

LAURA DE CAMPOS HILDEBRAND

**QUANTIFICAÇÃO DAS AgNORs NOS DISTÚRBIOS DE
MATURAÇÃO EPITELIAL PRESENTES EM
LEUCOPLASIAS DA MUCOSA BUCAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final à obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Onofre Francisco de Quadros

Porto Alegre, RS
Faculdade de Odontologia

2005

“Happiness is inward, and not outward;
and so, it does not depend on what we
have, but on what we are.”

Henry Van Dyke.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Elisabeth
Campos Hildebrand e Raul Hildebrand
por estarem sempre presentes e dispostos
a ajudar, apoiar ou simplesmente ouvir.
Amo muito vocês dois!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Maria Elisabeth** e **Raul**, e minha irmã querida **Luizila**, pelo amor, dedicação e incentivo constante, não só durante estes dois anos, mas toda a minha vida.

Ao meu namorado **José Luís**. É maravilhoso te ter ao meu lado em mais um momento importante na minha vida, que sejam muitos mais!

À minha **família**, avós, tios e primos por serem sempre meu porto seguro e a base da minha educação, estabilidade e principalmente, felicidade.

Ao professor e amigo **Onofre Francisco de Quadros**, pelo qual tenho grande respeito e admiração. Muito obrigado pela atenção e apoio nos momentos mais complicados!

Em especial ao Professor **Manoel Sant'Ana Filho** por suas idéias, discussões e paciência durante o curso de mestrado, mas principalmente por ter idealizado e participado da realização este trabalho.

À professora **Anna Cecília Moraes Chaves** pelo auxílio na parte inicial deste trabalho e por estar sempre disposta a ajudar.

Ao professor **Pantelis Varvaki Rados** pelo exemplo na conduta profissional e pelos ensinamentos na área de Patologia.

À **Isabel Lauxen** pela ajuda na realização deste trabalho; por estar sempre pronta a responder e solucionar as dúvidas que surgiram até o último minuto. Muito obrigada por tudo!

Aos colegas da turma de mestrado, mas em especial às colegas da Patologia: **Ana Luisa**, **Luhana** e **Márcia** que tornaram estes dois anos de mestrado inesquecíveis e mais divertidos. Meninas, a companhia de vocês é MARAVILHOSA!

“We do not remember days; we remember moments”.

Anonymous.

Ao Professor **Lauro Nunes da Rosa** pela amizade e por ter sido a primeira pessoa a despertar o meu interesse pelo estudo e compreensão das patologias bucais.

Aos alunos **Tiago Carvalho** e **Guilherme Sieck**, bolsistas de iniciação científica da Patologia Bucal, pela amizade e ajuda não só na realização deste trabalho, mas também nos afazeres do dia-a-dia.

Às bibliotecárias **Norma Ataíde**, **Eloísa Pftischer**, **Rejane Klaes** e **Mailing Leitão** pelo auxílio na busca por referências bibliográficas para a confecção deste estudo.

À **Bianca Barbieri** pela ajuda na realização da parte prática deste trabalho.

À **Adriana Aguiar** pela atenção e colaboração nos assuntos burocráticos.

Ao nosso querido secretário **Leandro Nunes** pela ajuda e inúmeros favores, mas também por sempre me manter informada das vitórias do nosso timão, o Internacional.

À **Dona Marina** por seu carinho e bom humor que nos contagiam mesmo nos dias mais difíceis. Nós todos do quinto andar sentimos muito a sua falta.

Tais, **Scheyla**, **Denise**, **Adriana**, **Viviane**, **Gisele**, **Renata** e **Ana Paula**, minhas amigas do coração, pela amizade e apoio desde o primeiro semestre da graduação.

À **Faculdade de Odontologia** da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por ter me acolhido na graduação e na pós-graduação, sendo a minha segunda casa durante seis anos.

À **CAPES** que tornou possível a realização deste curso de Pós-Graduação através de bolsa de estudos.

A leucoplasia se caracteriza por apresentar, microscopicamente, hiperkeratose, acantose ou displasia epitelial. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a velocidade de proliferação celular destes distúrbios de maturação epitelial por meio da Técnica de AgNOR. A amostra foi constituída de 50 blocos de parafina distribuídos em 5 grupos de acordo com seu diagnóstico histopatológico em hiperkeratose, hiperkeratose com acantose, acantose, displasia epitelial e epitélio normal. Para cada grupo foram avaliadas as células da camada basal e suprabasal e a quantificação das AgNORs foi realizada através da média dos pontos de AgNOR por núcleo, da área média dos pontos de AgNOR por núcleo e do percentual médio de células com 1, 2, 3 e 4 ou mais pontos de AgNOR por núcleo. Verificou-se que a média de pontos de AgNOR por núcleo aumentou gradualmente do epitélio normal, hiperkeratose com acantose, hiperkeratose, acantose até a displasia epitelial. Na comparação em relação à área média dos pontos de AgNOR por núcleo observou-se diferença significativa entre o epitélio normal e os demais grupos. Verificou-se ainda que em todos os grupos há o predomínio de células com 1 AgNOR, e o epitélio normal apresentou valor superior. No entanto, a displasia epitelial apresentou maior percentual de células com 4 ou mais AgNORs por núcleo, demonstrando o maior potencial de transformação maligna, uma vez que este parâmetro pode representar um sinal de malignidade. Todavia, os três métodos de quantificação não foram capazes de distinguir os distúrbios de maturação epitelial entre si. A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que os distúrbios de maturação epitelial estudados apresentam ritmo de proliferação celular semelhante e que, dentre eles, a acantose e displasia epitelial têm comportamento de maior risco. Portanto, uma leucoplasia que apresente qualquer um dos distúrbios de maturação epitelial no diagnóstico histopatológico, a conduta clínica deve ser semelhante.

Palavras-Chave: Leucoplasia, AgNOR, Proliferação Celular.

Leukoplakia microscopically manifests itself by showing, hyperkeratosis, acanthosis or epithelial dysplasia. The aim of the present work was to evaluate, through the AgNOR's technique, the rate of cell proliferation of these epithelial maturation disturbances. The sample was constituted of 50 paraffin blocks distributed in 5 groups according to its histopathologic diagnosis over; hyperkeratosis, hyperkeratosis with acanthosis, acanthosis, epithelial dysplasia and normal epithelium. Each group has been evaluated on the cells of the basal and suprabasal layer. The AgNOR quantification was carried out by the average dots of AgNOR per nucleus, the average area of the dots of AgNOR per nucleus, and the average percentage of nuclei with 1, 2, 3 and 4 or more AgNORs dots. It has been verified that the AgNOR dots average per nucleus increased gradually on the normal epithelium, on the hyperkeratosis with acanthosis, on the hyperkeratosis, and on the acanthosis up to the epithelial dysplasia. In the comparison of the average area of the AgNORs, it was noticed a significant difference between normal epithelium and the remaining groups. Furthermore, it has been verified in the groups the existence of predominant cells with 1 AgNOR, whereas the normal epithelium presented superior value. However, epithelial dysplasia presented a higher percentage of cells with 4 or more AgNORs dots per nucleus, evidencing a higher potential of malignant transformation once this may be a reference of malignancy signal. Notwithstanding, the three methods of quantification accomplished were not capable of distinguishing the maturation epithelial disturbances between themselves. As per the results, it is concluded that the maturation epithelial disturbances present similar rate of cell proliferation and that, among them, the acanthosis and epithelial dysplasia has larger risk behavior. Therefore, a leukoplakia presenting histopathologic diagnosis of any maturation epithelial disturbances should have the similar clinical control.

Keywords: Leukoplakia, AgNOR, Cell Proliferation.

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....	09
OBJETIVOS.....	17
REFERÊNCIAS.....	18
ARTIGO CIENTÍFICO*.....	24
Introdução.....	24
Metodologia.....	25
Resultados.....	28
Tabelas.....	29
Figuras.....	32
Discussão.....	35
Conclusão.....	41
Agradecimentos.....	42
Referências.....	43
ANEXO.....	47

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

A leucoplasia é definida como uma mancha ou placa branca, não removível por raspagem e que não pode ser classificada clinicamente ou histopatologicamente como qualquer outra doença (KRAMER et al., 1978; PINDBORG et al., 1997; SILVERMAN, 1998; NEVILLE et al., 2004). É a lesão cancerizável mais frequente na mucosa bucal e, embora nem todos os casos de câncer estejam associados a leucoplasia, sua presença pode auxiliar a prevenção do câncer de boca (SILVERMAN, 1998; NEVILLE, 2004).

A leucoplasia pode ocorrer em qualquer região da boca, porém verifica-se maior risco de transformação maligna nas lesões localizadas nos sítios anatômicos de maior prevalência do câncer de boca. Relação similar é observada nos fatores etiológicos evidenciando a semelhança biológica entre as duas doenças (KRAMER et al., 1978; LUMERMAN; FREEDMAN; KERPEL, 1995; SILVERMAN, 1998; NEVILLE et al., 2004). Porém, a relação entre o fumo e o desenvolvimento da leucoplasia não pode ser claramente definida, uma vez que a suspensão deste hábito nem sempre leva à remissão da lesão. Bem como, pacientes não fumantes podem ser portadores de leucoplasia, apresentando maior risco de desenvolvimento do câncer do que pacientes fumantes, uma vez que mesmo não havendo a presença do agente irritante, a mucosa se apresenta alterada (SILVERMAN, 1998).

O termo leucoplasia é utilizado para o diagnóstico clínico, uma vez que as lesões são classificadas microscopicamente como distúrbios de maturação epitelial, tornando a biópsia indispensável para a determinação do diagnóstico histopatológico (KRAMER et al., 1978; PINDBORG et al., 1997; JOHNSON; VAN DER WAAL; AXÉLL, 1997; VAN DER WAAL; SCHEPMAN; VAN DER MEIJ, 2000). Entretanto, a biópsia incisional isoladamente não pode ser considerada representativa, visto que a lesão pode apresentar variação no padrão microscópico. Desta forma, a correta avaliação deve ser realizada com exame histopatológico

completo do material através de cortes semi-seriados (LUMERMAN; FREEDMAN; KERPEL, 1995; ROSOLEN, 1997). Após a determinação do diagnóstico histopatológico a conduta seguida frente à leucoplasia é a suspensão dos possíveis fatores etiológicos, associada ao acompanhamento clínico e excisão cirúrgica da lesão (KRAMER et al, 1978; JOHNSON; VAN DER WAAL; AXÉLL, 1997; SILVERMAN, 1998; SUDBØ; REITH, 2003; NEVILLE et al., 2004).

Os distúrbios de maturação epitelial são características histopatológicas que representam alterações no ritmo de proliferação e diferenciação celular e resultam em um aumento da espessura do epitélio da mucosa bucal, observado clinicamente como lesões brancas (KRAMER et al., 1978). Os distúrbios são classificados de acordo com sua morfologia em hiperkeratose (hiperortoceratose ou hiperparaceratose), acantose e displasia epitelial, podendo estar presentes em conjunto ou isoladamente na mesma lesão.

