características morfológicas (10), sendo a classificação de Anneroth *et al.*, (11) uma das mais utilizadas, por não levar somente em conta a população tumoral (grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, número de mitoses), mas também a relação tumor x hospedeiro (estágio de invasão, padrão de invasão, infiltrado linfoplasmocitário reacional). Baseados nas características da zona de invasão, usualmente diferentes do restante do tumor por conter células menos diferenciadas (12), Bryne *et al.*, (13) propuseram um novo sistema que consiste em utilizar os critérios preconizados por Anneroth *et al.*, (11) para graduar a zona de invasão tumoral nos carcinomas espinocelulares de boca, a fim de obter informações mais precisas do comportamento tumoral. A relação entre graduação histopatológica e TNM foi estudada por alguns autores em carcinomas espinocelulares de boca (7,14,15,17).

A proliferação celular é uma das principais características do fenótipo maligno e, em função disso, o entendimento dos mecanismos reguladores do ciclo celular é um importante passo na compreensão do comportamento biológico dos tumores (19). Muitos métodos têm sido desenvolvidos para detectar a proliferação celular em tumores malignos e diferem não só no que detectam, mas também na fase do ciclo celular em que atuam (9).

Um dos métodos mais utilizados para avaliar proliferação celular é a técnica da impregnação pela prata das regiões organizadoras nucleolares (AgNORs). NORs são segmentos de DNA que nos humanos localizam-se no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 e servem de molde para codificação de RNA ribossômico (21) e são visualizadas como pequenos pontos pretos no interior do núcleo amarronzado (16). Uma vez que as AgNORs mostram a velocidade de progressão do ciclo celular, sua relação com prognóstico de carcinomas espinocelulares de boca vem sendo amplamente estudada (12,22,23,24,25,27,28), assim como sua relação com graduação histopatológica destes tumores. A quantidade de AgNORs por núcleo pode ser avaliada através da média de AgNORs por núcleo de célula (mAgNOR) e do percentual de núcleos com 1,2,3,4 ou mais AgNORs (pAgNOR)

A utilização de técnicas que detectam antígenos relacionados com a proliferação celular tem auxiliado na avaliação do comportamento clínico de alguns tumores. O antígeno de proliferação nuclear Ki-67 está presente em células em proliferação, se expressa em todas as fases do ciclo celular, atingindo seu pico na fase G2 (29,30,31,32,33). Diversos estudos

relacionaram a expressão do Ki-67 com prognóstico de tumores, assim como com a graduação histopatológica destes e com seu estadiamento clínico (34,35,36,37,38,39,40).

Baseado na literatura revisada, este trabalho tem como objetivo: avaliar a correlação entre parâmetros clínicos (TNM), graduação histopatológica, número de AgNORs por núcleo e a expressão de Ki-67 na zona de invasão tumoral com o prognóstico em carcinoma espinocelular de língua.

## METODOLOGIA

Foram estudados dez casos de carcinoma espinocelular de língua diagnosticados há mais de cinco anos no período de 1994 a 2000. Os casos foram selecionados a partir do trabalho de Martins Neto (14) utilizando-se aqueles com TNM e evolução registrados e óbito pelo tumor. Os prontuários foram solicitados ao SAMIS (Serviço de Arquivo Médico e Informações em Saúde) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e, de acordo com a evolução, foram divididos em dois grupos: mau prognóstico (presença de metástases, recidiva, óbito) e bom prognóstico (ausência de metástases á distância e/ou regionais, sobrevida livre de doença em 5 anos) (quadro 1). De cada bloco de parafina foram feitos no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, três cortes sucessivos de 4µm (Micrótomo LEICA- modelo RM2155): um foi corado por hematoxilina/ eosina (H/E), outro submetido à de impregnação pela prata para evidencição das AgNORs, segundo protocolo estabelecido por Plóton *et al.* (39) e outro marcado por meio de imunohistoquímica para evidencição do antígeno de proliferação nuclear Ki-67(MIB-1) (quadro 2).

**Quadro 1**-Classificação da amostra quanto ao estadiamento clínico e prognóstico, Porto Alegre, 2005.

Paciente	Grupo	TNM
01	Mau	T2N1M0
02	Bom	T2N0Mx*
03	Bom	T3N0M0
04	Mau	T4N1M0
05	Mau	T4N0M0
06	Mau	T3N2M0
07	Bom	T3N1M0
08	Mau	T4N0M0
09	Mau	T4N1M0
10	Mau	T4N1M0

\*Mx: não foi possível definir presença de metástases á distância.

