

# ESTUDO QUANTITATIVO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES EM PAPILOMAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Taciana Marco FERRAZ\*

Ana Cristina Coelho DAL RIO\*\*

Terezinha de Oliveira NOGUEIRA\*\*\*

- **RESUMO:** Uma grande dificuldade encontrada pelos histopatologistas é graduar a malignidade de uma neoplasia. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de facilitar essa gradação e alguns incluem a técnica que evidencia as regiões organizadoras nucleolares (NORs). Assim sendo, e diante da possibilidade da técnica de AgNOR favorecer este estudo, propusemo-nos a observar diferenças quantitativas das NORs entre o tumor epitelial benigno, denominado papiloma, e o tumor epitelial maligno, denominado carcinoma de células escamosas. A técnica histoquímica utilizada para visualização das NORs foi a da coloração pelo nitrato de prata. Foram coradas 20 lâminas: 10 para os casos de papiloma e 10 para os de carcinoma de células escamosas. As lâminas foram observadas ao microscópio de luz. Após a contagem, foi realizada a análise estatística dos resultados, não se observando diferença estatisticamente significativa entre os valores de NORs por célula nos dois tipos de lesões.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Carcinoma de células escamosas; papiloma; região organizadora do nucléolo.

## Introdução

Nos últimos anos, muito tem sido estudado em relação à proliferação celular das neoplasias, com o intuito de se chegar a um diagnóstico e de se avaliar o prognóstico do paciente.<sup>5,16</sup> Entretanto, dos vários métodos existentes, alguns são de custo elevado ou de baixa reprodutibilidade.

---

\* Aluna de graduação, Bolsista CNPq – Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245-000 – São José dos Campos – SP.

\*\* Aluna de graduação, Bolsista FAPESP – Processo n.93/1192-5 – Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245-000 – São José dos Campos – SP.

\*\*\* Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 12245-000 – São José dos Campos – SP.

A técnica de coloração pela prata, denominada abreviadamente de AgNOR, é específica para proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (NORs). As NORs estão correlacionadas à proliferação celular, uma vez que são mais numerosas em células em processo de divisão. Considerando-se que as células tumorais estejam em intenso processo de divisão celular, pelo estudo das NORs poder-se-ia prever o comportamento de uma lesão tumoral e assim estabelecer a estratégia terapêutica mais adequada para cada caso.

As NORs são alças de DNA que contêm genes de RNA ribossômico, os quais são transcritos pela RNA polimerase I e que, finalmente, direcionam a formação de ribossomos e a síntese de proteínas.

Babu & Verma<sup>1</sup> afirmaram que a atividade das NORs e o tipo de nucléolo dependem da atividade funcional celular e ambos se modificam quando em função celular alterada. O estudo das NORs em material histopatológico e sua relação com o prognóstico foram difundidos por Crocker & Nar<sup>5</sup> em linfomas não Hodgkin.

As NORs são hoje amplamente estudadas através de métodos argirofílicos simples, fundamentados em ligações de prata das proteínas associadas às NORs – NORAPs.<sup>4</sup>

Ploton et al.<sup>15</sup> modificaram a técnica de coloração pela prata, cuja precipitação foi diminuída quando a técnica foi realizada à temperatura de 20°C, o que promoveu melhor visualização dos pontos.

Muitos trabalhos vêm demonstrando que o número médio de NORs por núcleo encontra-se aumentado em tumores malignos das mais diversas origens em relação às suas variantes benignas. Dentre esses estudos, destacam-se alguns como os realizados entre as lesões cutâneas melanóticas benignas e malignas;<sup>6, 9, 10</sup> tumores benignos e malignos de cólon;<sup>7, 18</sup> proliferações fibrosas da infância e fibrossarcoma infantil;<sup>8</sup> tumores de glândulas salivares benignos e malignos;<sup>11, 12</sup> e outros.

