

Trabalho de Conclusão de Curso

**Utilização da técnica do AgNOR em
Patologia: Uma revisão de literatura**

Ana Carolina da Silva Rodrigues Vieira



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

Ana Carolina da Silva Rodrigues Vieira

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DO AGNOR EM PATOLOGIA:
UMA REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito para a conclusão do Curso de
Graduação em Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo
Siqueira

Florianópolis

2013

Ana Carolina da Silva Rodrigues Vieira

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DO AGNOR EM PATOLOGIA:
UMA REVISÃO DE LITERATURA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 16 de maio de 2013.

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Filipe Modolo Siqueira,
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Michelle Tillmann Biz,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Sarah Freygang Mendes Pilati,
Universidade Federal de Santa Catarina

Meus amores: Família e Amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradecer ao meu bom Deus, por estar ao meu lado em TODOS os momentos,

À Dona Iná, por simplesmente ser o que é: a melhor Mãe do mundo,

Ao Manoel, pelos quase 15 anos de dedicação e por ter assumido de forma extraordinária o papel de Meu Pai (e que pai!),

Ao Luiz Fernando, por ser o afilhado mais amado e que me faz voltar a ser criança sempre que estamos juntos,

Às minhas guerreiras da vida e tias queridas Cláudia e Maria Catarina, por serem minhas “segundas-mães”,

À minha família linda, que eu amo muito e que eu não trocaria por nada nesse mundo,

A todos os meus amigos / irmãos que são parceiros para tudo, e sempre,

Às meninas, por terem tornado a minha jornada acadêmica mais leve, e principalmente à Morgane, pelos três anos de parceria (entendo que ser minha dupla não deve ter sido fácil),

Ao Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira, pela orientação na realização desse trabalho,

À Prof^a. Dr^a. Graziela de Luca Canto, pela oportunidade de participar por um ano e meio do PET Odonto-Fono, que com certeza foi o diferencial na minha carreira acadêmica,

Às minhas estrelinhas dona Terezinha e dona Mariazinha, de quem tenho uma saudade gigante, mas sei que SEMPRE estiveram ao meu lado durante os cinco anos de graduação.

“[...] Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que eu era antes. [...]”

Martin Luther King

RESUMO

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são segmentos de DNA que estão localizados nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos humanos 13,14,15,21 e 22. As NORs transcrevem o RNA ribossômico, o qual será traduzido para proteína, formando os ribossomos, que participarão da síntese proteica. Esses segmentos de DNA são denominados AgNORs pois são marcados seletivamente pelo nitrato de prata, sendo identificados, em uma lâmina histológica, como pontos castanhos ou negros dentro das células. As NORs estão diretamente relacionadas com a atividade celular proliferativa, ou seja, quanto maior é a atividade proliferativa de uma célula, maior a quantidade de NORs encontrada. A técnica do AgNOR consiste, portanto, da ligação do nitrato de prata as NORs, e ela tem sido amplamente empregada como marcador de atividade proliferativa em processos patológicos, já que nestes a proliferação celular está aumentada em relação aos padrões considerados normais. Visto isso, o presente trabalho consiste em revisar a literatura científica para verificar a aplicabilidade da técnica de marcação pelo AgNOR nas diferentes patologias que tem manifestação buco-maxilo-facial.

Palavras-chave: Proliferação celular. Cistos odontogênicos. Tumores odontogênicos. Ameloblastoma. Carcinoma epidermoide. Leucoplasia.

ABSTRACT

Nucleolar organizer regions (NORs) are segments of DNA that are located on the short arms of the human acrocentric chromosomes 13,14,15,21 and 22. NORs transcribe messenger RNA, which is translated into protein, forming the ribosomes, which participate in protein synthesis. These DNA segments are called AgNOR are selectively marked by silver nitrate, being identified in a histological slide, as black or brown spots in the cells. NORs are directly related to cell proliferative activity, ie, the higher proliferative activity of a cell, the greater the amount of NORs found. The AgNOR technique is therefore binding of silver nitrate NORs, and it has been widely used as a marker of the proliferative activity in pathological processes, since in these processes cell proliferation is increased compared to normal standards. Based on this, the present work consists in a review of the literature to evaluate the applicability of the AgNOR technique in different pathologies that have maxillo-facial manifestation.

Keywords: Cell proliferation. Odontogenic cysts. Odontogenic tumors. Ameloblastoma. Squamous carcinoma. Leucoplakia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NCBI – National Center for Biotechnology Information

BU – Biblioteca Universitária

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

NOR – Regiões Organizadoras Nucleolares

AgNOR – Regiões Organizadoras Nucleolares coradas pelo Nitrato de Prata

TOC – Tumor Odontogênico Ceratocístico

TNM – Tumor, Nódulos, Metástase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 OBJETIVOS.....	21
1.1.1 Objetivo Geral.....	21
1.1.2 Objetivos Específicos.....	21
2 METODOLOGIA.....	23
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1 LESÕES ODONTOGÊNICAS.....	25
3.2 LESÕES EPITELIAIS.....	29
3.3 OUTRAS LESÕES.....	34
4 DISCUSSÃO.....	35
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

As Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são segmentos de DNA que transcrevem o RNA ribossômico que, por sua vez, posteriormente é traduzido para proteína, formando os ribossomos. Os ribossomos, quando ligados ao RNA mensageiro, formam os polirribossomos, que são responsáveis pela síntese de todas as proteínas nos seres humanos, inclusive as proteínas que formarão novas células (1). As NORs, por esse motivo, estão relacionadas diretamente com a atividade proliferativa celular (2).