Por meio das lâminas coradas com H/E foi estabelecida a graduação histopatológica destas, seguindo os critérios de Anneroth *et al.*, (11). A zona de invasão foi definida como as

seis últimas camadas celulares tumorais mais próximas do tecido conjuntivo e marcada nas lâminas. Nos casos onde não foi possível caracterizar com segurança a zona de invasão, foi considerado o campo no qual as células apresentavam-se com maior agressividade ( menor ceratinização). Cada parâmetro avaliado foi graduado em uma escala de 1 a 4 e a graduação histopatológica final foi dada através do maior escore atribuído nos critérios. O critério estágio de invasão foi suprimido, por tratar-se biópsias incisionais.

Os critérios de Anneroth *et al.*, (11) estão descritos a seguir:

**População Celular Tumoral:** grau de ceratinização (intenso: mais do que 50% das células; moderado: 20 a 30% das células; mínimo: de 5 a 20% das células; ausente: 0 a 5% das células); pleomorfismo nuclear\* (I- discreto: mais de 75% das células; II- moderado 50-75% das células; III- abundante: 25 a 30% das células; IV- extremo: 0 a 25%) e número de mitoses \*\* (I- 0-1 ; II-2-3; III-3-4 e IV mais do que 5). Cada parâmetro foi graduado de I a IV.

**Relação Tumor-Hospedeiro:** padrão de invasão ( I- margens bem definidas; II- cordões sólidos e/ou ilhas; III- pequenos grupos celulares; IV- invasão maciça) estágio da invasão (I- carcinoma in situ; II- invasão envolvendo apenas a lâmina própria; III- invasão abaixo da lâmina própria; IV- invasão extrema); infiltrado linfoplasmocitário (I- marcante; II- moderado; III- discreto; IV- ausente).

\*A análise do pleomorfismo nuclear considerou variações no núcleo, tamanho e forma dos núcleos celulares imaturos, alteração da relação núcleo- citoplasma e presença de núcleos hiper cromáticos.

\*\* A análise do número de mitoses foi realizada em campos de 400X.

### **Avaliação das AgNORs**

Para a contagem das AgNORs, foram capturadas imagens de campos microscópicos por meio de uma câmera de vídeo (JVC, com 1 CCD, modelo TK-C620U, colorida) acoplada a um microscópio binocular (Olympus Optical Co., modelo CH30RF100) no aumento de 400X e a um computador marca Unisys modelo Aquanta DX. Foram registradas imagens que abrangiam a zona de invasão, previamente determinada nas lâminas de H/E, utilizando-se tantos campos quantos fossem necessários. A contagem de AgNORs realizada pelo método estabelecido por Crocker *et al.*, (16). A calibragem foi realizada em um período pré-quantificação e repetida antes do término da coleta de dados.

Foi utilizado o software IMAGETOOL 3.0 ® (San Antonio, USA) instalado no computador já mencionado. Foram analisadas 100 células por lâmina no aumento de 400X.

As AgNORs foram contabilizadas por dois métodos: 1) contagem total das AgNORs nos núcleos e obtenção da média de AgNORs por núcleo (mAgNOR); 2) percentual de núcleos com 1,2,3 e 4 ou mais AgNORs (pAgNOR) (27) .

### **Avaliação do Ki-67**

Para a quantificação das células marcadas pelo anticorpo MIB-1, foi utilizado o microscópio anteriormente descrito no aumento de 400X. Foram selecionados campos dentro da zona de invasão e cada um deles foi fotografado, utilizando uma câmera digital marca SONY® P120 ZOOM óptico 3X. As imagens foram transferidas para o computador já citado e utilizado o software IMAGETOOL 3.0 ® (San Antonio, USA) para a quantificação das células marcadas. Foram contabilizadas 1000 células por lâmina, mas em dois casos este número não foi atingido por tratar-se da zona de invasão. Após a contagem do número total células, foram quantificadas as células marcadas com o anticorpo obtendo-se dois valores: número total de células e número de células marcadas com Ki-67. Foram consideradas positivas células que apresentaram núcleo com coloração marrom, independente da intensidade.