De acordo com Derenzini et al.<sup>7</sup> e Ofner et al.,<sup>14</sup> a análise quantitativa de AgNORs, além de diferenciar neoplasias benignas de suas variantes malignas, também pode ser utilizada para distinguir neoplasias com diferentes graus de malignidade.

Sano et al.<sup>16</sup> estudaram 39 casos de carcinoma de células escamosas da cavidade bucal, por meio da análise quantitativa de AgNORs, e sugeriram, com base nos dados obtidos, que os casos exibindo elevados números de NORs apresentavam um comportamento biológico mais agressivo. Os autores atribuem a esses altos valores numéricos o papel de indicador para os prognósticos de lesões malignas na cavidade bucal. Entretanto, Bryan et al.<sup>2</sup> não encontraram diferença significativa na análise quantitativa do número de NORs entre carcinoma de células escamosas e papilomas de faringe e de laringe.

Cabrini et al.<sup>3</sup> realizaram um estudo morfométrico das NORs em carcinoma de células escamosas e papiloma de cavidade bucal. Analisaram o volume nuclear e o volume das NORs por núcleo, a proporção do volume nuclear ocupado pelas NORs e a morfologia das NORs, observando diferença significativa entre as lesões.

A caracterização histopatológica do carcinoma de células escamosas e do papiloma, associada ao comportamento biológico, são de fundamental importância para orientar o tratamento e o prognóstico dessas lesões. Nem sempre é fácil a distinção microscópica entre um tumor benigno e um maligno, visto que, dependendo do grau de diferenciação, muitos deles podem estar na faixa limite entre a benignidade e a malignidade. A partir do momento em que várias técnicas determinarem com mais facilidade essa separação, tanto patologistas como clínicos e pacientes serão beneficiados. Essa técnica AgNOR poderá mostrar a existência de diferentes graus de atividade proliferativa celular entre um tumor benigno e um maligno. Assim sendo, e diante da possibilidade da técnica AgNOR auxiliar no diagnóstico e no prognóstico de lesões benignas e malignas, propusemo-nos a observar as possíveis diferenças quantitativas entre o papiloma e o carcinoma de células escamosas.

## Material e método

Os casos de papilomas e carcinomas de células escamosas do arquivo de lâminas da Disciplina de Patologia Bucal, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP, foram levantados e 10 casos de cada lesão foram selecionados para o estudo, de acordo com a disponibilidade do arquivo e a quantidade de material.

Após microtomia adequada (5  $\mu\text{m}$ ) dos blocos arquivados, algumas lâminas foram coradas em H&E, para estudo morfológico em microscopia de luz e outros cortes foram utilizados para realização da técnica AgNOR, descrita por Ploton et al.<sup>15</sup> e empregada por Nunes.<sup>13</sup>

Após a realização da técnica, todas as lâminas de papiloma e de carcinoma das células escamosas foram observadas em microscópio de luz, com objetiva de imersão e aumento final de 1.000X. Na ocular, foi utilizado retículo de contagem (Carl Zeiss, Deutschland) subdividido em 400 quadriculados, para se evitar a recontagem das estruturas. Cem células em diferentes áreas do espécime foram observadas e a contagem de NORs foi realizada por dois observadores.

A contagem foi efetuada de forma que a margem de variação inter-observador ficasse limitada a 5%.

Após a contagem das NORs, calculamos a média do número de NORs por célula em cada lâmina, tanto nos casos de carcinoma de células escamosas como nos de papiloma.

A partir da média de cada caso, realizamos uma média geral para os casos de papiloma e uma para os casos de carcinoma de células escamosas.