Em organismos pluricelulares, a taxa de proliferação celular é regulada por um sistema altamente integrado e complexo que permite a replicação dentro dos limites considerados normais. A proliferação celular é uma atividade essencial, pois permite ao organismo restaurar as células perdidas em decorrência do processo de envelhecimento, no entanto, ela deve ocorrer de forma controlada. Caso tal controle seja perdido, a proliferação ocorre de maneira desequilibrada. O desequilíbrio da proliferação celular é uma das principais características de um processo patológico (3).

A técnica do AgNOR consiste da ligação da prata com as regiões associadas às NORs por meio de uma reação histoquímica, e esta tem sido empregada para marcar a atividade celular proliferativa de processos patológicos. Tem sido demonstrado, através dos estudos, que é possível se fazer uma análise das AgNORs tanto de forma quantitativa como de forma qualitativa, já que ambas demonstram o comportamento celular dos casos analisados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Revisar a literatura científica para determinar a utilidade do AgNOR nas doenças localizadas no complexo buco-maxilo-facial;

1.1.2 Objetivos Específicos

Estabelecer uma relação entre a contagem de AgNORs dos estudos com a atividade proliferativa;

Estabelecer uma relação entre a contagem de AgNORs dos estudos com a gravidade das lesões estudadas;

Demonstrar a relação entre as características morfológicas das AgNORs com a gravidade das lesões.

2 METODOLOGIA

Para a confecção do presente trabalho, foi realizada uma revisão da literatura científica, utilizando como a principal base de dados o Portal Pubmed – NCBI, de artigos correspondentes ao período de 1986 a abril de 2013. Buscaram-se artigos referentes ao tema do trabalho usando os seguintes termos de busca: AgNOR, ceratocistic odontogenic tumor, odontogenic tumors, odontogenic cysts, ameloblastoma, squamous carcinoma, leucoplakia. Os artigos tinham que ter como principal enfoque o uso da técnica do AgNOR nos seus estudos.

Foram também utilizados livros do acervo da Biblioteca Universitária da UFSC (BU/UFSC), como referências complementares ao tema proposto.

3 REVISÃO DE LITERATURA

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são segmentos de DNA ligados aos braços curtos dos pares de cromossomos acrocêntricos humanos 13, 14, 15, 21 e 22, que apresentam centrômero subterminal deslocado para uma das extremidades. Essas regiões são seletivamente marcadas pela prata e, por esse motivo, são denominadas AgNORs (1,2). A técnica do AgNOR baseia-se na ligação do nitrato de prata às NORs, fazendo com que estas sejam identificadas como pontos acastanhados ou negros no interior das células presentes em cortes histológicos (4).

Na literatura, tem-se relatado que a quantidade de NORs encontrada nas células é diretamente proporcional à proliferação celular, ou seja, quanto maior a atividade proliferativa da célula, maior é a quantidade de NORs observada (2). Isso reflete, por exemplo, no grau de diferenciação celular nos casos de carcinoma, que será menor à medida que a proliferação celular for maior (5-7).

A aplicação prática dessa técnica histoquímica em neoplasias verdadeiras começou a ser usada em 1986 por Ploton *et al.* na detecção de proteínas associadas às NORs em tecidos rotineiramente processados (8). Desde então, a técnica tem sofrido adaptações para a utilização, e a maioria das pesquisas realizadas indica uma relação entre o aumento na quantidade de NORs e mau prognóstico, pois quanto mais grave era a lesão estudada, maior era o número de NORs observado (9-11). Segundo Pich (2000), o estudo do AgNOR pode ser empregado como um indicador de prognóstico (12).

3.1 LESÕES ODONTOGÊNICAS:

Coleman *et al.* (1996) objetivaram utilizar a técnica do AgNOR para avaliar se tal técnica poderia ser utilizada para diferenciar histologicamente cistos odontogênicos e ameloblastomas unicísticos. Para tanto, foram utilizados casos de TOC, cisto residual, cisto dentífero e ameloblastoma unicístico, fazendo-se uma análise somente das células basais. O resultado desse estudo foi que a contagem de AgNOR nas células do cisto dentífero foi significativa e estatisticamente maior do que a contagem de AgNOR das células tanto do TOC quanto do ameloblastoma unicístico e do cisto residual. Esse resultado foi, segundo os autores, surpreendente, já que era esperado que a quantidade de

AgNORs nos casos de ameloblastoma unicístico e TOC fossem maiores do que no cisto dentífero, já que ambos epitélios possuem atividade proliferativa muito maior em comparação com os cistos odontogênicos, apresentando um comportamento biológico agressivo muito maior. Concluiu-se, a partir dos resultados, que realmente há diferença quantitativa de AgNOR nas diferentes patologias estudadas. Porém, apesar de a contagem do AgNOR ter sido significativamente diferente tanto entre os cistos odontogênicos quanto no TOC e entre estes e o ameloblastoma unicístico, a técnica não pode ser utilizada para fazer a diferenciação histológica entre tais doenças, mesmo porque a contagem de AgNOR pode sofrer influências importantes, como a região na qual as células são analisadas (13).

No estudo realizado por Freitas *et al.* (1998), os autores utilizaram a coloração das AgNORs para analisar o epitélio de revestimento do cisto dentífero e do TOC, relacionando tais dados com a atividade proliferativa dos mesmos e, a partir disso, entender o comportamento biológico de tais doenças. Foi observado que a relação entre o número de AgNORs e o número de núcleos encontrados no cisto dentífero foi estatisticamente menor do que o encontrado no TOC. Tal diferença levou os autores a sugerirem que no epitélio do TOC a atividade celular proliferativa era maior, o que justificaria as diferenças de comportamento clínico das duas lesões em relação à velocidade de crescimento e índice de recidiva. Ou seja, os casos de TOC têm uma agressividade clínica maior do que os casos de cisto dentífero. Os autores ainda afirmaram que a contagem do AgNOR não deve ser usada como um meio de diagnóstico, e sim que o maior objetivo da técnica seria avaliar a atividade proliferativa do epitélio em estudo (4).