A hiperkeratose se caracteriza pelo aumento anormal da camada de ceratina que tanto pode ser constituída de paraceratina ou ortoceratina. Na paraceratina, as células superficiais achatadas retêm os núcleos e boa parte das organelas, enquanto que na ortoceratina essas células perdem suas organelas e seu citoplasma é ocupado por grande quantidade de filamentos de citoqueratina. A acantose, por sua vez, é o espessamento da camada espinhosa do epitélio, apresentando como principais características o alongamento das papilas epiteliais e a união em linha reta entre o tecidos conjuntivo e epitelial (TILCKE, 1965; ARAÚJO, 1984; ALLEGRA; GENNARI, 2000). A displasia epitelial apresenta células com diferentes graus de atipia localizadas geralmente nas camadas mais internas do epitélio, no entanto, com a evolução da lesão, podem atingir toda a extensão do tecido, sendo então classificada como carcinoma *in situ* (KRAMER et al., 1978; MATTOS, 1992; LUMERMAN; FREEDMAN; KERPEL, 1995). A displasia epitelial pode ser classificada de acordo com a extensão das alterações em leve, moderada e severa, todavia estudos demonstram que não há consenso

sobre o critério de avaliação, uma vez que lesões avaliadas por diferentes patologistas apresentam diagnósticos histopatológicos variando entre displasia leve e carcinoma *in situ* (PINDBORG; REIBEL; HOLMSTRUP, 1985; KARABULUT et al., 1995; VAN DER WAAL; SCHEPMAN; VAN DER MEIJ, 2000).

Segundo Kramer *et al.* (1978), as seguintes alterações morfológicas podem ser observadas na displasia epitelial:

- Perda da polaridade das células da camada basal;
- Duplicação da camada basal;
- Aumento da proporção núcleo/citoplasma;
- Papilas epiteliais em forma de gota;
- Estratificação epitelial irregular;
- Aumento do número de figuras de mitoses (algumas com aspecto atípico);
- Presença de mitoses na metade superficial do epitélio;
- Pleomorfismo celular;
- Núcleos hipercromáticos;
- Nucléolos volumosos;
- Perda da aderência intercelular;
- Ceratinização individual ou de grupos de células na camada espinhosa.

Cabe ressaltar que nem todas as características acima citadas devem necessariamente estar presentes no mesmo caso, bem como a ocorrência de atipia celular pode estar presente em áreas inflamadas (KRAMER et al., 1978). Wright e Shear (1985) avaliaram as áreas de displasia epitelial adjacente a carcinomas espinocelulares e concluíram que a presença de duplicação da camada basal, de núcleos hipercromáticos, de perda da aderência intercelular e sinais de alteração da maturação epitelial são características histopatológicas de pior prognóstico, uma vez que estavam presentes em mais de 80% dos casos. Baseando-se neste

estudo, Lumerman, Freedman e Kerpel (1995) estabeleceram que as características de duplicação da camada basal, papilas epiteliais em forma de gota e núcleos volumosos e hipercromáticos, associadas ou não aos outros sinais displásicos são suficientes para caracterizar a presença de displasia epitelial.

A leucoplasia apresenta potencial de transformação maligna de 3 a 6% em um período de até 10 anos e este tempo diminui na presença de displasia epitelial no exame histopatológico (KRAMER et al., 1978; PINDBORG et al., 1997; SILVERMAN, 1998; NEVILLE et al., 2004). Lumerman, Freedman e Kerpel (1995) em estudo retrospectivo observaram que, dos casos de leucoplasia com diagnóstico histopatológico de displasia epitelial, 16% sofreram transformação maligna em até 6 anos. Um dos fatores determinantes para a transformação maligna das leucoplasias é o aumento da proliferação das células epiteliais. Na tentativa de avaliar a proliferação celular, vários autores têm estudado diferentes marcadores de proliferação celular, dentre os quais a técnica de AgNOR tem sido utilizada para avaliar não só a atividade como também a velocidade de proliferação celular (XIE et al., 1997; CECCARELLI, 2000; DERENZINI, 2000; PICH; CHIUSA; MARGARIA, 2000; SPOLIDORIO et al., 2002; DERENZINI et al., 2004).

A técnica de AgNOR possibilita a visualização das regiões organizadoras nucleolares (NORs) por meio da impregnação pela prata (GOODPASTURE; BLOOM, 1975; HOWELL; BLACK, 1980; PLOTON et al., 1986 CROCKER, 1989; DERENZINI; PLOTON, 1991). As NORs são segmentos de DNA onde se encontram os genes que codificam o RNA ribossomal (RNAr). No DNA humano, as NORs se localizam no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 (ALBERTS et al., 1997). A técnica de AgNOR marca as proteínas ácidas não histônicas associadas às NORs ativas durante a interfase (DERENZINI; PLOTON, 1991). As principais proteínas identificadas são a nucleolina (proteína C23), a nucleofosmina (fosfoproteína B23) e a RNA polimerase I que estão relacionadas com a

síntese de RNAr, portanto a quantidade destas proteínas na interfase está diretamente relacionada à velocidade de proliferação celular (TRERÈ; PESSION; DERENZINI, 1989; DERENZINI et al., 2000; SIRRI; ROUSSEL; HERNADEZ-VERDUM, 2000; PICH; CHIUSA; MARGARIA, 2000; DERENZINI et al., 2004). As estruturas visualizadas por meio desta técnica aparecem sob a forma de pontos negros dentro do núcleo de coloração castanha (CROCKER, 1989; DERENZINI, 2000; SIRRI; ROUSSEL; HERNADEZ-VERDUM, 2000; TRERÈ, 2000).

Os pontos de AgNOR podem assumir configurações diferentes (fig.1), tais como: um ponto único e bem definido dentro do núcleo, pontos individualizados no interior do núcleo ou vários e pequenos pontos espalhados pelo núcleo, padrão visto com mais frequência em células com alta velocidade de proliferação (CROCKER et al., 1989). As diferenças encontradas na morfologia das AgNORs são originadas pelo início da síntese de RNAr no final da mitose, quando as regiões organizadoras nucleolares e suas proteínas relacionadas tornam-se ativas e se agrupam para formar um único nucléolo (ALBERTS et al., 1997). Porém, na medida em que o ciclo celular ocorre com maior velocidade, não há tempo suficiente para o agrupamento dos cromossomos, resultando em uma maior quantidade de AgNOR presente no núcleo. Portanto, o número e tamanho das AgNORs na interfase variam de acordo com a atividade de síntese de RNAr e velocidade do ciclo celular (DERENZINI; PLOTON, 1991; SCHWINT et al., 1994; DERENZINI, 2000; DERENZINI et al., 2004).



FIGURA 1. Diferentes configurações das AgNORs. Aumento original 1000x.
FONTE: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - UFRGS.

Em revisão bibliográfica, Pich, Chiusa e Margaria (2000), concluíram que um maior número de AgNORs por núcleo usualmente está associado à tumores de baixo grau de diferenciação, podendo ser esta técnica um importante mecanismo para avaliar o prognóstico de tais lesões. Em estudos recentes, os autores observaram que, quanto maior a contagem de pontos por núcleo, pior é o prognóstico, uma vez que indica uma maior velocidade de proliferação das células tumorais (TRETÈ; PESSION; DERENZINI, 1989; SANO et al., 1991; XIE et al., 1997; CECCARELLI, 2000; DERENZINI, 2000; DERENZINI et al., 2000; LORENZATO et al., 2000; PICH; CHIUSA; MARGARIA, 2000; DERENZINI et al., 2004). Deste modo, a maior quantidade de AgNORs por núcleo caracteriza tumores pouco diferenciados e com rápido crescimento.

As AgNORs podem ser quantificadas a partir da média dos pontos de AgNOR por núcleo (mAgNOR), da área média dos pontos de AgNOR por núcleo e do percentual médio de pontos de AgNOR por núcleo (pAgNOR). A contagem da média dos pontos de AgNOR por núcleo diretamente no microscópio óptico foi o primeiro método de avaliação proposto por Crocker *et al.* (1989), entretanto foi considerado subjetivo e pouco reprodutível quando os pontos aparecem sobrepostos e são contados como um AgNOR (TRETÈ, 2000). Além disso, este método não leva em consideração a dimensão de cada ponto, que pode ser muito variável em células com alta velocidade de duplicação.

Em dois estudos, os autores demonstraram que a média dos pontos de AgNORs por núcleo pode ser utilizada para diferenciar leucoplasias com e sem presença de epitélio displásico, porém há necessidade de realização de estudos com amostra maior para determinar a validade deste critério (CHATTOPADHYAY; RAY; CAPLAN, 2002; RAY; CHATTOPADHYAY; CAPLAN, 2003). Entretanto, outros estudos apresentaram resultados conflitantes sobre a capacidade do mAgNOR em distinguir a mucosa normal da boca de

lesões de papiloma (CABRINI et al., 1992; FONSECA; CARMO, 2000). Segundo Tretè (2000), esta discordância pode ocorrer devido às variações no padrão de quantificação dos pontos de AgNOR de cada estudo. Todavia, vários autores observaram um aumento gradual de pontos de AgNOR por núcleo na medida em que o epitélio bucal normal sofre alterações de maturação até sua progressão para lesão maligna (CABRINI et al., 1992; WARNAKULASURIYA; JOHNSON, 1993; CHATTOPADHYAY; CHAWDA; DOSHI, 1994; XIE et al., 1997; FONSECA; CARMO, 2000; SULKOWSKA et al., 2001; CHATTOPADHYAY; RAY; CAPLAN, 2002; PANDIT; AITHAL, 2002; SPOLIDORIO et al., 2002), sugerindo que o mAgNOR pode ser utilizado para determinar o prognóstico de lesões com displasia epitelial (WARNAKULASURIYA; JOHNSON, 1993; CHATTOPADHYAY; CHAWDA; DOSHI, 1994; XIE et al., 1997; CHATTOPADHYAY; RAY; CAPLAN, 2002; PANDIT; AITHAL, 2002).

Derenzini *et al.* (1989) e Rüschoff *et al.* (1990) introduziram o método de mensuração da área de AgNOR, que se mostrou mais objetivo e reproduzível, uma vez que facilita a análise dos pontos sobrepostos, que dificultam a padronização no método de contagem (TRETÈ; MIGALDI; TRENTIN, 1995; TRETÈ, 2000; CECCARELLI, 2000). Ao contrário do que ocorre com o mAgNOR, a mensuração da área pode compensar a variação na quantificação das AgNORs produzida pelo uso de diferentes agentes fixadores, bem como a variação produzida pela espessura do corte, uma vez que é realizada a análise por meio de imagens digitalizadas (RÜSCHOFF et al., 1990). Além disso, a mensuração da área se mostrou mais eficaz para determinar o prognóstico de tumores malignos (ÖFNER et al., 1995; XIE et al., 1997; CECCARELLI, 2000; LORENZATO et al., 2000). Entretanto, vários autores observaram que o mAgNOR foi mais sensível para a quantificação das AgNORs do que a mensuração da área (CABRINI et al., 1992; CARRARD et al., 2004).