**Quadro 2-** Características da técnica imunohistoquímica utilizada, Porto Alegre, 2005.

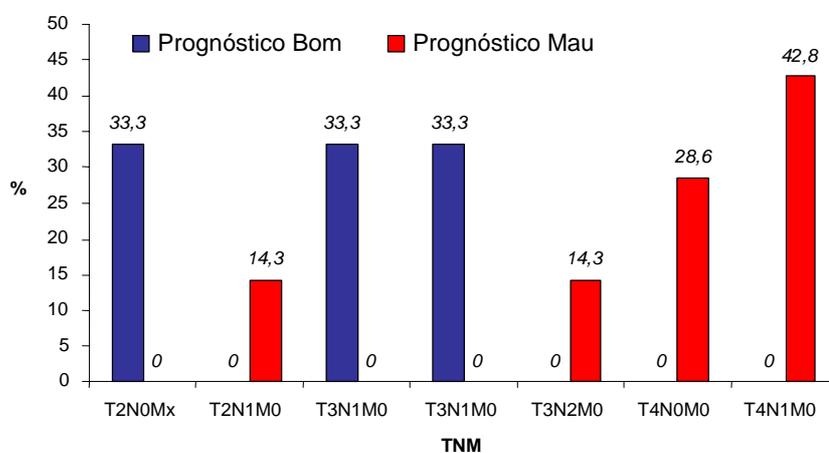
Anticorpo	Anti-Ki-67 (DAKO ®)
Clone	MIB-1
Solução	(DAKO ®)
Recuperação Antigênica	Solução de alto pH (DAKO ®) em steamer
Controle Positivo	Carcinoma espinocelular de Boca
Controle Negativo	Omissão do anticorpo primário em carcinoma espinocelular de boca

## RESULTADOS

A análise estatística deste trabalho foi realizada através de tabelas simples, cruzadas, gráficos e estatísticas descritivas (média e desvio- padrão).

Para o processamento e análise dos dados foi utilizado o software estatístico SPSS versão 10.0.

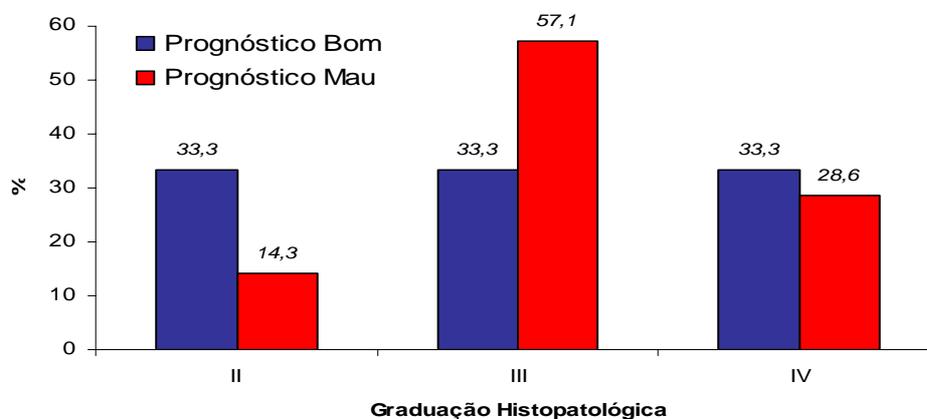
**Gráfico 1.** Distribuição da amostra de acordo com prognóstico e estadiamento clínico. Porto Alegre, 2005.



Fonte: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Analisando o gráfico 1, observa-se que no grupo de mau prognóstico estão os casos classificados como T3,T4 e um caso de T2; no grupo de bom prognóstico estão casos classificados como T2 e T3 e nenhum caso T4. Quanto à presença de metástases nodais, estiveram presentes em maior número no grupo do mau prognóstico (4 N1;1 N2) em menor número no grupo do bom prognóstico (1N1)

**Gráfico 2.** Distribuição da amostra de acordo com prognóstico e graduação histopatológica. Porto Alegre, 2005.



Fonte: Faculdade de Odontologia, UFRGS

De acordo com o gráfico 2, observa-se que a maioria dos casos pertencentes ao grupo do mau prognóstico pertencem à graduação III. No grupo do bom prognóstico, não houve predominância por nenhuma graduação

**Tabela 1.** Distribuição da amostra de acordo com o prognóstico e variáveis quantitativas (mAgNOR, pAgNOR e %Ki-67), Porto Alegre, 2005.