Em um estudo realizado com casos de TOC por Paula *et al.* (2000), os autores estudaram a relação entre a proliferação celular das células epiteliais e a presença de processo inflamatório na cápsula do tumor através da técnica do AgNOR. Para o estudo os casos de TOC foram divididos em dois grupos: um no qual o processo inflamatório estava presente na cápsula do tumor e o outro sem processo inflamatório. Os resultados mostraram que no grupo que o processo inflamatório estava presente havia uma maior quantidade de AgNORs em comparação ao grupo que não possuía inflamação. Esses dados indicaram que o processo inflamatório induz um aumento no número de células epiteliais, o que provoca uma alteração na estrutura típica do revestimento do tumor (14).

Lançando mão da técnica do AgNOR Eslami *et al.* (2003) tinham por objetivo distinguir um conjunto de lesões odontogênicas.

Para realizar a pesquisa, foram utilizados casos de cistos dentígeros, TOCs, ameloblastomas unicístico e multicístico. Os resultados obtidos foram que o número de AgNORs foi maior nos casos de ameloblastoma unicístico e multicístico em relação ao cisto dentígero e ao TOC, indicando, dessa forma, uma maior atividade proliferativa nos ameloblastomas. Os resultados encontrados neste estudo sugerem que, através da técnica do AgNOR, é possível distinguir ameloblastomas unicísticos ou multicísticos dos cistos dentígeros ou TOCs. Porém os estudos ainda não seguem um protocolo padrão no que se diz respeito ao tempo de coloração, temperatura empregada na técnica e contagem. Portanto, os autores recomendam que as pesquisas sejam padronizadas em tais pontos, para que os estudos tenham real significância e valor (15).

Já um estudo realizado por Gadbail *et al.* (2009), os autores utilizaram a técnica do AgNOR para avaliar a atividade proliferativa das células da camada epitelial de cisto radicular, cisto dentígero e TOC. Houve uma diferença estatisticamente significante na quantidade de AgNORs encontrada entre todos os cistos e na mucosa normal. A contagem de AgNOR total foi maior nos casos de TOC, depois no cisto dentígero, seguido por cisto radicular e, em menor quantidade, na mucosa normal. Quando analisado somente o TOC, a quantidade de AgNORs encontrada foi maior na camada suprabasal em relação à camada basal, enquanto que nos cistos dentígero e radicular a maior quantidade foi observada na camada basal em relação à camada suprabasal. Quando analisada a camada suprabasal na mucosa normal e nos cistos, foi achada uma maior quantidade de AgNORs na mucosa normal, seguido por cisto radicular e dentígero. Para os autores, o fato de o número de AgNORs encontrado na camada suprabasal do TOC ter sido evidentemente maior em relação às outras doenças analisadas justifica o seu comportamento local mais agressivo, o que influencia no tratamento cirúrgico do mesmo (16).

Em outro estudo realizado por Santos *et al.* (2009), os autores utilizaram a técnica do AgNOR para investigar uma possível relação entre as características clínicas e a proliferação celular das áreas luminais e murais dos ameloblastomas unicísticos e ameloblastomas multicísticos, comparando, posteriormente, os resultados obtidos com a atividade proliferativa dos cistos dentígeros, através da quantificação das NORs. A quantidade de NORs observadas nas áreas luminais foi menor do que nas áreas murais dos ameloblastomas unicístico e multicístico, no entanto não houve diferença estatisticamente significante quando comparada a quantidade de NORs entre as áreas

luminais do ameloblastoma unicístico e cisto dentífero. Os autores concluíram que quanto mais agressiva a lesão – no caso dos ameloblastomas multicístico e unicístico – maior era a quantidade de AgNORs encontrada (17).

Seifi, Shafigh e Allaie, (2011), avaliaram a taxa de proliferação celular e o padrão de distribuição das NORs em cisto dentífero, TOC, ameloblastoma unicístico e multicístico. Sob uma análise quantitativa, foi encontrada uma maior quantidade de AgNORs no ameloblastoma multicístico, seguido do ameloblastoma unicístico, depois do TOC e, por último, no cisto dentífero. Analisando-se o padrão de distribuição das AgNORs, verificou-se que no cisto dentífero a maior quantidade de AgNORs foi encontrada na camada basal, enquanto que no TOC isso ocorreu na camada suprabasal. Tanto a diferença quantitativa quanto as alterações no padrão de distribuição das AgNORs entre o cisto dentífero e o TOC estão positivamente relacionados com o comportamento mais agressivo do tumor em comparação ao cisto. Em relação à análise qualitativa das NORs, no cisto dentífero elas se apresentaram com formato mais arredondado e foram localizadas no interior do núcleo celular, enquanto que no TOC elas possuíam formas mais irregulares e foram visualizadas tanto dentro quanto fora do núcleo celular. Nos ameloblastomas as AgNORs foram observadas como pequenas regiões irregulares que se distribuíam tanto dentro quanto fora do núcleo celular. Concluiu-se que as diferenças quantitativas, distributivas e qualitativas encontradas nas lesões odontogênicas refletem as diferenças de comportamento clínico que elas apresentam. Ou seja, as diferenças quantitativas e qualitativas encontradas no ameloblastoma, em comparação ao TOC e ao cisto dentífero, correlacionam positivamente com o comportamento clínico mais agressivo daquela patologia (18).