O pAgNOR avalia a percentagem de células com 1, 2, 3 e 4 ou mais pontos de AgNOR por núcleo (MOURAD et al., 1992). Xie *et al.* (1997) observaram que o pAgNOR se mostrou mais eficaz para determinar o prognóstico do carcinoma espinocelular do que o mAgNOR, sendo que o pAgNOR>1 evidencia melhor esta relação. Segundo os autores, este método de contagem é mais fácil e não necessita equipamentos sofisticados para sua realização. Porém, Ray, Chattopadhyay e Caplan (2003) notaram que o pAgNOR não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as amostras de leucoplasias com e sem epitélio displásico, não podendo ser empregado para diferenciar as duas lesões.

A técnica de AgNOR evidencia as células que proliferam com maior velocidade, logo a avaliação quantitativa da distribuição das AgNORs tem sido utilizada com o propósito de determinar o prognóstico de vários tipos de tumores (XIE et al., 1997; PICH; CHIUSA; MARGARIA, 2000; DERENZINI, 2000; LORENZATO et al., 2000; DERENZINI et al., 2004). O mesmo ocorre para as lesões cancerizáveis da mucosa bucal, entretanto, os trabalhos científicos que quantificaram as AgNORs em leucoplasias classificaram suas amostras em epitélio com ou sem displasia epitelial, não especificando a ocorrência dos outros distúrbios de maturação epitelial (WARNAKULASURIYA; JOHNSON, 1993; CHATTOPADHYAY; CHAWDA; DOSHI, 1994; XIE et al., 1997; SULKOWSKA et al., 2001; PANDIT; AITHAL, 2002; CHATTOPADHYAY; RAY; CAPLAN, 2002; SPOLIDORIO et al., 2002; RAY; CHATTOPADHYAY; CAPLAN, 2003).

OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a velocidade de proliferação celular dos distúrbios de maturação epitelial acantose, hiperkeratose, hiperkeratose com acantose e displasia epitelial por meio da Técnica de AgNOR.

ESPECÍFICO

Verificar se há variação na quantificação da média dos pontos de AgNORs por núcleo, da área média dos pontos de AgNORs por núcleo e do percentual médio de células com 1, 2, 3 e 4 ou mais pontos de AgNOR por núcleo entre os distúrbios de maturação epitelial e compará-los com o epitélio normal.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. O núcleo da Célula. In: _____. **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. Cap. 8, p. 379-385.

ALLEGRA, F.; GENNARI, P. U. **Doenças da Mucosa Bucal**. 2. ed. São Paulo: Santos, 2000. 228p.

ARAÚJO, N. S.; ARAÚJO, V. C. **Patologia Bucal**. São Paulo: Artes Médicas, 1984. 239p.

CABRINI, R. L. et al. Morfometric Study of Nucleolar Organizer Regions in Human Oral Normal Mucosa, Papilloma and Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 21, no. 6, p. 275-279, July 1992.

CARRARD, V. C. et al. Quantification of Silver Staining Nucleolar Organizer Region in Epithelial Cells of Tongue of Mice After Exposure to, or Intake of Alcohol. **Alcohol**, New York, v. 34, no. 2-3, p. 233-238, Oct./Nov. 2004.

CECCARELLI, C. et al. AgNOR In Breast Tumours. **Micron.**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 143-149, Apr. 2000.

CHATTOPADHYAY, A.; CHAWDA, J. G.; DOSHI, J. J. Silver-Binding Nucleolar Organizing Regions: a Study of Oral Leukoplakia and Squamous Cell Carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 23, no. 6 Pt 1, p. 374-377, Dec. 1994.

CHATTOPADHYAY, A.; RAY, J. G.; CAPLAN, D. J. AgNOR Count as Objective Marker for Dysplastic Features in Oral Leukoplakia. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 31, no. 9, p. 512-517, Oct. 2002.

CROCKER, J.; BOLDY, D. A. R.; EGAN, M. How Should We Count AgNORs? Proposals for a Standardized Approach. **J. Pathol.**, London, v. 158, no. 3, p. 185-188, July 1989.

DERENZINI M. et al. Distribution of Silver-Stained Interphase Nucleolar Organizer Regions as a Parameter to Distinguish Neoplastic from Nonneoplastic Reactive Cells in Human Effusions. **Acta. Citol.**, St Louis, v. 33, no. 4, p. 491-498, July/Aug. 1989.

DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase Nucleolar Organizer Regions in Cancer Cells. **Int. Rev. Exp. Pathol.**, New York, v. 32, p. 149-192. 1991.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron.**, Oxford, v. 31, no.2, p. 117-120, Apr. 2000.

DERENZINI et al. Nucleolar Size Indicates The Rapidity Of Cell Proliferation In Cancer Tissues. **J. Pathol.**, London, v. 191, no.2, p. 181-186, June 2000.

DERENZINI, M. et al. The Prognostic Value of the AgNOR Parameter in Human Breast Cancer Depends on the Prb and P53 Status. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 57, no. 7, p. 755-761, July 2004.

FONSECA, L. M. S.; CARMO, M. A. V. AgNORs in Hyperplasia, Papilloma and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 11, no.2, p. 105-110. 2000.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes Using Silver Staining. **Chromosoma**, Berlin, v. 53, no. 1, p. 37-50, Nov. 1975.

HOWEL, M. W.; BLACK, D. A. Controlled Silver-Staining of Nucleolus Organizer Regions with a Protective Colloidal Developer: a 1-Step Method. **Experientia**, Basel, v. 36, no. 8, p. 1014-1015, Aug. 1980.

JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I.; AXÉLL, T. Oral Leukoplakia. **Oral Diseases**, Copenhagen, v. 3, no.1, p. 43-48, Mar. 1997.

KARABULUT, A. et al. Observer Variability in the Histologic Assessment of Oral Premalignant Lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 24, no.5, p. 198-200, May 1995.

KRAMER, R. H.; PINDBORG, J. J.; LUCAS, R. B.; SOBIN, L. H. Definition of Leukoplakia and Related Lesions: an Aid to Studies on Oral Precancer. WHO. **Oral Surg.**, St Louis, v. 46, no. 4, p. 518-539, Oct. 1978.

LORENZATO, M. et al. Proliferation Assessment in Breast Câncer: a Doublé-Staining Technique for AgNOR Quantification in MIB-1 Positive Cells Especially Adapted for Image Cytometry. **Micron**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 151-159, Apr. 2000.

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral Epithelial Dysplasia and the Development of Invasive Squamous Cell Carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 79, no. 3, p. 321-329, Mar. 1995.

MATTOS, M. C. F. I. Transtornos do Crescimento e da Diferenciação Celulares. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia – Processos Gerais**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. Cap. 12, p. 183-192.

MOURAD, W. A. et al. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Breast Carcinoma. **Cancer.**, New York, v. 69, no.7, p. 1739-1744, Apr. 1992.

NEVILLE, B. et al. Patologia Epitelial. In: _____. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 10, p. 252-313.

ÖFNER, D. et al. Standardized Staining and Analysis of Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Associated Proteins (AgNORs) in Radically Resected Colorectal Adenocarcinoma – Correlation with Tumor Stage and Long-Term Survival. **J. Pathol.**, London, v. 175, no. 4, p. 441-448, Apr. 1995.

PANDIT, S.; AITHAL, D. A. Qualitative and Quantitative Estimation of AgNORs in Dysplastic and Non-Dysplastic Leukoplakias. **Indian J. Dent. Res.**, Ahnedabad, v. 13, no. 1, p. 27-30, Jan./Mar. 2002.

PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic Relevance of AgNORs in Tumor Pathology. **Micron.**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 133-141, Apr. 2000.

PINDBORG, J. J.; REIBEL, J.; HOLMSTRUP, P. Subjectivity in Evaluating Oral Epithelial Dysplasia, Carcinoma in Situ and Initial Carcinoma. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 14, no. 9, p. 698-708, Oct. 1985.

PINDBORG, J. J. et al. Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. **World Health Organization: International Histological Classification of Tumors**. 2. Ed. Berlin: Springer-Verlang, 1997. 87 p.

PLOTON, D. et al. Improvement in the Staining and in the Visualization of the Argyrophilic Proteins of the Nucleolar Organizer Region of the Optical Level. **Histochem. J.**, London, v. 18, no. 1, p. 5-14, Jan. 1986.

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

ROSOLEN, M. A. **Avaliação das Alterações Microscópicas na Leucoplasia Bucal por Meio de Cortes Histológicos Semi-Seriados**. 1997. 54 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RÜSCHOFF, J. et al. Evaluation of Nucleolus Organizer Regions (NORs) by Automatic Image Analysis: a Contribution to Standardization. **J. Pathol.**, London, v. 161, no. 2, p. 113-118, June 1990.

SANO, K. et al. 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.

SCHWINT, A. E. et al. Nucleolar Organizer Regions in Lining Epithelium Adjacent to Squamous Cell Carcinoma of Human Oral Mucosa. **Cancer**, New York, v. 73, no. 11, p. 2674-2679, June 1994.

SILVERMAN JUNIOR, S. Leukoplakia and Erythroplasia. In: _____. **Oral Cancer**. 4 ed. Canadá: B C Decker, 1998. Cap. 3, p. 25- 40.

SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUN, D. The AgNOR Proteins: Qualitative and Quantitative Changes During the Cell Cycle. **Micron**. Oxford, v. 31, no. 2, p. 121-126, Apr. 2000.

SPOLIDORIO, L. C. et al. Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Oral Tumor Progression. **Micron**., Oxford, v. 33, no. 7-8, p. 605-608, Dec. 2002.

SUDBØ, J.; REITH, A. Wich Putatively Pre-Malignant Oral Lesions Become Oral Cancers? **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 32, no. 2, p. 63-70, Feb. 2003.

SULKOWSKA, M. et al. Proliferating Activity in Oral Dysplastic Leasions and Squamous Cell Carcinomas. **Folia Histochem. Cytobiol.**, Warszawa, v. 39, Suppl. 2, p. 191-192. 2001.

TIECKE, R. W. **Oral Pathology**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1965. 873 p.

TRERÈ, D.; PESSION, A.; DERENZINI, M. The Silver-Staining Proteins of Interphasic Nucleolar Organizer Regions as a Parameter of Cell Duplication Rate. **Exp. Cell. Res.**, New York, v. 184, no. 1, p. 131-137, Sep. 1989.

TRETÈ, D.; MIGALDI, M.; TRENTIN, G. P. Higher Reproducibility of Morphometric Analysis Over the Counting Method for Interphase Agnor Quantification. **Anal. Cell. Pathol.**, Amsterdam, v. 8, no. 1, p. 57-65, Jan. 1995.