Variável	Prognóstico	n	Média	Desvio-padrão
Número total de AgNORs em 100 células	Bom	3	232,00	37,04
	Mau	7	226,43	24,75
Média AgNORs	Bom	3	2,32	0,37
	Mau	7	2,26	0,25
% de 1 AgNOR	Bom	3	27,00	12,49
	Mau	7	27,29	8,56
% de 2 AgNORs	Bom	3	32,33	5,03
	Mau	7	36,86	6,36
% de 3 AgNORs	Bom	3	24,00	6,56
	Mau	7	23,00	5,86
% de 4 ou mais AgNORs	Bom	3	16,33	8,02
	Mau	7	13,86	5,43
%Ki-67	Bom	3	16,80	2,88
	Mau	7	17,31	5,70

Fonte: Faculdade de Odontologia, UFRGS

Analisando a tabela 1, vê-se, descritivamente, diferença pequena entre quantidade e média de de AgNORs por núcleo entre os grupos. Já no pAgNOR, o percentual de núcleos com 2 AgNORs mostrou-se maior no grupo do mau prognóstico e pAgNOR

igual a 3 e a 4 mostrou-se maior no grupo de bom prognóstico. O percentual de Ki-67 mostrou diferença pequena entre os grupos.

**Tabela 2.** Distribuição da amostra de acordo com as variáveis quantitativas e graduação histopatológica, Porto Alegre, 2005.

Graduação Histopatológica	n	Média	Desvio-padrão
<b><u>Nº de AgNORs em 100 células</u></b>			
II	2	267,50	0,71
III	5	224,00	20,87
IV	3	208,67	14,50
<b><u>Média de AgNORs</u></b>			
II	2	2,68	0,01
III	5	2,24	0,21
IV	3	2,09	0,14
<b><u>% de 1 AgNOR</u></b>			
II	2	17,50	0,71
III	5	25,00	7,04
IV	3	37,33	4,04
<b><u>% de 2 AgNORs</u></b>			
II	2	31,50	6,36
III	5	38,60	4,16
IV	3	33,00	8,00
<b><u>% de 3 AgNORs</u></b>			
II	2	29,00	2,83
III	5	23,20	4,02
IV	3	19,67	7,64
<b><u>% de 4 ou mais AgNORs</u></b>			
II	2	22,50	2,12
III	5	13,20	5,76
IV	3	11,67	3,21
<b><u>%Ki-67</u></b>			
II	2	21,85	7,85
III	5	15,44	2,53
IV	3	16,89	5,75

Fonte: Faculdade de Odontologia, UFRGS

De acordo com a tabela 2, pode-se observar que a quantidade de AgNORs, assim como mAgNOR é maior naqueles casos classificados como grau II e menor nos classificados como grau IV. Quanto ao pAgNOR, a porcentagem de células com 1 AgNOR é maior nos casos classificados como grau IV; pAgNOR igual a 2 é maior nos casos classificados como grau III; pAgNOR igual a 3 é maior nos casos classificados como grau II, assim como pAgNOR igual ou maior do que 4. A porcentagem de células marcadas com Ki-67 é maior também nos casos classificados como grau II.

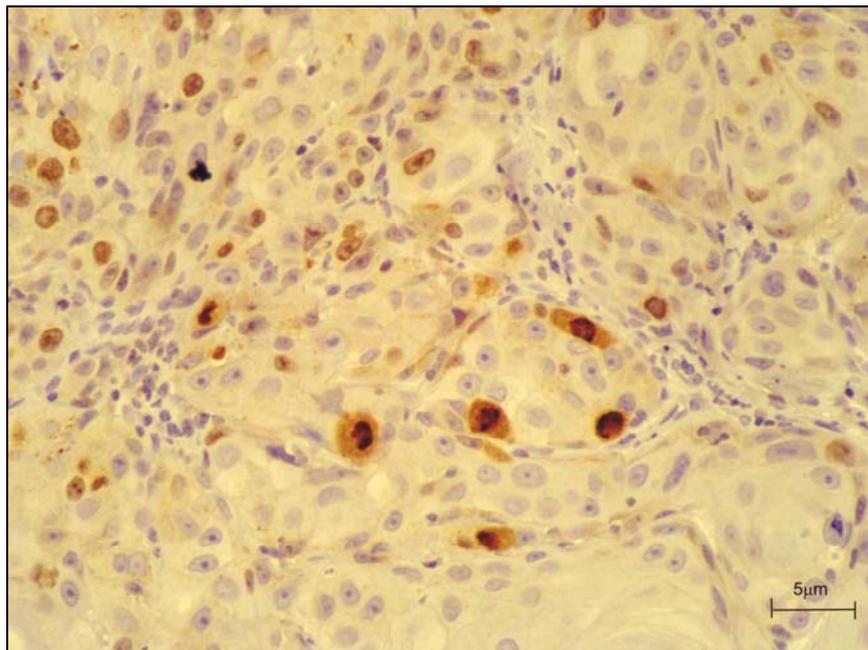


Figura 1- Fotomicrografia da expressão de Ki-67 em carcinoma espinocelular de língua. Aumento original 100X. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - UFRGS