Em artigo publicado por Selvi *et al.* (2012), os autores buscaram investigar, por meio da técnica do AgNOR, os casos de recorrência do TOC, bem como demonstrar a importância do uso da técnica no prognóstico dos mesmos. Para tanto, os casos foram divididos em recorrentes e não recorrentes. Por meio de análise quantitativa, foi verificado que no grupo de casos recorrentes de TOC foi encontrada uma maior quantidade de AgNORs em comparação ao grupo de casos não recorrentes. Para os autores, tal diferença está diretamente relacionada ao comportamento clínico das lesões, ou seja, os casos que apresentavam comportamento clínico mais agressivo expressaram um maior número de AgNORs. Dessa forma, a técnica foi considerada válida para determinar o prognóstico das lesões, o que interfere diretamente no plano de tratamento em cada caso (9).

3.2 LESÕES EPITELIAIS:

Estudando os casos de carcinoma epidermoide de língua, Yue, Iwai e Furuta (1999) tiveram por objetivo relacionar a técnica do AgNOR com os achados clinicopatológicos e o prognóstico da doença. Sob uma análise quantitativa, foi visualizada uma maior quantidade de AgNOR nas células do carcinoma em relação às células normais. Em relação ao grau de estadiamento TNM do carcinoma, foi verificado que quanto mais grave era um desses fatores, maior foi a contagem de AgNOR. Já em relação ao grau de diferenciação celular, quanto mais indiferenciadas eram as células, mais AgNORs as células possuíam. Quando analisados recorrência local e metástase, observou-se que ambos os casos estavam diretamente relacionados com uma maior quantidade de AgNORs; ou seja, quanto mais AgNORs foram observadas, pior foi o prognóstico. No estudo, foi verificado que o uso da técnica do AgNOR é importante para avaliar o prognóstico dos casos de carcinoma epidermoide de língua. Concluiu-se que a contagem de AgNORs estava diretamente relacionada com o estadiamento TNM das lesões, o grau de diferenciação das mesmas, o grau de diferenciação histológica e invasão tumoral. Portanto, essa técnica foi considerada fundamental para o conhecimento e possível interferência no prognóstico dos casos de carcinoma (10).

Em um estudo feito com leucoplasias, Chattopadhyay, Ray e Caplan (2002) tiveram como objetivo realizar a análise quantitativa dos casos estudados através da coloração das AgNORs, bem como demonstrar, através da técnica, a possibilidade de distinguir um epitélio displásico do epitélio não-displásico entre os casos de leucoplasia. Foram utilizados tecidos biopsiados de mucosa normal, leucoplasias (displásicas e não-displásicas) e carcinoma epidermoide. A quantidade de AgNORs encontrada foi crescente, respeitando a seguinte ordem: mucosa normal, leucoplasia não-displásica, leucoplasia displásica e carcinoma. Através da análise quantitativa, ainda foi possível diferenciar um epitélio não-displásico de um displásico, que apresentou maior quantidade de AgNOR. Portanto, a utilização da técnica tem grande valia no que diz respeito ao diagnóstico diferencial entre um epitélio não-displásico e um epitélio displásico (11).

Os mesmos autores citados no parágrafo anterior fizeram um estudo semelhante, (RAY, 2003), porém utilizando casos de leucoplasia sem displasia, leucoplasia com displasia e carcinoma epidermoide. Os autores utilizaram neste estudo os mesmos critérios de contagem de

AgNOR utilizados no estudo anterior para que ele fosse considerado válido. A contagem de AgNOR foi crescente dos casos de leucoplasia sem displasia para a leucoplasia com displasia, e deste para o carcinoma epidermoide. No entanto, a contagem de AgNOR entre os casos de leucoplasia sem displasia e com displasia não foi considerada significativamente diferente. (19)

Em um estudo semelhante ao supracitado, Pillai *et al.* (2005) buscaram relacionar a quantidade de AgNORs com a progressão dos casos de leucoplasia e carcinoma epidermoide da mucosa oral, bem como o valor prognóstico da técnica utilizada. Para o estudo, foram analisadas células da mucosa oral, de leucoplasia e carcinoma epidermoide. Foi observado que a contagem de AgNOR foi menor nas células da mucosa normal, enquanto que nas células do carcinoma, tal contagem foi maior. Nos casos de leucoplasia, a contagem foi menor em relação aos casos de carcinoma, sendo que no subgrupo que apresentava displasia a contagem foi maior em relação ao subgrupo sem displasia. Em relação ao prognóstico dos casos de carcinoma, a relação entre a maior quantidade de AgNORs encontrada e os prognósticos menos favoráveis foi positiva. Ou seja, a utilização da técnica como indicador de prognóstico foi considerada válida (20).

Estudando lesões não neoplásicas e neoplásicas da cavidade oral, Adeyemi *et al.* (2006) tiveram como objetivo principal estudar as lesões não neoplásicas e neoplásicas de glândula salivar por meio da análise quantitativa da técnica do AgNOR, bem como determinar o seu valor prognóstico na categorização das neoplasias malignas das glândulas salivares. Através dos resultados, pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa na quantidade de AgNORs encontrada entre as lesões inflamatórias crônicas (que neste estudo eram casos de sialadenite crônica) e as lesões malignas; assim como entre as lesões benignas e as lesões malignas. Em ambos os casos as lesões malignas apresentaram um número maior de AgNORs. No entanto, quando foram comparadas as quantidades de AgNORs presentes nas lesões benignas e nas lesões inflamatórias, não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre ambas. Apesar desses resultados, não foi possível, para os autores, discriminar as contagens médias de AgNORs nos diferentes graus histológicos das lesões malignas estudadas, levando-os a concluir que a técnica é relativamente não específica para este fim e não permite distinguir os subtipos histológicos de neoplasias benignas e malignas (21).