TRERÈ, D. Agnor Staining and Quantification. **Micron**., Oxford, v. 31, no. 2, p. 127-131, Apr. 2000.

VAN DER WAAL, I.; SCHEPMAN, K. P., VAN DER MEIJ, E. H. A Modified Classification and Staging System for Oral Leukoplakia. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 36, no. 2, p. 264-266, May 2000.

WARNAKULASURIYA, K. A. A. S.; JOHNSON, N. W. Nucleolar Organiser Region (NOR) Distribution as a Diagnostic Marker in Oral Keratosis, Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 22, no. 2, p. 77-81, Feb. 1993.

WRIGHT, A.; SHEAR, M. Epithelial Dysplasia Immediately Adjacent to Oral Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 14, no. 7, p. 559-564, Aug. 1985.

XIE, X. et al. Diagnostic and Prognostic Value of Nucleolar Organizer Regions in Normal Epithelium, Dysplasia and Squamous Carcinoma of the Oral Cavity. **Cancer.**, New York, v. 79, no. 11, p. 2200-2208, June 1997.

**Quantificação das AgNORs nos distúrbios de maturação epitelial presentes em
leucoplasias da mucosa bucal**

LAURA C. HILDEBRAND^{1,2}, MANOEL SANT'ANA FILHO^{1,2}, ISABEL S. LAUXEN^{1,2} e
ONOFRE F. QUADROS^{1,2}

¹Faculdade de Odontologia, ²Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre,
Brasil.

INTRODUÇÃO

A leucoplasia é uma mancha ou placa branca, não removível por raspagem e que não pode ser classificada clinicamente ou histopatologicamente como qualquer outra doença (1-4). Entretanto, o termo leucoplasia é utilizado apenas para o diagnóstico clínico, pois microscopicamente as lesões apresentam distúrbios de maturação epitelial que resultam em um aumento da espessura da mucosa bucal observados clinicamente como lesões brancas (1,2,5,6). Os distúrbios de maturação epitelial são características histopatológicas que representam alterações no ritmo de proliferação e diferenciação celular e são classificados de acordo com sua morfologia em hiperkeratose, acantose e displasia epitelial. A hiperkeratose é o aumento da camada de queratina, a acantose o aumento da camada espinhosa e a displasia epitelial a presença de células com diferentes graus de atipia (1,7-12). De acordo com a literatura, as leucoplasias apresentam potencial de transformação maligna, principalmente quando há presença da displasia epitelial no diagnóstico histopatológico (1-4,12). Um dos fatores determinantes para a transformação maligna é o aumento descontrolado da proliferação das células epiteliais. No intuito de avaliar o potencial de transformação maligna

das leucoplasias, vários autores têm estudado diferentes marcadores de proliferação celular, entre eles a técnica de AgNOR (13-18), a qual possibilita a visualização das regiões organizadoras nucleolares (NORs) ativas durante a interfase por meio da impregnação pela prata. As NORs são segmentos de DNA onde se encontram os genes que codificam o RNA ribossômico (RNAr). No DNA humano, as NORs se localizam no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 (19). Diferentes estudos observaram aumento gradual da média de pontos de AgNOR por núcleo na medida em que o epitélio bucal normal sofre alterações de maturação até sua progressão para lesão maligna (13,17,20-27). Entretanto, os trabalhos científicos classificam suas amostras em epitélio com ou sem displasia epitelial, não especificando a ocorrência dos outros distúrbios de maturação epitelial que podem estar presentes no diagnóstico histopatológico de leucoplasias (13,17,21,22,24-27).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a velocidade de proliferação celular dos distúrbios de maturação epitelial hiperqueratose, acantose, hiperqueratose com acantose e displasia epitelial por meio da quantificação da média dos pontos de AgNORs por núcleo (mAgNOR), da área média dos pontos de AgNORs por núcleo e do percentual médio de pontos de AgNOR por núcleo (pAgNOR).

METODOLOGIA

O material utilizado é proveniente de um levantamento dos dados do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul realizado entre os anos de 1960 e 2003. Foram encontrados 200 casos com diagnóstico histopatológico de acantose, hiperqueratose (hiperparakeratose e hiperortoceratose), hiperqueratose com acantose e displasia epitelial que apresentavam nas fichas de biópsia o diagnóstico clínico de leucoplasia. A partir deste levantamento, foram

selecionados 10 blocos de parafina de cada diagnóstico histopatológico e 10 blocos de tecido epitelial da mucosa bucal normal utilizados em estudo anterior desenvolvido no mesmo laboratório. Todos os diagnósticos histopatológicos foram reconfirmados e classificados baseados nas características especificadas pela literatura, para a determinação de displasia epitelial foi utilizado critério estabelecido por Lumerman *et al.* (12). De cada uma das 50 amostras estudadas foram feitos 2 cortes de 3 μm (micrótomo LEICA – modelo RM2155), um foi submetido à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e outro à impregnação pela prata segundo protocolo estabelecido por Ploton *et al.* (28).

Foram selecionados campos típicos dos distúrbios nos cortes corados por HE e capturadas imagens correspondentes nas lâminas de AgNOR por meio de uma câmera de vídeo JVC modelo TK-C620 (1 CCD, Victor Co., Tokyo, Japão) acoplada a um microscópio binocular Olympus Optical Co. (modelo CH30RF100) no aumento de 400x. As imagens foram registradas utilizando o software Microsoft VidCap 32 (Microsoft Corp. – USA) com resolução 440 x 330px (1 μm = 8,7 px) instalado em um computador da marca UNISYS® (modelo Aquanta DX). As imagens capturadas foram de campos que mostravam as células da camada basal e um campo consecutivo acima na direção da superfície do tecido para a visualização das células da camada suprabasal. Foram utilizadas 6 imagens de cada lâmina, sendo 3 para a contagem de células da camada basal, caracterizadas por apresentarem pelo menos um ponto de contato com o tecido conjuntivo adjacente e 3 para células da camada suprabasal, localizadas em porção mais superficial do que as primeiras, porém sem apresentar morfologia achatada, típica de células da camada superficial (29). Evitou-se campos em que houvesse infiltrado inflamatório subepitelial, excluindo células com núcleo sobreposto e áreas com artefatos.

A quantificação das AgNORs foi realizada por meio da média dos pontos de AgNOR por núcleo (mAgNOR), da área média dos pontos de AgNOR por núcleo e o percentual médio

(pAgNOR) de células com 1, 2, 3 e 4 ou mais pontos de AgNOR por núcleo através da análise das imagens digitalizadas, utilizando-se o software IMAGELAB (Sistema de Processamento e Análise de Imagens, Softium Sistemas de Informática, São Paulo, Brasil), versão 2.3, seguindo as especificações do fabricante. A quantificação das AgNORs foi realizada de acordo com os protocolos estabelecidos na literatura (30,47,48,49).

Foi estabelecido padrão-ouro de contagem com patologista da equipe, padronizando os critérios de quantificação dos pontos de AgNOR. A reprodutibilidade foi confirmada ao longo do estudo, onde para cada lâmina, uma imagem foi sorteada para recontagem. Com o objetivo de comparar os valores obtidos da 1ª e da 2ª leitura foi realizado o teste de comparações *t-student* para amostras pareadas, verificando-se não existir diferenças significativas entre as elas. Fez-se o cegamento do observador por meio da identificação dos grupos de forma numérica, classificando os diagnósticos histopatológicos em Grupo 1, Grupo 2, Grupo 3, Grupo 4 e Grupo 5, sem o conhecimento do diagnóstico correspondente a cada número. Foram confeccionadas tabelas, gráficos e estatísticas descritivas (média e desvio-padrão) que foram submetidos ao teste de *Kolmogorov-Smirnov* indicando a amostra ser de distribuição normal. Para a comparação entre os grupos foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de comparações múltiplas de Tukey. Para a comparação entre as camadas basal e suprabasal dentro do mesmo grupo, foi utilizado o teste *t-student* para amostras pareadas. Para o processamento e análise destes dados foi utilizado o software estatístico SPSS versão 10.0. Ao final da análise estatística, os grupos foram identificados de acordo com seu diagnóstico histopatológico para possibilitar a avaliação dos resultados.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Comissão de Pesquisas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESULTADOS

As AgNORs foram observadas como pontos negros no interior do núcleo de coloração castanha das células epiteliais em todos os grupos (Figs. 1, 2, 3, 4 e 5).

Por meio do teste *t-student* para amostras pareadas, apesar de não existir diferença significativa entre o mAgNOR das camadas basal e suprabasal dos grupos estudados, observou-se que na acantose, hiperkeratose com acantose e hiperkeratose a média foi maior na camada suprabasal e na displasia epitelial e epitélio normal a média foi maior na camada basal. Na comparação da área média de pontos de AgNOR por núcleo verificou-se que existe diferença significativa entre as médias das camadas basal e suprabasal e que a média da área foi superior na camada suprabasal de todos os grupos (tabela 1). Não foi observada diferença significativa na comparação do pAgNOR entre as camadas de cada grupo, porém verificou-se que na acantose e displasia epitelial a distribuição dos valores de pAgNOR apresentou menor variância (gráfico 1).

Comparando os cinco grupos estudados através do teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) em relação ao mAgNOR, verificou-se que foi possível encontrar diferença significativa entre a acantose e displasia epitelial com o epitélio normal. Observou-se que a média dos pontos de AgNOR por núcleo aumenta gradualmente, apresentando uma ordem crescente do epitélio normal, hiperkeratose com acantose, hiperkeratose, acantose até displasia epitelial. Quando avaliados somente os valores obtidos na camada basal, observou-se que há diferença significativa entre o epitélio normal e displasia. Na camada suprabasal o mAgNOR apresentou diferença significativa entre os grupos acantose, displasia epitelial e hiperkeratose com o epitélio normal, este último tendo valores inferiores aos demais. Na comparação dos cinco grupos em relação à área média dos pontos de AgNOR por núcleo verificou-se que existe diferença significativa entre o epitélio normal e os demais grupos, tanto na quantificação das camadas basal e suprabasal quanto na contagem das duas camadas

juntas (tabela 2). Na comparação do pAgNOR entre os grupos estudados (tabela 3), verificou-se que há predomínio de células com 1 AgNOR, com o grupo de epitélio normal apresentando valor superior, e que este parâmetro estabeleceu entre os grupos a mesma relação observada no mAgNOR. Entretanto, os três métodos de quantificação dos pontos de AgNOR não foram capazes de distinguir os distúrbios de maturação epitelial entre si.

Tabela 1. Resultados do teste *t-student* para amostras pareadas na comparação da média de pontos de AgNOR por núcleo \pm desvio-padrão (DP) e da área média dos pontos de AgNOR por núcleo \pm desvio-padrão (DP) entre as camadas basal e suprabasal de todos os grupos, Porto Alegre, 2005.