Para verificar se as duas médias eram estatisticamente significantes, realizamos o teste "t" de Student sobre os valores.<sup>17</sup>

## Resultado

Foram colhidos os dados referentes a idade, sexo e localização de cada caso estudado. Esses dados e mais a média de AgNOR por célula são mostrados nas Tabelas 1 e 2, que se seguem:

Tabela 1 – Casos de papiloma e as médias obtidas pela contagem de NORs

Caso	Sexo	Idade	Localização	Média de AgNOR/célula	Desvio padrão
1	M	3	lábio inferior	1,795	0,7634
2	F	11	lábio inferior	2,945	1,2677
3	M	37	lábio inferior	1,800	0,9744
4	F	69	dorso da língua	1,670	0,7114
5	M	63	pilar da amígdala	2,280	1,1017
6	F	65	palato mole	1,860	0,8552
7	F	23	1/3 posterior da língua	2,280	1,1017
8	F	65	palato mole	2,400	0,9632
9	F	31	papila interdental	2,350	0,9495
10	F	46	mucosa da bochecha	2,100	0,3609

Tabela 2 – Casos de carcinoma de células escamosas e as médias obtidas pela contagem de NORs

Caso	Sexo	Idade	Localização	Média de AgNOR/célula	Desvio padrão
1	M	31	palato duro	2,42	1,1736
2	M	65	mucosa da bochecha	2,52	1,1054
3	M	47	mucosa do ventre da língua	1,69	0,8128
4	M	70	mucosa da língua	1,48	0,7451
5	M	52	região retromolar	1,96	0,9527
6	M	67	assoalho da boca	2,14	1,0732
7	M	56	mucosa alveolar	2,05	1,0481
8	M	49	palato mole	2,01	0,8348
9	M	57	pilar anterior esq.	1,93	0,9667
10	M	51	região retromolar dir.	1,58	0,7410

Calculamos a média de idade dos pacientes e das NORs dos casos de papiloma e dos casos de carcinoma de células escamosas. Calculamos ainda a porcentagem de homens e mulheres que compunham o conjunto dos casos estudados. Esses dados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise estatística dos casos de papiloma e carcinoma de células escamosas

Neoplasia	Sexo (%)		Idade (Média em anos)	Média de AgNOR/célula	Desvio padrão
	M	F			
Papiloma	30	70	41,3	2,147	0,3843
Carcinoma de cel. escamosas	100		54,5	1,978	0,3356

Aplicando-se o teste “t” de Student sobre os valores da média geral das NORs dos casos de papiloma e carcinoma de células escamosas, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dados.

Apresentamos, a seguir, para complementar nossos resultados, algumas microfotografias (Figuras 1 a 6) que ilustram alguns casos de papiloma e de carcinoma de células escamosas estudados e corados pela técnica de AgNOR.

## Discussão

O papiloma e o carcinoma de células escamosas são lesões que ocorrem na cavidade bucal, provocando alterações no nível epitelial. Aplicando a técnica AgNOR em espécimes de ambas as lesões e analisando-as quantitativamente, não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre eles.

Cabrini et al.<sup>3</sup> também realizaram a técnica AgNOR em papilomas e carcinomas de células escamosas da cavidade bucal, não encontrando diferenças significantes relativas à análise quantitativa. Porém, complementaram a comparação, realizando um estudo morfométrico das mesmas lesões e verificando, então, diferenças morfológicas significantes.

Bryan et al.<sup>2</sup> também analisaram lesões benignas e malignas em epitélio de revestimento, porém em laringe e faringe, e não encontraram diferenças quantitativas das NORs.

Embora discordantes de nossos resultados, vários autores citados anteriormente na literatura,<sup>6, 7, 8, 12</sup> ao estudarem neoplasias benignas e sua contraparte maligna, encontraram diferenças na análise quantitativa em lesões de origem não epitelial. O fato de nossos resultados não estarem em concordância com a maioria dos autores que utilizaram a técnica AgNOR para comparar neoplasias benignas e malignas pode ser devido à diferença de origem das linhagens celulares dos tecidos neoplásicos estudados por nós em relação aos trabalhos anteriormente citados.