Em artigo publicado por Alaeddini *et al.* (2008), os autores avaliaram a taxa de proliferação celular nos carcinomas

mucoepidermoides das glândulas salivares maiores e menores por meio da técnica do AgNOR. Os casos de carcinoma mucoepidermoide utilizados na pesquisa foram divididos em três grupos: baixo grau, grau moderado e alto grau, em relação à gravidade dos casos. A diferença na quantidade de AgNORs encontrada entre os grupos foi estatisticamente significativa, sendo que no grupo de alto grau de indiferenciação foi encontrada uma maior quantidade de AgNORs em comparação ao grupo do grau moderado, e no grupo do grau moderado foi encontrada uma maior quantidade de AgNORs em comparação ao baixo grau. Concluiu-se, portanto, que a técnica do AgNOR também pode ser utilizada nas amostras histológicas para avaliar o potencial de crescimento e a gravidade do carcinoma mucoepidermoide, porém o valor prognóstico dessa avaliação deve ser validado em conjunto aos estudos clínicos (5).

Elangovan, Mani e Malathi (2008) estudaram as AgNORs em tecido normal, lesões inflamatórias, lesões potencialmente malignizáveis e malignas da cavidade oral. Através dessa técnica de coloração, buscou-se diferenciar uma lesão potencialmente malignizável e um tecido inflamado de uma lesão maligna. As maiores quantidades de AgNORs foram encontradas nas lesões malignas, seguidas de lesões inflamatórias, lesões potencialmente malignizáveis e tecido normal. Sob uma análise qualitativa, as AgNORs se apresentaram, no tecido normal, com tamanho médio e formato redondo ou oval, e o mesmo formato foi observado nas lesões inflamatórias, porém apresentaram menor tamanho. Nas lesões potencialmente malignizáveis as AgNORs foram observadas em formatos e tamanhos irregulares, assim como nas lesões malignas, nas quais as AgNORs também foram visualizadas espalhadas por todo o núcleo, muito finas, pequenas e numerosas, dando um aspecto granular à lesão. Os autores concluíram que a técnica do AgNOR pode agir como um marcador tanto de atividade proliferativa celular (demonstrada através de análise quantitativa das AgNORs), quanto de diferenciação da lesão (através da análise do aspecto morfológico das AgNORs). Portanto, mais importante do que analisar a quantidade de AgNORs encontrada numa célula, é a forma como essas regiões se apresentam, possibilitando, dessa forma, a diferenciação entre uma lesão potencialmente malignizável ou maligna de uma célula normal (22).

Já Sousa *et al.* (2009) realizaram uma análise quantitativa dos AgNORs entre os casos de líquen plano, displasia epitelial e carcinoma epidermoide. Observou-se menor quantidade de AgNORs no líquen plano quando comparado com as outras doenças estudadas. Entretanto, na comparação da quantidade de AgNORs na displasia epitelial e no

carcinoma epidermoide, não houve diferença estatisticamente significativa. Tais achados levaram os autores a concluir que a menor proliferação celular observada no líquen plano, em relação à displasia epitelial, poderia explicar a seu menor potencial de transformação maligna (23).

Outro estudo realizado por Tekade *et al.* (2010) utilizou a técnica do AgNOR para correlacionar a quantidade de AgNORs encontradas nas células neoplásicas dos carcinomas mucopidermóides com os estágios dos mesmos. Segundo a pesquisa, a contagem de AgNORs foi estatisticamente diferente nos diferentes estágios do carcinoma. Em casos menos severos do carcinoma (estágio tumoral inicial), a contagem foi mínima, enquanto que em casos mais graves (estágios tumorais avançados), a contagem foi alta, correlacionando positivamente a contagem de AgNOR das células tumorais com o grau do carcinoma. Estes resultados fizeram com que os autores concluíssem que a contagem de AgNOR pode ser utilizada, de maneira indireta, para definir o resultado do estágio do carcinoma (24).

Hanemann, Miyazawa e Souza (2011) buscaram fazer uma análise quantitativa, utilizando a técnica do AgNOR, entre os quatro tipos de carcinoma epidermoide (bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado e indiferenciado). O número de AgNORs encontrado nas células do carcinoma do tipo indiferenciado foi maior em relação ao carcinoma pobremente diferenciado, e deste para o carcinoma moderadamente diferenciado, assim como deste para o carcinoma bem diferenciado. Para os autores, a técnica do AgNOR pode ser um marcador viável para a avaliação da velocidade de proliferação celular. Para que tal técnica seja bem executada, os autores ainda citam que é fundamental uma padronização, principalmente no que diz respeito ao método de fixação e o tempo de coloração, para que não se tenha interferência em relação ao número de AgNORs nos núcleos celulares, o que poderia intervir no diagnóstico definitivo dos casos (6).