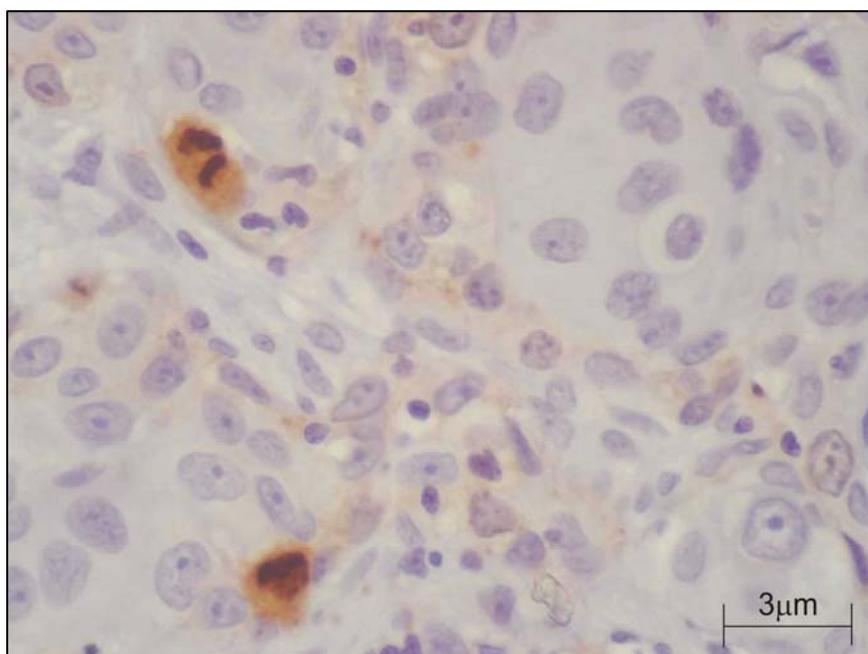


Figura 2- Fotomicrografia da expressão de Ki-67 em carcinoma espinocelular. Aumento original 400X. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - UFRGS

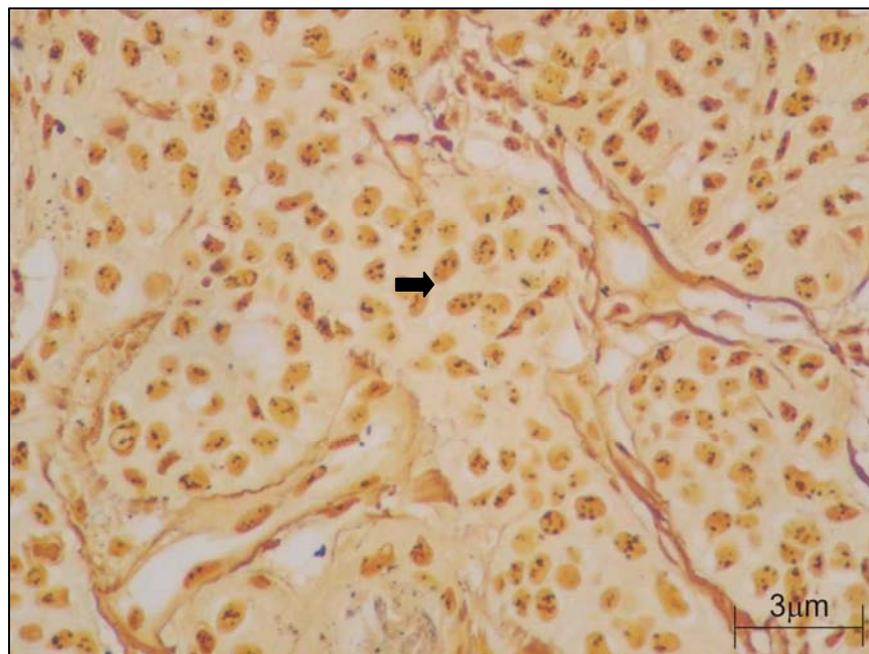


Figura 3- Fotomicrografia do padrão de distribuição das AgNORs (3 pontos) em carcinoma espinocelular de língua (seta). Aumento original 400X. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - UFRGS

## DISCUSSÃO

De acordo com os dados analisados, observa-se o predomínio de casos classificados como T3 e T4 (8 casos), mostrando que o diagnóstico do carcinoma espinocelular de boca ainda é tardio, seja pela falta de informação da população quanto ao auto-exame da boca ou pela deficiência das campanhas de prevenção desta neoplasia. A maioria dos pacientes busca atendimento quando apresentam lesões já em estágios avançados.