<i>Variável</i>	<i>Média AgNOR \pm DP</i>	<i>p</i>	<i>Área Média \pm DP</i>	<i>p</i>
Acantose				
Camada Basal	1,89 \pm 0,30	0,33	1,25 \pm 0,42	\leq 0,01
Camada Suprabasal	1,98 \pm 0,43		1,97 \pm 0,69	
Hiperkeratose com Acantose				
Camada Basal	1,74 \pm 0,48	0,24	1,07 \pm 0,35	\leq 0,01
Camada Suprabasal	1,83 \pm 0,42		1,68 \pm 0,56	
Displasia Epitelial				
Camada Basal	2,12 \pm 0,71	0,60	1,24 \pm 0,56	\leq 0,02
Camada Suprabasal	2,01 \pm 0,28		1,65 \pm 0,47	
Hiperkeratose				
Camada Basal	1,78 \pm 0,29	0,17	1,24 \pm 0,32	\leq 0,01
Camada Suprabasal	1,96 \pm 0,51		1,99 \pm 0,76	
Epitélio Normal				
Camada Basal	1,49 \pm 0,26	0,23	1,97 \pm 0,39	\leq 0,01
Camada Suprabasal	1,39 \pm 0,16		3,45 \pm 1,39	

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

Tabela 2. Resultados da Análise de Variância (ANOVA) e o teste de comparações múltiplas de Tukey na comparação da média de pontos de AgNOR por núcleo \pm desvio-padrão (DP) e da área média dos pontos de AgNOR por núcleo \pm desvio-padrão (DP) entre os grupos, Porto Alegre, 2005.

<i>Grupos</i>	<i>Média AgNOR \pm DP</i>	<i>p</i>	<i>Área Média \pm DP</i>	<i>p</i>
Geral				
Acantose	1,94 \pm 0,35 ^A	0,01*	1,70 \pm 0,45 ^A	0,01*
Hiperkeratose com Acantose	1,84 \pm 0,52 ^{AB}		1,44 \pm 0,48 ^A	
Displasia Epitelial	2,02 \pm 0,32 ^A		1,50 \pm 0,45 ^A	
Hiperkeratose	1,87 \pm 0,39 ^{AB}		1,66 \pm 0,49 ^A	
Epitélio Normal	1,43 \pm 0,17 ^B		2,69 \pm 0,59 ^B	
Camada Basal				
Acantose	1,89 \pm 0,30 ^{AB}	0,014*	1,25 \pm 0,42 ^A	0,01*
Hiperkeratose com Acantose	1,74 \pm 0,48 ^{AB}		1,07 \pm 0,35 ^A	
Displasia Epitelial	2,12 \pm 0,71 ^A		1,24 \pm 0,56 ^A	
Hiperkeratose	1,78 \pm 0,29 ^{AB}		1,24 \pm 0,32 ^A	
Epitélio Normal	1,49 \pm 0,26 ^B		1,97 \pm 0,39 ^B	
Camada Suprabasal				
Acantose	1,98 \pm 0,43 ^A	0,01*	1,97 \pm 0,69 ^A	0,01*
Hiperkeratose com Acantose	1,83 \pm 0,42 ^{AB}		1,68 \pm 0,56 ^A	
Displasia Epitelial	2,01 \pm 0,28 ^A		1,65 \pm 0,47 ^A	
Hiperkeratose	1,96 \pm 0,51 ^A		1,99 \pm 0,76 ^A	
Epitélio Normal	1,39 \pm 0,16 ^B		3,46 \pm 1,39 ^B	

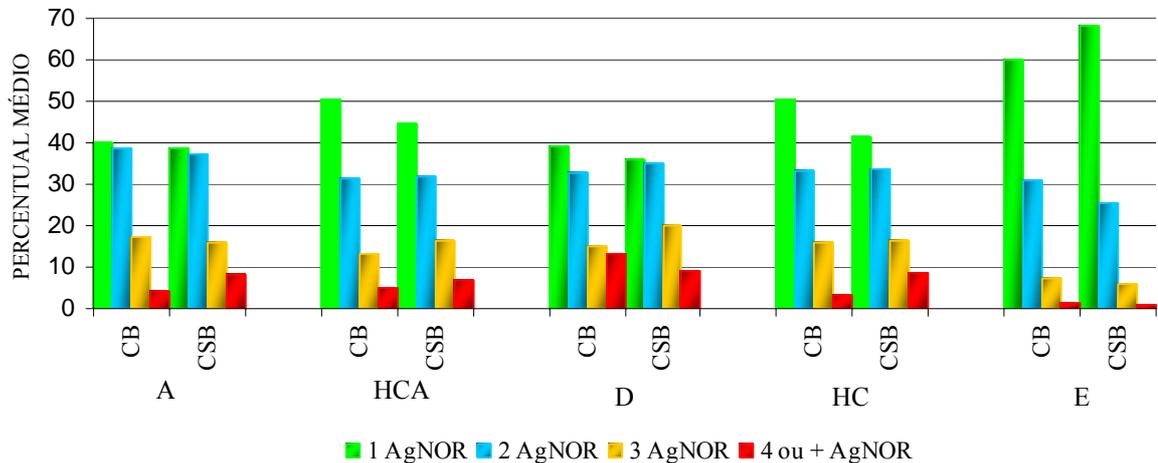
Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.
Nota: *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Tabela 3. Resultados da Análise de Variância (ANOVA) e o teste de comparações múltiplas de Tukey na comparação do percentual médio de núcleo com 1, 2, 3 e 4 ou mais pontos de AgNOR \pm desvio-padrão (DP) entre os grupos, Porto Alegre, 2005.

Comparação	% 1 AgNOR		% 2 AgNOR		% 3 AgNOR		% 4 ou + AgNOR	
	Média \pm DP	p	Média \pm DP	p	Média \pm DP	p	Média \pm DP	p
Geral								
Acantose	39,33 \pm 11,53 ^A	0,01*	37,33 \pm 4,87 ^A	0,01*	16,31 \pm 7,77 ^{AB}	0,02*	7,02 \pm 6,58	0,12
Hiperkeratose/Acantose	46,41 \pm 20,16 ^A		32,04 \pm 5,96 ^{AB}		15,06 \pm 10,05 ^{AB}		6,60 \pm 10,31	
Displasia Epitelial	37,25 \pm 9,66 ^A		34,77 \pm 5,30 ^A		18,15 \pm 7,26 ^A		9,84 \pm 7,01	
Hiperkeratose	45,13 \pm 13,84 ^A		32,88 \pm 2,54 ^{AB}		15,62 \pm 8,88 ^{AB}		6,37 \pm 7,22	
Epitélio Normal	65,07 \pm 12,19 ^B		27,27 \pm 7,85 ^B		6,45 \pm 4,46 ^B		1,21 \pm 1,16	
Camada Basal								
Acantose	39,82 \pm 13,41 ^{AB}	0,05*	38,68 \pm 8,82	0,42	17,30 \pm 9,23	0,18	4,20 \pm 4,86 ^{AB}	0,05*
Hiperkeratose/Acantose	50,28 \pm 20,67 ^{AB}		31,53 \pm 7,60		13,25 \pm 10,24		5,08 \pm 7,58 ^{AB}	
Displasia Epitelial	38,99 \pm 17,15 ^A		32,68 \pm 11,32		14,96 \pm 8,47		13,37 \pm 17,59 ^A	
Hiperkeratose	50,54 \pm 16,13 ^{AB}		33,25 \pm 8,25		15,84 \pm 10,07		3,24 \pm 4,24 ^{AB}	
Epitélio Normal	60,16 \pm 18,84 ^B		30,76 \pm 12,63		7,48 \pm 8,79		1,32 \pm 2,24 ^B	
Camada Suprabasal								
Acantose	38,78 \pm 14,75 ^A	0,01*	37,22 \pm 7,01 ^A	0,01*	15,70 \pm 8,07 ^{AB}	0,02*	8,30 \pm 8,06	0,20
Hiperkeratose/Acantose	44,62 \pm 21,47 ^A		31,94 \pm 8,75 ^{AB}		16,40 \pm 11,42 ^{AB}		7,04 \pm 12,51	
Displasia Epitelial	36,04 \pm 9,82 ^A		35,18 \pm 4,91 ^A		19,80 \pm 9,47 ^A		8,98 \pm 4,39	
Hiperkeratose	41,44 \pm 18,14 ^A		33,46 \pm 6,48 ^{AB}		16,38 \pm 10,76 ^{AB}		8,73 \pm 10,52	
Epitélio Normal	68,07 \pm 11,13 ^B		25,24 \pm 7,40 ^B		5,85 \pm 4,45 ^B		1,05 \pm 1,31	

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.
Nota: *Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Gráfico 1. Resultados do teste *t-student* para amostras pareadas na comparação do percentual médio de 1, 2, 3 e 4 ou mais pontos de AgNOR por núcleo entre as camadas basal e suprabasal de cada grupo, Porto Alegre, 2005.



A: Acantose; HCA: Hiperkeratose com Acantose; D: Displasia Epitelial; HC: Hiperkeratose; E: Epitélio Normal; CB: Camada Basal e CSB: Camada Suprabasal. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

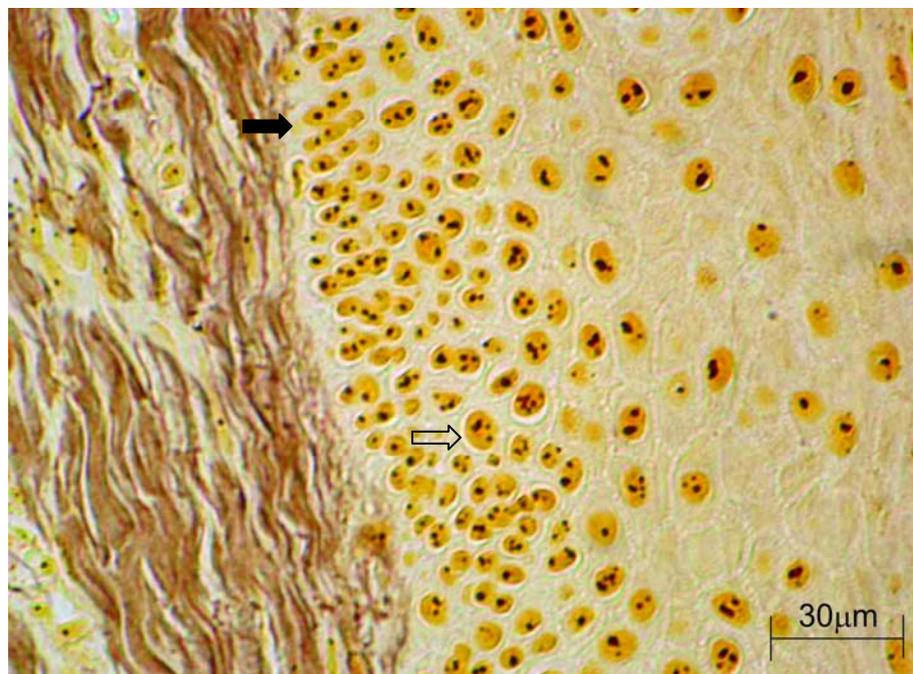


Figura 1: Fotomicrografia do epitélio da mucosa bucal com área de **Acantose** mostrando o aspecto da impregnação pela prata. Célula da camada basal (seta cheia) e célula da camada suprabasal (seta vazada). Aumento original 400x. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