O estudo realizado por Caldeira *et al.* (2011) teve por objetivo verificar a contagem de AgNOR nos diferentes graus de displasia em leucoplasias orais. Para tanto, foram utilizados tecidos de mucosa normal e casos de leucoplasia oral que não apresentavam displasia e com displasia nos seus diferentes graus: leve, moderado e severo. Os resultados demonstraram que as células da mucosa normal apresentavam a menor quantidade de AgNORs em comparação às células de leucoplasia, que por sua vez possuíam índice menor de AgNOR comparada às células do carcinoma epidermoide. Ainda foi demonstrado

que, apesar das diferenças quantitativas observadas nos diferentes tecidos, essa diferença não foi considerada significativa entre os grupos de leucoplasia, sugerindo que a técnica não é válida como uma ferramenta de diagnóstico, nem para distinguir a mucosa normal de leucoplasia, nem para diferenciar um subgrupo de displasia do outro. Portanto, a técnica não seria válida para definir diagnóstico, tampouco estabelecer o potencial de transformação maligna dos casos de leucoplasia. (25)

No estudo realizado por Khiavi *et al.* (2012), os autores tiveram como objetivo avaliar o valor de diagnóstico da técnica de coloração das AgNORs nas células do carcinoma epidermoide, de lesões potencialmente malignizáveis e da mucosa normal, bem como investigar a relação quantitativa dessas regiões presentes nos três grupos supracitados. Foi observada diferença estatisticamente significativa da quantidade de AgNORs entre os grupos, sendo que foi encontrada uma maior quantidade dessas regiões nas células do carcinoma epidermoide, seguido das células das lesões potencialmente malignizáveis e, por último, das células da mucosa normal. Em relação, ainda, ao aspecto quantitativo das AgNORs, nas lesões potencialmente malignizáveis, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre o epitélio não-displásico e displásico, que exibia maior quantidade de AgNORs. Por outro lado, quando comparado o tamanho das AgNORs entre os grupos, os autores também observaram que as regiões organizadoras nucleolares nas células do carcinoma epidermoide eram maiores em comparação às células das lesões potencialmente malignizáveis, assim como destas para as células da mucosa normal. Diante disso, os autores afirmaram que a técnica de coloração da AgNOR pode ser útil na diferenciação entre lesões potencialmente malignizáveis e carcinoma epidermoide, surgindo como uma técnica complementar à coloração hematoxilina-eosina (7).

Em outro estudo feito por Chowdhry *et al.* (2013), o objetivo do mesmo foi fazer uma análise quantitativa das AgNORs de tamanho pequeno e grande entre os tecidos biopsiados de mucosa normal, lesões potencialmente malignizáveis e infiltrados de carcinoma epidermoide. Foi observada uma maior quantidade média de AgNORs nas células do carcinoma epidermoide, em seguida nas lesões potencialmente malignizáveis e, por último, na mucosa normal. Quanto ao tamanho das AgNORs, nas células do carcinoma epidermoide foram visualizadas mais AgNORs de tamanho menor, enquanto que nas células de mucosa normal foi encontrada uma maior quantidade de AgNOR com tamanho maior. Ou seja, foi verificado que nas células do carcinoma epidermoide

o tamanho das AgNORs diminuiu à medida que a sua quantidade aumentou. Combinando-se os fatores quantidade e tamanho de AgNOR, os autores concluíram que é possível distinguir as células de mucosa normal, lesões potencialmente malignizáveis e carcinoma epidermoide, o que torna a técnica de coloração das AgNORs uma ferramenta importante para o diagnóstico precoce de uma displasia nas lesões de mucosa, bem como a possível transformação maligna das mesmas. A técnica também pode auxiliar tanto no prognóstico dos tratamentos profiláticos de lesões potencialmente malignizáveis quanto no plano de tratamento destes casos. (26)

3.3 OUTRAS LESÕES:

Estudando lesões de células gigantes dos maxilares, Sadri *et al.* (2011) investigaram a atividade proliferativa dessas lesões, através da técnica do AgNOR, e se tal técnica pode ser utilizada para diferenciá-las. Para tanto, foram estudadas quatro lesões: Lesão Central de Células Gigantes, Cisto Ósseo Aneurismático, Querubismo e Tumor Marrom do Hiperparatireoidismo. Os resultados apontaram que não houve diferença estatisticamente significativa de contagem de AgNOR entre as quatro lesões, apesar de elas apresentarem comportamentos clínicos diferentes. Os autores sugeriram que o número reduzido de espécimes no estudo pode ter influenciado o resultado. Por outro lado, levantou-se a hipótese de que essas lesões podem possuir uma única patogênese, porém se apresentam com manifestações clínicas distintas, o que poderia justificar os resultados do estudo. (27)

4 DISCUSSÃO

As alterações das NORs podem ser visualizadas e analisadas sob duas perspectivas diferentes: quantitativa e qualitativamente. Quando a análise foi feita de forma quantitativa, observou-se que quanto mais grave era a doença, maior foi a quantidade de AgNORs encontrada nas células. Sob o aspecto qualitativo, quanto mais agressiva era a doença, mais alteradas morfológicamente as regiões se apresentavam.

Na maioria dos estudos em que a análise foi feita com casos de lesões odontogênicas - TOC, cisto dentífero, cisto radicular, cisto residual e mucosa normal -, verificou-se que nos casos de TOC as NORs se apresentavam em maior quantidade nas células, assim como as regiões exibiam alterações morfológicas mais evidentes (4,16). No estudo que foi analisado somente o TOC, nos subgrupos com inflamação associada e sem inflamação, os autores observaram que o grupo no qual a cápsula do TOC possuía um processo inflamatório associado, a quantidade de NORs era maior, sabendo-se que a inflamação estimula a proliferação celular (14). Já quando foram verificados os casos de recorrência da doença, houve uma correlação positiva entre os casos recorrentes e uma maior quantidade de NORs, enquanto que os casos que não houve recorrência a contagem das NORs observada foi menor (9).