Mesmo com uma amostragem de apenas 10 casos de cada lesão, os dados referentes à incidência dessas lesões quanto ao sexo e à idade dos pacientes estavam de acordo com os dados epidemiológicos; isto é, os casos de carcinoma de células escamosas ocorreram mais em homens com idade avançada.

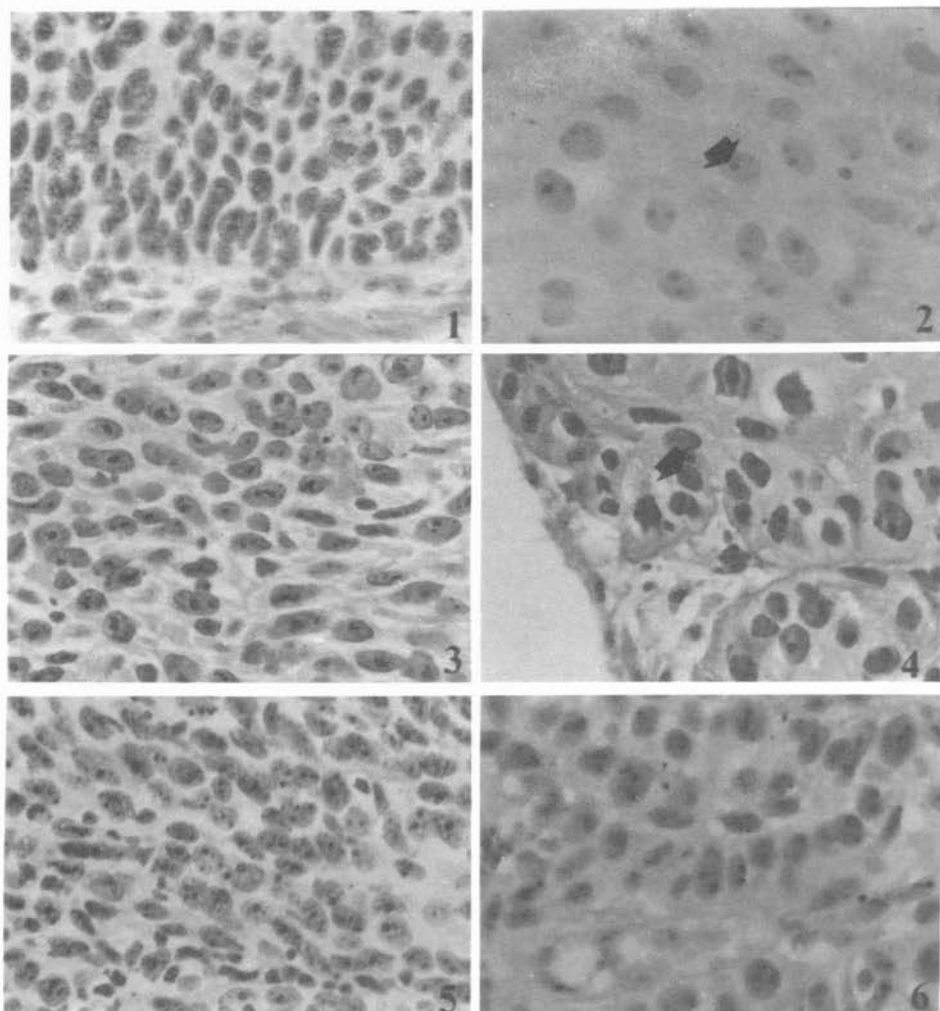


FIGURA 1 - Papiloma: região da camada basal. Técnica AgNOR - aumento 400X.

FIGURA 2 - Papiloma: NOR - seta. Técnica AgNOR - aumento 600X.

FIGURA 3 - Carcinoma de células escamosas: os pontos pretos correspondem às regiões organizadoras nucleolares (NORs). Técnica AgNOR - aumento 400X.

FIGURA 4 - Carcinoma de células escamosas - NOR seta. Técnica AgNOR - aumento 600X.