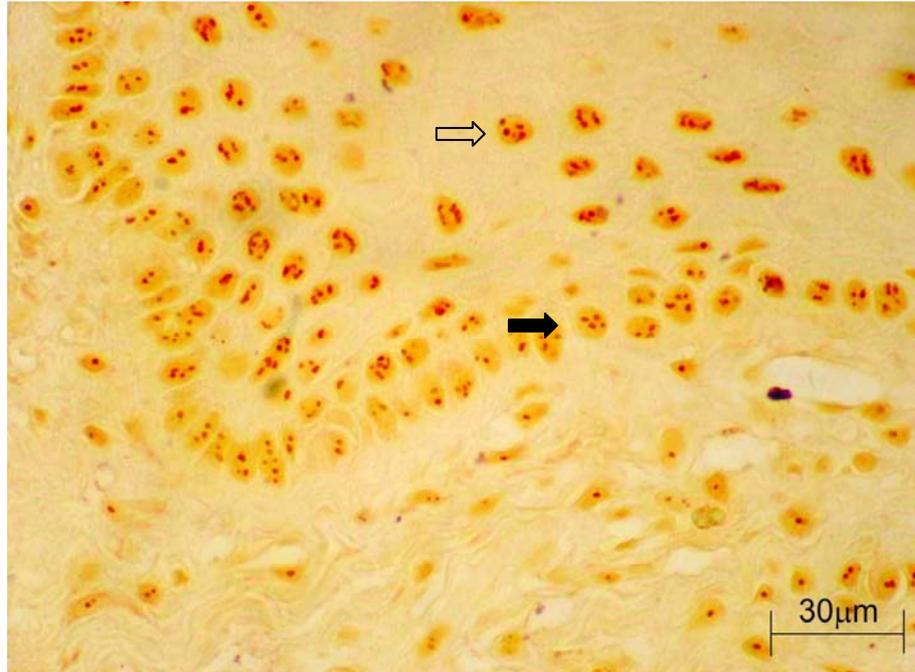


Figura 2: Fotomicrografia do epitélio da mucosa bucal com **Hiperqueratose e Acanthose** mostrando o aspecto da impregnação pela prata. Célula da camada basal (seta cheia) e célula da camada suprabasal (seta vazada). Aumento original 400x. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

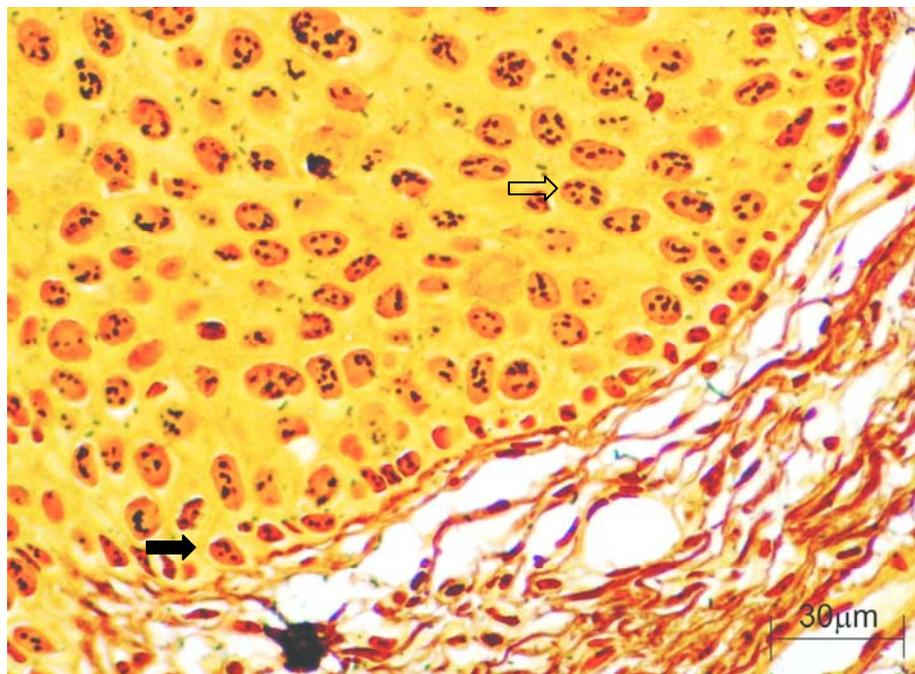


Figura 3: Fotomicrografia do epitélio da mucosa bucal com **Displasia Epitelial** mostrando o aspecto da impregnação pela prata. Célula da camada basal (seta cheia) e célula da camada suprabasal (seta vazada). Aumento original 400x. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

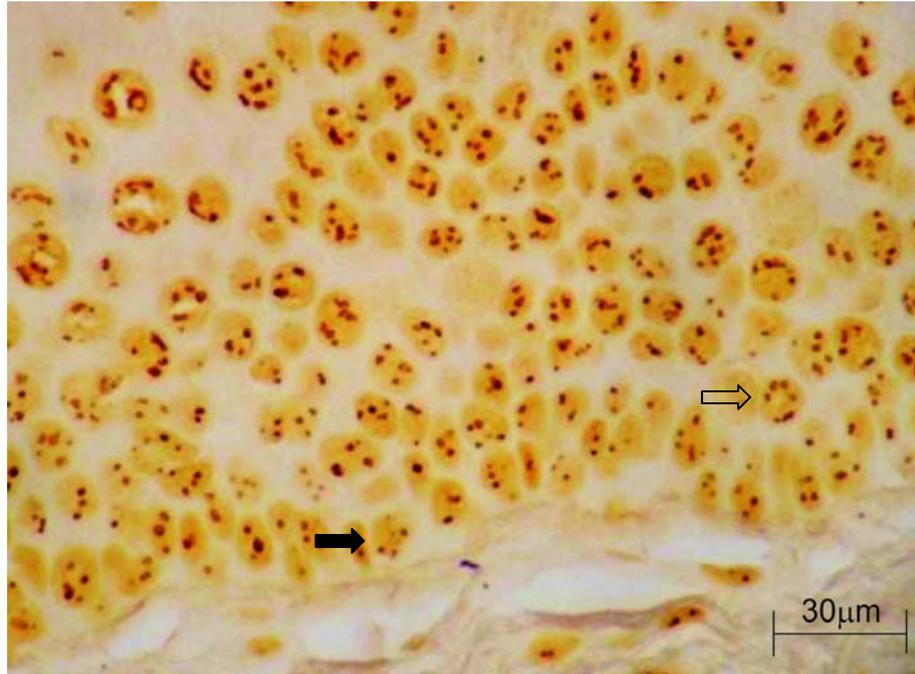


Figura 4: Fotomicrografia do epitélio da mucosa bucal com **Hiperceratose** mostrando o aspecto da impregnação pela prata. Célula da camada basal (seta cheia) e célula da camada suprabasal (seta vazada). Aumento original 400x. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

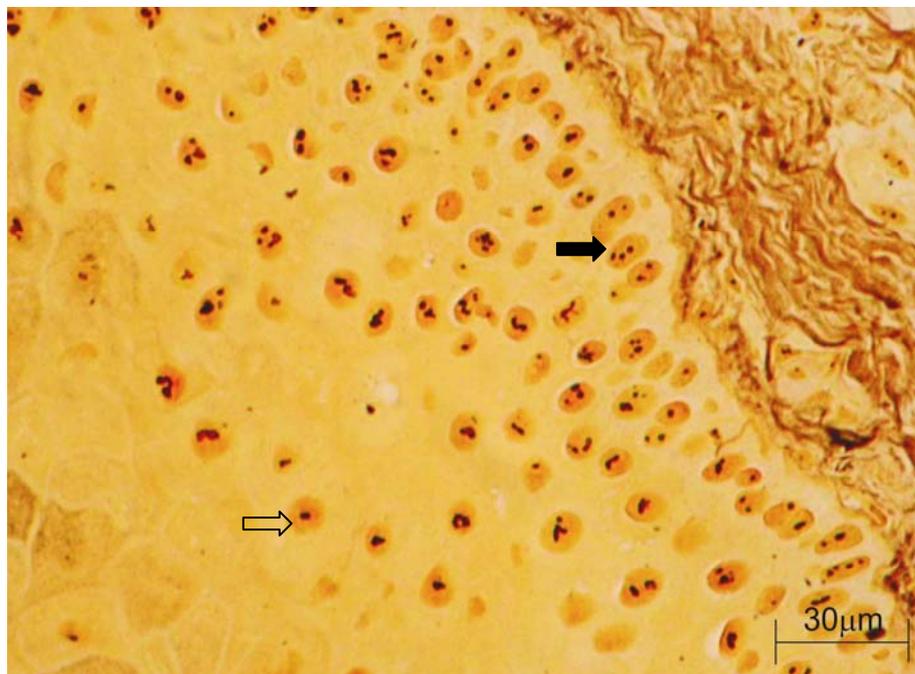


Figura 5: Fotomicrografia do **Epitélio Normal** da mucosa bucal mostrando o aspecto da impregnação pela prata. Célula da camada basal (seta cheia) e célula da camada suprabasal (seta vazada). Aumento original 400x. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS.

DISCUSSÃO

Os estudos que avaliam a técnica de AgNOR em leucoplasias não especificam os distúrbios de maturação epitelial classificados como hiperkeratose, acantose e hiperkeratose com acantose (13,17,21,22,24-27). Portanto o presente estudo comparou-os com o epitélio normal da mucosa bucal, representando o tecido em ritmo de proliferação celular fisiológico, e a displasia epitelial, sendo o distúrbio de maturação epitelial com maior potencial de transformação maligna (1-4,12). Primeiramente será discutido o comportamento dos grupos epitélio normal e displasia epitelial segundo sua velocidade de proliferação celular e após serão comparados com os demais distúrbios.