Quando os casos de ameloblastoma foram comparados aos casos de TOC, cisto dentífero, residual e radicular, foi observado que no ameloblastoma as AgNORs encontravam-se com formato mais alterado e estavam em maior quantidade em comparação às outras doenças (9,13,15, 17). Analisando os subtipos de ameloblastoma – multicístico e unicístico -, os estudos apontaram que o subtipo multicístico exibiam as AgNORs com alterações morfológicas mais evidentes em comparação ao subtipo unicístico (9). Esses resultados, quando relacionados às características clinicopatológicas das lesões, confirmam a correlação estabelecida entre as maiores atipias no formato das AgNORs, e uma maior quantidade destas regiões, a uma maior agressividade dos casos que apresentam tais características, ou seja, o ameloblastoma, por ter uma maior replicação celular, apresenta-se clinicamente de uma forma mais agressiva (9,17).

Os estudos realizados com lesões potencialmente malignizáveis, inflamatórias e malignas demonstraram que as lesões malignas apresentavam um maior número de AgNORs, assim como foi observado que as AgNORs possuíam as maiores alterações morfológicas, em

comparação às outras lesões. Em uma sequência decrescente vêm as lesões inflamatórias e as lesões potencialmente malignizáveis. Esses achados corroboram com o que a literatura tem publicado que quanto mais grave é a doença, maior o número de AgNORs observado na células, em decorrência de uma maior atividade proliferativa que os casos mais graves apresentam (22).

As análises realizadas com carcinoma epidermoide em relação às outras doenças demonstraram que o carcinoma possuía as alterações mais significativas, dado que se relaciona de forma positiva com o comportamento clínico mais agressivo da doença (7,11,19,26). Já em relação às lesões potencialmente malignizáveis, como as leucoplasias, foi provado que os casos que apresentavam displasia tinham um maior potencial proliferativo em comparação aos casos que não a apresentavam (11,26). Comparando-se a leucoplasia ao o líquen plano, os resultados comprovaram que nos casos de líquen a quantidade de AgNORs era menor, o que justificaria o fato de o líquen plano possuir um menor potencial de se tornar uma doença maligna em comparação à leucoplasia (19).

Em relação ao estágio tumoral dos carcinomas epidermoide e mucoepidermoide, pode-se verificar que quanto maior o grau de indiferenciação da doença, maior foi a contagem de AgNOR nas células. Ou seja, quanto menor era o grau de diferenciação celular, maior era a atividade proliferativa, o que resulta em uma maior presença de AgNORs nos núcleos celulares (5,6,10,24). Relacionando os resultados das pesquisas com estudos clínicos, verificou-se que os casos mais graves das doenças (mais indiferenciados e com maior invasão tumoral) possuíam as maiores quantidade de AgNORs (10).

A técnica de coloração pelo AgNOR surgiu como uma alternativa para ajudar a definir o prognóstico dos casos analisados. Ela é considerada uma técnica simples e barata, porém sugere-se que o emprego da mesma deve passar por um processo de padronização, desde o seu processamento histológico até as regiões celulares a serem analisadas, uma vez que uma alteração desses fatores pode influenciar nos resultados dos estudos (6,15). Um exemplo disso pode ser verificado em Coleman *et al.* (1996), no qual foi verificado que a contagem de AgNORs nos casos de cisto dentífero foi maior em comparação aos casos de ameloblastoma, já que era esperado que o ameloblastoma, por ter uma atividade proliferativa celular muito maior, exibisse em maior quantidade essas regiões (13).

Cada lesão em particular exibe um comportamento clínico resultante da sua atividade celular proliferativa. Ficou estabelecida,

durante a revisão da literatura, a correlação positiva entre a quantidade de AgNORs encontrada nas células e o grau de gravidade das lesões, já que esta técnica de coloração mostra a atividade proliferativa (5,10,22). Portanto, é importante, quando se lança mão da técnica, estabelecer uma relação entre os resultados encontrados nos estudos com o comportamento clínico que as lesões apresentam, para que os estudos tenham real significância.

Outro exemplo da importância de se estabelecer uma relação entre o estudo das AgNORs com os achados clínicos pode ser visto em Sadri et al. (2011), no qual as lesões de células gigantes não tiveram diferenças significativas na contagem de AgNORs, apesar de as lesões exibirem comportamentos clínicos distintos. A partir desse estudo, pode-se dizer que podem existir outros fatores que influenciam no comportamento clínico das lesões, ou seja, apesar de a replicação celular dessas doenças possivelmente ser semelhante, outros fatores podem influenciar na demonstração clínica de cada doença (27).

Em alguns estudos, os autores alegaram que a técnica não deveria ser utilizada para estabelecer um diagnóstico, seja ele diferencial ou definitivo, já que a mesma não tem por objetivo demonstrar as alterações celulares, mas sim mostrar tanto a atividade proliferativa das células, quanto o potencial de transformação maligna das lesões e o grau de indiferenciação das mesmas. (4,25). Em contrapartida, outros autores defendem que a técnica pode servir de auxiliar às outras técnicas histológicas tanto para definir quanto estabelecer o diagnóstico final (7,11).

Em se tratando de prognóstico, a maioria dos autores alega que essa técnica é válida para o seu estabelecimento, o que pode influenciar diretamente no plano de tratamento para cada caso (9-12,26). Porém, como citado anteriormente, para que o valor prognóstico seja válido, faz-se necessário estabelecer a relação da técnica do AgNOR com os estudos clínicos (5).

Levando essas informações para a prática clínica, todas as alternativas que podem ser utilizadas para auxiliar no estabelecimento do plano de tratamento ideal de um paciente são válidas, a fim de que a expectativa de vida do mesmo aumente. No entanto, também é importante que o tratamento seja executado de maneira que os resultados do mesmo sejam os mais favoráveis possíveis.