Em relação ao sistema TNM, T4 pode ser considerado um fator prognóstico independente, a maior quantidade destes casos pertencem ao grupo do mau prognóstico.

A graduação histopatológica, nos casos deste estudo, não mostrou relação com o sistema TNM e nem com prognóstico uma vez que tanto no grupo do bom quanto no do mau prognóstico os casos foram classificados como II,III,IV.

Os valores das médias de AgNORs são compatíveis com malignidade, apesar de não ter havido diferença de mAgNOR nos dois grupos. Tal fato pode ser explicado em função da maioria dos casos classificados como mau prognóstico serem T4 e das biópsias incisionais não terem acessado as partes de invasão, onde a proliferação celular é mais acentuada, podendo os resultados terem sido diferentes se fosse usada a peça inteira. Sabe-se que o crescimento dos tumores dá-se de forma exponencial no início e nas fases seguintes a velocidade de proliferação é mais lenta (9).

A afirmação anterior concorda também com os valores encontrados de pAgNOR, que mostraram um maior percentual de células com pAgNOR igual a 2 no grupo do mau prognóstico e pAgNOR igual ou maior que 4 no grupo do bom prognóstico, concordando com Xie *et al.*, (27) que disseram que quanto maior é o percentual de pAgNOR igual a 3 e 4 ou mais, mais intensa é a atividade proliferativa da lesão. Uma vez que se sabe que a população tumoral é heterogênea e que as células localizadas mais profundamente correspondem às margens mais invasivas e esta porção é mais facilmente acessada em lesões menores. Isto explicaria uma maior atividade proliferativa no grupo do bom prognóstico, em função do acesso facilitado à real zona de invasão.

A expressão de Ki-67 mostrou-se maior nos casos classificados como grau II, indicando que, nestes casos, a avaliação da proliferação pode ter algum valor prognóstico. Houve diferença pequena entre os grupos de bom e mau prognóstico em relação à expressão de Ki-67. Costa *et al.*,(17) também não encontraram relação entre características clínicas (TNM) e a expressão de Ki-67 e PCNA, assim como não encontraram relação entre sistema TNM e graduação histopatológica. Alguns estudos não relacionam a expressão do antígeno

com prognóstico, como Bettendorf *et al.*, (40) alegando que o Ki-67 é um marcador estático, não avaliando o real dinamismo do ciclo celular. Ramalho (37) observou que existe diferença da positividade deste antígeno nas diferentes zonas de carcinomas espinocelulares de boca, ou seja, há maior expressão na zona de invasão do que na zona central, evidenciando a relação deste com proliferação. Enquanto alguns estudos mostram a correlação positiva entre a expressão de Ki-67 e prognóstico, alguns mostram o contrário. Tumuluri *et al.*, (9) também avaliaram a expressão de Ki-67 na zona de invasão de carcinomas espinocelulares e não encontraram relação entre positividade do antígeno e sobrevida dos pacientes. Esta divergência da literatura se deve a falta de padronização dos estudos que pode ocorrer por dois aspectos: pela técnica imunohistoquímica que pode variar em relação ao sistema de detecção, a marca, clone e diluição do anticorpo, tipo de recuperação antigênica utilizada e pela falta de homogeneidade das amostras (26). A especificação da área tumoral analisada é um fator relevante nos resultados, uma vez que poucos especificam a área avaliada. Em nossa opinião, este tipo de estudo deve focar-se, preferencialmente, na zona de invasão.

Concluiu-se que T4 por si só já é um indicador prognóstico. Pode-se sugerir que os tumores classificados como T2, por serem de menor tamanho, permitem acesso à real zona de invasão possibilitando que os marcadores de proliferação tenham valor prognóstico. O mesmo ocorre nos classificados como grau II, uma vez que foram os que apresentaram as maiores médias de AgNORs e a maior expressão de Ki-67, podendo os marcadores de proliferação, nestes casos, ajudar a definir o prognóstico de carcinomas espinocelulares de língua.

#### **Agradecimentos:**

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Centro de Pesquisas, Unidade de Estomatologia, SAMIS (Serviço de Arquivo Médico e Informações em Saúde) e Laboratório de Patologia, pela autorização e empréstimo de material.