A análise da quantificação dos pontos de AgNOR no tecido epitelial normal demonstrou que as células da camada basal apresentaram valores de mAgNOR e pAgNOR= 2, 3 e 4 ou mais superiores aos da camada suprabasal, enquanto que as células da camada suprabasal o pAgNOR= 1 foi maior (tabela 1; gráfico 1). Este resultado evidenciou uma maior velocidade de proliferação das células da camada basal, pois quanto maior é o número de pontos de AgNOR por núcleo, menor é o tempo de duração do ciclo celular e, conseqüentemente, maior a velocidade de proliferação celular (15,18,20,30-32). A mensuração da área média dos pontos de AgNOR por núcleo revelou que as células da camada basal apresentaram valores menores. Deste modo, as células da camada basal do epitélio normal da boca apresentam os pontos de AgNOR pequenos, em maior número e mais espalhados pelo núcleo e, na medida em que estas células se deslocam para as camadas superficiais, a velocidade de proliferação diminui, dando condição para que as AgNORs se agrupem em pontos únicos e maiores. Estes resultados concordam com os estudos de Cabrini *et al.* (20) e Chattopadhyay (33) que observaram o mAgNOR maior nas células da camada basal e a área média dos pontos de AgNOR por núcleo maior nas células da camada suprabasal.

Outros autores, avaliando diferentes marcadores de proliferação celular, observaram que no epitélio normal a proliferação celular ocorre nas camadas basal e suprabasal, porém a camada suprabasal apresenta maior número de células em proliferação (34-39). Entretanto estes estudos não avaliaram a velocidade de proliferação celular, que mostrou ser maior na camada basal de acordo com os resultados do presente trabalho. Logo, no tecido epitelial normal da boca as células das camadas basal e suprabasal, são responsáveis pela constante renovação do tecido, apesar da camada suprabasal apresentar maior número de células em proliferação, as células da camada basal se duplicam com maior velocidade.

Na displasia epitelial as células da camada basal apresentaram mAgNOR maior, porém, analisando os valores do pAgNOR, observa-se que as células da camada suprabasal estão com o ritmo de proliferação semelhante à basal, uma vez que apresentam percentual de células com 2 e 3 pontos de AgNOR por núcleos superior (tabela 1; gráfico 1). Deste modo, na displasia epitelial, as duas camadas estão com a velocidade de proliferação celular acelerada, mas como as células basais têm maior atividade mitótica (43), apresentaram a média de pontos de AgNOR por núcleo mais elevada. Segundo alguns autores, a displasia epitelial apresenta aumento da proliferação celular devido à alteração na proliferação das células da camada basal, o mesmo fenômeno observado no carcinoma espinocelular (34-38,46). A partir destes resultados pode-se sugerir que para a comparação das camadas basal e suprabasal na displasia epitelial, o percentual médio foi mais sensível que a média dos pontos de AgNOR por núcleo. A mensuração da área média dos pontos de AgNOR por núcleo revelou que as células da camada suprabasal apresentaram valores superiores, evidenciando que estão em menor velocidade de proliferação, pois os pontos de AgNOR estão em menor número e mais agrupados.

Os resultados do presente estudo demonstram que a displasia apresentou comportamento semelhante ao encontrado no epitélio normal no que diz respeito à velocidade

de proliferação celular entre as células das camadas basal e suprabasal, pois os dois grupos apresentaram valores de mAgNOR superior na camada basal e área média de pontos de AgNOR por núcleo maior na camada suprabasal. Entretanto, quando os dois grupos são comparados, observa-se que as células da displasia epitelial proliferam com maior velocidade, já que apresentam maior mAgNOR e menor área média de pontos de AgNOR por núcleo com diferença significativa das células do epitélio normal (tabela 2). Além disso, a displasia epitelial apresentou maior percentual de células com 4 ou mais pontos de AgNOR por núcleo nas camadas basal e suprabasal e na análise das duas camadas juntas, porém com diferença significativa do epitélio normal apenas na camada basal (tabela 3). Estes dados estão de acordo com os resultados de Warnakulasuriya *et al.* (36) e Oliver *et al.* (46) que observaram ser as células da camada basal as responsáveis pelo aumento da proliferação celular na displasia epitelial. Os resultados encontrados evidenciam que na displasia epitelial os pontos de AgNORs estão em maior número, menor tamanho e mais espalhados pelo núcleo da célula, assumindo uma configuração comum em células com rápida velocidade de proliferação (19,30).

Liu *et al.* (37) e Liu *et al.* (38) encontraram resultados semelhantes avaliando os marcadores imunohistoquímicos MIB-1 e Ciclina D1 no epitélio normal e displasia epitelial. Os autores observaram que, apesar da expressão ser semelhante nas camadas basal e suprabasal dos dois grupos, a displasia epitelial apresentou maior quantidade de células marcadas, portanto apresenta maior atividade de proliferação celular do que o epitélio normal. Os autores encontraram ainda uma marcação positiva nas células da camada superficial da displasia epitelial, sugerindo que esta camada é mais significativa para a avaliação da presença de alteração no tecido, uma vez que no epitélio normal não houve expressão dos marcadores estudados nesta camada. Todavia a análise da camada superficial do tecido epitelial pela técnica de AgNOR é prejudicada pela presença da enzima fosfatase ácida,

envolvida na ação dos lisossomas, que também apresenta afinidade pela prata e resulta na coloração de forma homogênea da camada de ceratina, impossibilitando a visualização das AgNORs (33,40).

Os grupos hiperkeratose, acantose e hiperkeratose com acantose apresentaram comportamento semelhante quanto ao ritmo de proliferação celular (tabela 1; gráfico 1). Nos três grupos a velocidade de proliferação foi maior na camada suprabasal, pois as células desta camada apresentaram valores superiores de mAgNOR e pAgNOR= 4 ou mais. Entretanto, avaliando o pAgNOR nas células da camada basal destes três grupos observa-se que a acantose apresentou maior percentual de células com 1, 2 e 3 pontos de AgNOR por núcleo, enquanto que a hiperkeratose e hiperkeratose com acantose apresentaram maior percentual de células com 1 AgNOR. Este resultado demonstra que na hiperkeratose e hiperkeratose com acantose a alteração no ritmo de proliferação celular ocorre na camada suprabasal, enquanto que na acantose esta alteração está presente também nas células da camada basal.

A partir dos resultados encontrados no presente estudo pode-se sugerir que nos distúrbios de maturação epitelial tanto as células da camada basal quanto as células da camada suprabasal são responsáveis pelo aumento da proliferação celular. Entretanto, nos grupos hiperkeratose, acantose e hiperkeratose com acantose esta alteração ocorre marcadamente nas células da camada suprabasal, já que a maior velocidade de proliferação celular foi observada nas células desta camada, resultado que concorda com os estudos de Kotelnikov *et al.* (35), Maito *et al.* (41) e Carrard *et al.* (42). Porém, na medida em que a alteração no tecido se torna mais agressiva, como na displasia epitelial, a alteração ocorre nas células das duas camadas.

Comparando os cinco grupos em relação ao mAgNOR (tabela 2), observou-se que a média aumentou do epitélio normal, hiperkeratose com acantose, hiperkeratose, acantose para a displasia epitelial, sugerindo que os dois últimos distúrbios têm maior potencial de transformação maligna, já que apresentam diferença significativa do epitélio normal. Este

resultado concorda com autores que relataram o aumento gradual da média dos pontos de AgNOR por núcleo na medida em que o epitélio normal sofre alterações de maturação até sua progressão para a lesão maligna (13,17,20,22-26,36). O aumento do mAgNOR ocorre tanto na quantificação das camadas basal e suprabasal juntas quanto nas camadas separadas, portanto não é necessário a contagem da média de pontos de AgNOR por núcleo separando as camadas do tecido epitelial.

A mesma distribuição dos grupos estudados é observada na avaliação do pAgNOR, onde o epitélio normal apresentou maior percentual de células com 1 AgNOR por núcleo, seguido da hiperqueratose com acantose, hiperqueratose, acantose e displasia epitelial (tabela 3). Isto demonstra que os dois primeiros distúrbios têm menor velocidade de proliferação celular, pois apresentam maior percentual de células com 1 AgNOR que segundo a literatura é característico de células com o ritmo de proliferação celular normal (13). Entretanto, considerando a distribuição das AgNORs nas camadas separadamente, esta classificação dos grupos não se repete em todos os parâmetros, exceto para o pAgNOR= 1 na camada suprabasal. Observação que parece comprovar que esta camada é mais indicada para avaliar a alteração no ritmo de proliferação celular nos distúrbios de maturação epitelial.

Avaliando ainda o pAgNOR, observou-se que os grupos acantose e displasia epitelial apresentaram diferença significativa do tecido epitelial normal no pAgNOR= 2, repetindo o resultado encontrado no mAgNOR, portanto pode-se sugerir que este é o parâmetro mais sensível para avaliar o comportamento de risco nos distúrbios de maturação epitelial. Este resultado concorda com Xie *et al.* (13), onde o pAgNOR > 1 mostrou-se mais indicado para diferenciar os grupos de epitélio normal, displasia epitelial e carcinoma espinocelular. No pAgNOR= 2, observou-se que a acantose apresentou percentual maior que a displasia epitelial, demonstrando o comportamento semelhante entre as duas alterações. Entretanto, a displasia epitelial apresentou maior percentual de células com 4 ou mais pontos de AgNOR

por núcleo, provando o seu maior potencial de transformação maligna, pois segundo Xie *et al.* (13) a presença de células com 4 ou mais AgNORs por núcleo pode ser considerado um sinal de malignidade. A partir da avaliação do percentual médio dos pontos de AgNOR por núcleo não foi possível encontrar diferença significativa entre os distúrbios de maturação epitelial, resultado que concorda com estudo de Ray *et al.* (27) que, apesar de não avaliar os distúrbios separadamente, observaram que o pAgNOR não apresentou diferença significativa entre as amostras de leucoplasias com e sem epitélio displásico.

A média da área dos pontos de AgNOR por núcleo apresentou diferença significativa entre as camadas basal e suprabasal de todos os grupos estudados, bem como a diferença entre os distúrbios de maturação epitelial e o epitélio normal. De acordo com os resultados encontrados neste estudo, a média da área foi maior no epitélio normal, que apresentou média de pontos de AgNOR por núcleo menor, confirmando que pontos únicos e bem definidos apresentam média de área maior. Portanto pode-se sugerir que o aumento da área indica um ritmo de proliferação celular próximo do normal e não acelerado. Porém, este resultado discorda dos encontrados na literatura, uma vez que relacionam a alta área média com lesões de maior velocidade de proliferação (14,44,45). Esta diferença pode dever-se ao uso de programas e equipamentos diferentes que influenciam na acurácia da mensuração da área dos pontos ou ainda dever-se ao tipo de lesão avaliado, uma vez que os autores mencionados trabalharam com tumores malignos, e o presente estudo analisou uma lesão cancerizável.

Os resultados encontrados na mensuração da área média dos pontos de AgNOR por núcleo não foram conclusivos, uma vez que não apresentou a mesma relação entre os grupos encontrada com a média dos pontos de AgNOR por núcleo e com o percentual médio dos pontos de AgNOR por núcleo. Resultado semelhante também foi encontrado por outros autores que concluíram ser o mAgNOR o método mais sensível para a quantificação das AgNORs (20,42).