Em se tratando da técnica de coloração das AgNORs, apesar de ela não servir como um meio de diagnóstico, ela pode servir como auxiliar no estabelecimento do prognóstico das doenças, portanto essa técnica pode ser considerada uma ferramenta útil no delineamento do

tratamento de um paciente. Porém, sugere-se que a mesma sofra uma padronização de todas as suas etapas, desde fixação e coloração até a contagem e descrição das características morfológicas, para que ela seja considerada uma alternativa válida para o uso rotineiro no laboratório histopatológico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir, através da literatura, que a técnica de coloração das AgNORs pode ser uma ferramenta fundamental para o estabelecimento do prognóstico de uma determinada doença, pois a mesma demonstra a atividade proliferativa das células analisadas e a gravidade das lesões.

Ficou estabelecido que quanto maior a quantidade de AgNORs observada nas células, maior era a sua atividade proliferativa. Relacionando tal contagem com os dados clínicos das doenças, pode-se dizer que quanto mais AgNORs as células possuíam, mais grave era a doença.

Em relação às características morfológicas que as AgNORs exibiam nas células, pode-se relacionar as alterações de forma dessas regiões com a gravidade da doença. Nas células de doenças menos graves, as AgNORs tinham formato mais regular e tamanhos semelhantes, enquanto que as células de lesões de maior gravidade apresentavam AgNORs e tamanhos variados e formatos mais irregulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Junqueira, LCU, Carneiro, J. *Biologia Celular e Molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
2. Rivero ERC, Aguiar MCF. Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenóide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR. *J Bras Patol Med Lab*. 2002; 38(1):39-44.
3. Bogliolo L. *Patologia Geral*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
4. Freitas RA, SERAFIM FMA. Regiões organizadoras nucleolares (AgNORs) em cisto dentífero e ceratocisto odontogênico. *RPG*. 1998; 5(3): 202-5.
5. Alaeddini M, et al. Argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions (AgNORs) in salivary gland mucoepidermoid carcinoma and its relation to histological grade. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(6): 758-62.
6. Hanemann JAC, Miyazawa M, Souza MSGDS. Histologic grading and nucleolar organizer regions in oral squamous cell carcinomas. *J Appl Oral Sci*. 2011; 19(3): 280-5.
7. Khiavi MM, et al. Nucleolar Organizer Regions in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2012 Winter; 6(1): 17-20.
8. Ploton D, et al. Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J*. 1986; 18: 5-14.

9. Selvi F, et al. Keratocystic Odontogenic Tumors: Predictive Factors of Recurrence by Ki-67 and AgNOR Labelling. *Int. J. Med Sci.* 2012 May; 9(4): 262-8.
10. Yue L, Iwai M, Furuta I. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, Toyama, Japan, p. 70-76. 1999.
11. Chattopadhyay A, Ray JG, Caplan DJ. AgNOR count as objective marker for dysplastic features in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2002 Dez; 31:512-7.
12. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. *Micron.* 2000; 31:133-41.
13. Coleman HG, Altini M, Groeneveld HT. Nucleolar organizer regions (AgNORs) in odontogenic cysts and ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25: 436-40.
14. Paula AMB, et al. Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29: 477-82.
15. Eslami B, Yaghmaie M, Firoozi M. *et al.* Nucleolar organizer regions in selected odontogenic lesions. *Oral Surg. Oral Med Oral Pathol.* 2003; 95(2): 187-92.
16. Gadbail AR, et al. Actual Proliferating Index and p53 protein expression as prognostic marker in odontogenic cysts. *Oral Diseases.* 2009; 15: 490-8.

17. Santos AC, Tarquinio SBC, Rivero ERC, et al. Quantitative AgNORs study in ameloblastomas. *Rev Odonto Ciênc.* 2009; 24(1): 10-4.
18. Seifi S, Shafigh, E, Allaie A. Quantitative and qualitative analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions in follicular cyst, keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. *J Can Res Ther.* 2008; 7(3): 280-5.
19. Ray JG, Chattopadhyay A, Caplan DJ. Usefulness of AgNOR counts in diagnosing epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 71-6.
20. Pillai KR, et al. Significance of Silver-stained Nucleolar Organizer Regions in Early Diagnosis and Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Multivariate Analysis. 2005; 19: 807-12.
21. Adeyemi BF, et al. A study of the utility of silver nucleolar organizer regions in categorization and prognosis of salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Oct; 102: 513-20.
22. Elangovan T, Mani NJ, Malathi N. Argyrophilic nucleolar organizer regions in inflammatory, premalignant, and malignant oral lesions: A quantitative and qualitative assessment. *Indian J Dent Res.* 2008; 19(2): 141-6.
23. Sousa FACG, et al. Comparative analysis of cell proliferation ratio in oral lichen planus, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal,* 2009; 14(1):563-7.
24. Tekade SA, Chaudhary MS, Gawande MN, et al. Correlation between mucoepidermoid carcinoma grade and AgNOR count. *J Oral Sci* 2010; 52(2): 275-9.

25. Caldeira PC, et al. Oral leukoplakias with different degrees of dysplasia: comparative study of hMLH1, p53, and AgNOR. *J Oral Pathol Med.* 2011 Apr; 40(4): 305-11.
26. Chowdhry A et al. Quantitative estimation of AgNORs in normal, dysplastic and malignant oral mucosa. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013 Feb: 157-63
27. Sadri D et al. Quantitative analysis of argyrophilic nuclear organizer regions in giant cell lesions of jaws. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39:431-4.