## REFERÊNCIAS

---

- 1.LINE, S.; LOPES, M.; ZAIA, A.; JÚNIOR, J. As Alterações Gênicas e o Desenvolvimento do Câncer Bucal. **Rev da APCD**, São Paulo,v. 49, jan/fev 2005.
- 2.BELTRÃO,V.;SAMPAIO, C.;XAVIER, M.; DUARTE,C.Clinical- Pathological Parameters in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 14, n.14 (1), 2003.
- 3.GERVÁSIO, O.; DUTRA, R.; TARTAGLIA, S.; VASCONCELLOS, W.; BARBOSA, A. Oral Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Study of 740 Cases in a Brazilian Population. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto,v.12, n.1, p. 57-61, 2001.
- 4.UICC.TNM- **Classificação dos Tumores Malignos**. 6º ed. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 2002, 281 p.
- 5.BAREDES, S.; LEEMAN, D. J.; CHEN, T.S.; MOHIT-TABATABI, M.A. Significance of Tumour Thickness in Soft Palate Carcinoma. **Laryngoscope**, United States, v. 103, p.389-393, 1993.
- 6.AMBROSCH, P.; BRINCK, U. Detection of Nodal Micrometastases in Head and Neck Cancer by Serial Sectioning and Immunostaining. **Oncology**, Switzerland, v.10, no 8, p.1221-1226, 1996.
- 7.DIB, L.L.; SABBA,L.M.B.; MARQUES, L.A.; ARAÚJO,N.S. Fatores Prognósticos em Carcinoma de Borda de Língua: Análise Clínica e Histopatológica. **Acta Oncol Bras**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 88-93, Abr-Mar, 1994.
- 8.PARISSE JÚNIOR, O. **Câncer de Boca: Aspectos Biológicos e Terapêuticos**. 1º.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 255p.
- 9.TUMULURI, V.; GRAHAM, A. T.; FRASER, I. S. 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**, Copenhagen, v.33, p.204-208, 2004.
- 10.BRODERS, A.C. The microscopic grading of cancer. **Surg Clin North Am.**, v.21, p.947-951, 1941.
- 11.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**, Copenhagen, v. 95, p. 229-249, June 1987.
- 12.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, v. 76, n.10, p. 1543-1546, 1997.

13. BRYNE, M.; KOPPANG, H.; STENE, T.; BANG, G.; DABELSTEEN, E. New Malignancy Grading is a Better Prognostic Indicator than Broders' Grading in Oral Squamous Carcinoma. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 18, p. 432-437, Sep. 1989.
14. MARTINS NETO, M. Associação entre os Estadiamentos Clínicos T1, T2, T3 e T4 e a Gradação Histopatológica do Carcinoma Epidermóide de Língua. Porto Alegre, 1996. 73p. Tese- Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
15. PINTO JÚNIOR, D.S. Critérios de Avaliação de Prognóstico- Tipo Histológico, Marcadores Imunohistoquímicos- em Biópsias de Carcinoma Epidermóide de Boca. São Paulo, 1994 86p. Tese-Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
16. CROCKER, J.; BOLDY, D. A.; EGAN, M. J. How Should We Count AgNORs? Proposals For A Standardized Approach. **J Pathol**, London, v.158, p.185-188, July 1989
17. COSTA, A.L.; PEREIRA, J.C.; NUNES, A.,A.; ARRUDA, M.L. Correlação entre a Classificação TNM, Gradação Histológica e Localização Anatômica Em Carcinoma Epidermóide Oral. **Pesq Odontol Bras**, São Paulo, v.16,n.3, p.216-220, 2002.
18. DANTAS, D.; RAMOS, C.; COSTA, A; SOUZA, L.; PINTO, L. Clinical-Pathological Parameters in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v.14, n.1.2003.
19. LAM, K.; LAW, S. Y.; SO, M. K.; FOK, M.; MA, L.T.; WONG, J. Prognostic Implication of Proliferative Markers MIB-1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer**, New York, v.77, no 1, Jan 1996.
20. BETTENTORF, O.; PIFFKÓ, J.; BÁNKALFI, A. Prognostic and Predictive Factors in Oral Squamous Cell Cancer: Important Tools for Planning Individual Therapy? **Oral Oncol**, v.40, p.110-119, Aug, 2004.
21. 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**, London, v.157, p.307-313, 1989
22. DERENZINI, M.; TRERÉ, D.; PESSION, A.; GOVONI, M.; SIRRI, V.; CHIECO, P. Nucleolar Size Indicates the Rapidity of Cell Proliferation in Cancer Tissues. **J Pathol**, London, v.191, no 2, p.181-186, Jun 2000.
23. DERENZINI, M.; CECCARELLI, C.; SANTINI, D.; TAFFURELLI, M.; TRERÉ, D. The Prognostic Value of the AgNOR Parameter in Human Breast Cancer Depends on the pRB and p53 Status. **J Clin Pathol**, London, v. 57, p.755-761, 2004.
24. PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic Relevance of AgNORs in Tumor Pathology. **Micron**, Oxford, v. 31, p. 133-141, 2000.
25. SANO, K.; TAKAHASHI, H.; FUJITA, S.; INOKUCHI, T.; PE, M.B.; OKABE, H.; TSUDA, N. Prognostic Implication of Silver-Binding Nucleolar Organizer Regions

(AgNORs) in Oral Squamous Cell Carcinoma. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 20, no2, p. 53-56, Feb.1991.