Apesar dos três métodos de quantificação utilizados demonstrarem uma maior velocidade de proliferação celular dos distúrbios de maturação epitelial em relação ao epitélio normal, eles não foram capazes de encontrar diferenças significativas entre os distúrbios. Entretanto, mesmo não sendo o objetivo do presente trabalho, quando observada a morfologia dos pontos de AgNOR nas diferentes alterações de maturação que podem ocorrer no tecido epitelial, é possível reconhecer as lesões com maior velocidade de proliferação celular e conseqüentemente maior potencial de transformação maligna (30). Na displasia epitelial predominou a distribuição das AgNORs pelo núcleo de forma irregular e com pequena dimensão, enquanto que no grupo de epitélio normal as AgNORs apresentaram-se como poucos pontos bem individualizados e definidos dentro do núcleo. Este tipo de configuração dos pontos de AgNOR nas células da displasia epitelial também foi observada por outros autores (13,21-23,26). Nos grupos acantose, hiperqueratose e hiperqueratose com acantose as AgNORs apresentaram-se com aspecto semelhante ao epitélio normal, porém em poucos casos observou-se uma distribuição mais irregular (fig. 1, 2, 3, 4 e 5). Estas diferentes configurações das AgNORs foram descritas por Crocker *et al.* (30) e observadas em diversos estudos (13,15,18,21-23,26,31,32). Esta análise da morfologia dos pontos parece ser subjetiva e só é possível para um profissional experiente na observação de diferentes lesões com marcação de AgNORs.

A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que a hiperqueratose, hiperqueratose com acantose e acantose apresentam ritmo de proliferação celular semelhante e que, dentre eles, a acantose e displasia epitelial têm comportamento de maior risco. Portanto, sugere-se que diante de uma leucoplasia com o diagnóstico histopatológico apresentando qualquer um dos distúrbios de maturação epitelial, a conduta clínica deve ser semelhante.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e realizado no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS

1. KRAMER RH, PINDBORG JJ, LUCAS RB and SOBIN LH: Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surg** 46: 518-539, 1978.
2. PINDBORG JJ, REICHART PA, SMITH CJ and VAN DER WAAL I: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. **World Health Organization: Internation Histological Classification Of Tumours.** (ed.) Springer-Verlang, Berlin, pp21-31, 1997.
3. NEVILLE BW, DAMM DD, ALLEN CM and BOUQUOT JE: Patologia Epitelial. In: **Patologia Oral e Maxilofacial.** (ed.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp252-313, 2004.
4. SILVERMAN JUNIOR S: Leukoplakia and Erythroplasia. In: **Oral Cancer.** (ed.) B C Decker Inc, Canadá, pp25-40, 1998.
5. JOHNSON NW, VAN DER WAAL I and AXÉLL T: Oral leukoplakia. **Oral Diseases** 3: 43-48, 1997.
6. VAN DER WAAL I, SCHEPMAN KP and VAN DER MEIJ EH: A modified classification and staging system for oral leukoplakia. **Oral Oncol** 36: 264-266, 2000.
7. ALLEGRA F and GENNARI, PU: **Doenças da Mucosa Bucal.** (ed.) Santos, São Paulo, p228, 2000.
8. ARAÚJO NS and ARAÚJO VC: **Patologia Bucal.** (ed.) Artes Médicas, São Paulo, p239, 1984.
9. JUNQUEIRA LC and CARNEIRO J: **Histologia Básica.** (ed.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p488, 2004.
10. TIECKE RW: **Oral Pathology.** (ed.) McGraw-Hill Book Company, New York, 873 p, 1965.
11. MATTOS MCFI: Transtornos do crescimento e da diferenciação celulares. In: MONTENEGRO MR and FRANCO M: **Patologia – Processos Gerais.** (ed.) Atheneu, São Paulo, pp183-192, 1992.
12. LUMERMAN H, FREEDMAN P and KERPEL S: Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 79: 321-329, 1995.
13. XIE X, CLAUSEN OPF, SUDBÖ J and BOYSEN M: Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia and squamous carcinoma of the oral cavity. **Cancer** 79: 2200-2208, 1997.
14. CECCARELLI C, TRERÈ D, SANTINI D, TAFFURELLI M, CHIECO P and DERENZINI M: AgNOR in breast tumours. **Micron**, Oxford 31: 143-149, 2000.
15. DERENZINI M: The AgNORs. **Micron** 31: 117-120, 2000.
16. PICH A, CHIUSA L and MARGARIA E: Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. **Micron** 31: 133-141, 2000.

17. SPOLIDORIO LC, NEVES KA, SOARES CP, SPOLIDORIO DMP, BASSO MFM, MALAVAZZI I and ALMEIDA OP: Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in oral tumor progression. **Micron** 33: 605-608, 2002.
18. DERENZINI M, CECCARELLI C, SANTINI D, TAFFURELLI M and TRETÈ D: The prognostic value of the AgNOR parameter in human breast cancer depends on the pRB and p53 status. **J Clin Pathol** 57: 755-761, 2004.
19. ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K and WATSON JD: O núcleo da célula. In: *Biologia Molecular da Célula*. (ed.). Artes Médicas, Porto Alegre, pp336-395, 1997.
20. CABRINI RL, SCHWINT AE, MENDEZ A, FEMOPASE F, LANFRANCHI H and ITOIZ ME: Morfometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 21: 275-279, 1992.
21. WARNAKULASURIYA KAAS and JOHNSON NW: Nucleolar organiser region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 22: 77-81, 1993.
22. CHATTOPADHYAY A, CHAWDA JG and DOSHI JJ: Silver-binding nucleolar organizing regions: a study of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg** 23: 374-377, 1994.
23. FONSECA LMS and CARMO MAV: AgNORs in hyperplasia, papilloma and oral squamous cell carcinoma. **Braz Dent J** 11: 105-110, 2000.
24. SULKOWSKA M, FAMULSKI W, KASACKA I, SULKOWSKI S, MILLER-FAMULSKA D and KODA M: Proliferating activity in oral dysplastic lesions and squamous cell carcinomas. **Folia Histochem Cytobiol** 39: 191-192, 2001.
25. CHATTOPADHYAY A, RAY JG and CAPLAN DJ: AgNOR count as objective marker for dysplastic features in oral leukoplakia. **J Oral Pathol Med** 31: 512-517, 2002.
26. PANDIT S and AITHAL DA: Qualitative and quantitative estimation of AgNORs in dysplastic and non-dysplastic leukoplakias. **Indian J Dent Res** 13: 27-30, 2002.
27. RAY JG, CHATTOPADHYAY A and CAPLAN DJ: Usefulness of AgNOR counts in diagnosing epithelial dysplasia. **J Oral Pathol Med** 32: 71 – 76, 2003.
28. PLOTON D, MENAGER M, JEANNESSON P, HIMBER G, PIGEON F and ADNET JJ: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region of the optical level. **Histochem J** 18: 5-14, 1986.
29. SQUIER CA and FINKELSTEIN MW: Mucosa Bucal. In: **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. TEN CATE AR (ed.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 323-339, 2001.
30. CROCKER J, BOLDY DAR and EGAN M: How should we count AgNORs? proposals for a standardized approach. **J Pathol** 158: 185-188, 1989.
31. DERENZINI M and PLOTON D: Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. **Int Rev Exp Pathol** 32: 149-192, 1991.

32. SCHWINT AE, SAVINO TM, LANFRANCHI HE, MARSCHOFF E, CABRINI RL and ITOIZ ME. Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma of human oral mucosa. **Cancer** 73: 2674-2679, 1994.
33. CHATTOPADHYAY A: AgNORs in tumoral pathology. Review of literature and observations on the technic and reaction in normal oral epithelium. **Indian J Dent Res** 4: 47-53, 1993.
34. MAIDHOF R and HORNSTEIN OP: Autoradiographic study on some proliferative properties of human buccal mucosa. **Arch Dermatol Res** 265: 165-172, 1979.
35. KOTELNIKOV VM, COON JS, TAYLOR S *et al*: In vivo labeling with halogenated pyrimidines of squamous cell carcinomas and adjacent non-involved mucosa of head and neck region. **Cell. Prolif** 28: 497-509, 1995.
36. WARNAKULASURIYA KAAS and MACDONALD DG: Epithelial cell kinetics in oral leukoplakia. **J Oral Pathol Med** 24: 165-169, 1995.
37. LIU S, SAUTER ER, CLAPPER ML *et al*: Markers of cell proliferation in normal epithelia and dysplastic leukoplakias of the oral cavity. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 7: 597-603, 1998.
38. LIU SC and KLEIN-SZANTO AJP: Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncol** 36: 145-151, 2000.
39. CELENLIGIL-NAZLIEL H, AYHAN A, UZUN H and RUACAN S: The effect of age on proliferating cell nuclear antigen expression in oral gingival epithelium of healthy and inflamed human gingival. **J Periodontol** 71: 1567-1574, 2000.
40. MASCRÈS C and JOLY JG: Etude histochimique et ultrastructurale de la muqueuse du rat, après administration chronique d'alcool. **J Biol Buccale** 9: 279-295, 1981.
41. MAITO FLDM, RADOS PV, SANT'ANA FILHO M, BARBACHAN JJ and QUADROS O: Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or exposure to, alcohol. **Alcohol** 31: 25-30, 2003.
42. CARRARD VC, SANT'ANA FILHO M, RADOS PV, CHAVES ACM and LAUXEN IS: Quantification of silver staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of alcohol. **Alcohol** 34: 233-238, 2004.
43. BREW MC and FIGUEIREDO JAP: Tecido epitelial. In: **Histologia geral para a odontologia**. (ed.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp33-51, 2003.
44. ÖFNER D, RIEDMANN B, MAIER H *et al*. Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs) in radically resected colorectal adenocarcinoma – correlation with tumor stage and long-term survival. **J Pathol** 175: 441-448, 1995.
45. LORENZATO M, ABOUD P, LECHKI C, BROWARNYJ F, O'DONOHUE MF, PLOTON D and ADNET JJ: Proliferation assessment in breast cancer: a double-staining technique for AgNOR quantification in MIB-1 positive cells especially adapted for image cytometry. **Micron** 31: 151-159, 2000.
46. OLIVER RJ, MACDONALD DG and FELIX DH: Aspects of cell proliferation in oral epithelial dysplastic lesions. **J Oral Pathol Med** 29: 49-55, 2000.
47. DERENZINI M, NARDI F, FARABEGOLI F, OTTINETTI A, RONCAROLI F and BUSSOLATI G: Distribution of silver-stained interphase nucleolar organizer regions

as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. **Acta Citol** 33: 491-498, 1989.

48. RÜSCHOFF J et al.: Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. **J Pathol** 161: 113-118, 1990.
49. MOURAD WA, ERKMAN-BALIS B, LIVINGSTON S, SHOUKRI M, COX CE, NICOSIA SV and ROWLANDS DT: Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. **Cancer**: 69: 1739-1744, 1992.

ANEXO