26.PICH, A.; CHIUSA, L.; NAVONE, R. Prognostic Relevance of Cell Proliferation in Head and Neck Tumours. **Annals of Oncology**, v.15, p.1319-1329, Jan 2004

27.XIE, X.; CLAUSEN, O.P.; BOYSEN, M. Diagnostic and Prognostic Value of Nucleolar Organizer Regions in Normal Epithelium, Dysplasia, and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. **Cancer**, New York, v.79, no 11, p. 2200-2008, June, 1997.

28.YUE, L. IWAI, M.; FURUDA, I. Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Tongue Squamous Cell Carcinoma. **Oral Oncol**, Oxford, v. 35, p.70-76, Jan, 1999.

29.GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN,H. Production of a mouse Monoclonal Antibody Reactive With a Human Nuclear Antigen Associated with Cell Proliferation. **Int J Cancer**, New York, v.31, n.1, p.13-20, Jan 1983.

30.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

31.BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z.. Cell Cycle Dependent Expression and Stability of the Nuclear Protein Detected by ki-67 Antibody in HL-60 Cells. **Cell Prolif** , Oxford, v. 25, p. 31-40, Jan,1992.

32.VICENTE, J.C.; ZAPATERO-HERRERO, A.; FRESNO, M.F.; ARRANZ, J.S. Expression of Cyclin D1 and Ki-67 in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity: Clinicopathological and Prognostic Significance. **Oral Oncol**, Oxford, v.38, p.301-308, Apr 2002.

33.NORDGARD, S.; FRANZÉN, G.; BOYSEN, M.; HALVORSEN,T. Ki-67 As a Prognostic Marker in Adenoid Cystic Carcinoma Assessed With thr Monoclonal Antibody MIB1 in Parafin Sections. **Laryngoscope**, United States, v. 107, no4., April 1997.

34.XIE, X.; ANGELIS, P.; CLAUSEN, O. P. F.; BOYSEN, M. Prognostic Significance of Proliferative and Apoptotic Markers in Oral Tongue Squamous Cell Carcinomas. **Oral Oncol**, Oxford, no.35, p.502-509, Sept 1999.

35.SITTEL, C.; RUIZ, S.; VOLLING, P.; KVASNICKA, M.; JUNGEHULSING, M.; ECKEL, H. E. Prognostic Significanceof Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in Cancer of the Oropharynx and Oral Cavity. **Oral Oncology**, Oxford, v.35, p. 583-589, Nov. 1999.

36.COSTA, A L.L.; RAMOS,C.C.F.; MELO,F.C.C.; OLIVEIRA,M.C. Correlação do PCNA, ki-67 e AgNOR com TNM e Grau Histológico em Carcinoma de Língua. **Pesq Odontol Brasileira**,v.16, no 1, p.226-220,2002.

37.RAMALHO, L. M.P. Expressão Imunohistoquímica da Ciclina D1, Ki-67 e PCNA em Carcinomas Espinocelulares de Boca-Análise Comparativa da Zona Central e da Zona de Invasão, Porto Alegre, 2000 113p. Tese- Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

38.SILVA,S.;D.;AGOSTINI,M.;NISHIMOTO,I.N.;COLETTA,R.;ALVES,F.A;LOPES,M.;KOWALSKI,L.P.;GRANER,E. Expression of Fatty Acid Synthase, ErbB2 and Ki-67 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. A Clinicopathological Study. **Oral Oncology**, Oxford, no 40, p.688-696, Aug 2004.

39.PLÓTON,D.;MENAGER,M.;JEANNESSON,P.;HIMBER,G.;PIGEON,F.;ADNET,J.J.Improvement in the Staining and in the Visualization of the Argyrophilic Proteins of the Nucleolar Organizer Region of the Optical Level. **Histochem**, v. 18, p. 5-14, 1986.

40.BETTENDORF.O; HERMANN, G. Prognostic Relevance of ki-67 Antigen Expression in 329 Cases of Oral Squamous Cell Carcinoma. **ORL**, v.64, p.200-205, 2002.