FIGURA 5 - Carcinoma de células escamosas: observar as regiões organizadoras nucleolares (NORs). Técnica AgNOR - aumento 400X.

FIGURA 6 - Carcinoma de células escamosas: Técnica AgNOR - aumento 600X.

Após a realização deste trabalho, notamos que, para se chegar a resultados mais precisos na comparação de lesões benignas e malignas epiteliais, utilizando-se a técnica AgNOR, é necessária a realização de um estudo morfométrico complementar, que nos permita observar o volume nuclear, volume das NORs por núcleo, a proporção do volume nuclear ocupado pelas NORs e a morfologia das NORs, pois apenas o estudo quantitativo e estatístico não nos permitiu estabelecer diferenças significantes entre carcinoma de células escamosas e papiloma.

Ao observarmos as lâminas, também notamos uma dificuldade na interpretação dos pontos negros que representam as NORs.

## Conclusão

Com base na análise quantitativa das regiões organizadoras nucleolares dos casos de carcinoma de células escamosas e papiloma estudados, conclui-se que:

- não houve diferença estatisticamente significativa entre os casos de papiloma e os de carcinoma de células escamosas, em relação ao número médio de NORs por núcleo;
- a técnica, embora seja de baixo custo e de fácil realização, apresenta dificuldades na sua interpretação, tornando esta última muitas vezes subjetiva;
- apenas a análise quantitativa das regiões organizadoras nucleolares de papilomas e de carcinomas de células escamosas não possibilita a utilização dessa técnica como um método auxiliar para diagnóstico e prognóstico dessas lesões.

## Agradecimentos

Ao corpo docente e discente do Departamento de Patologia da UNESP de São José dos Campos; ao Professor Ivan Balducci, pelo auxílio na análise estatística.

FERRAZ, T. M., DAL RIO, A. C. C., NOGUEIRA, T. de O. Quantitative study of nucleolar organiser regions in papillomas and squamous cell carcinoma. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.24, n.2, p.291-298, 1995.

- **ABSTRACT:** *It is very difficult for the pathologists to graduate malignancy of some neoplasias. A lot of different histochemical staining have been used in order to help in the diagnosis and one of this is the AgNOR technique. For this study, the refered technique was used to stain 10 cases of papilloma and 10 cases of squamous cell carcinoma. However, after counting of the NORs and subsequent statistical analysis, the results were not significant and the technique was not useful in the case of these lesions.*
- **KEYWORDS:** *Carcinoma, squamous cell; papilloma; nucleolus organizer region.*

## Referências bibliográficas

- 1 BABU, K. A., VERMA, R. S. Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) of human chromosomes. *Int. Rev. Cytol.*, v.94, p.151-76, 1985.
- 2 BRYAN, R. L. et al. Nucleolar organizer regions in squamous tumors of the pharynx and larynx. *J. Clin. Pathol.*, v.42, p.218, 1989.
- 3 CABRINI, R. L. et al. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, v.21, p.275-9, 1992.
- 4 CROCKER, J. Nucleolar organizer regions. *Curr. Top. Pathol.*, v.82, p.92-149, 1990.
- 5 CROCKER, J., NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.*, v.151, p.111-8, 1987.
- 6 CROCKER, J., SKILBECK, N. Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *J. Clin. Pathol.*, v.40, p.885-9, 1987.
- 7 DERENZINI, M. et al. Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.*, v.54, p.334-40, 1988.
- 8 EGAN, M. J. et al. Nucleolar organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrossarcoma. *J. Clin. Pathol.*, v.41, p.31-3, 1988.
- 9 HOWAT, A. J. et al. Nucleolar organizer regions in Spitz nevi and malignant melanomas. *Cancer*, v.63, p.474-8, 1989.
- 10 LEONG, A. S. Y., GILHAM, P. Silver staining of nucleolar organizer region in malignant melanoma and melanotic nevi. *Hum. Pathol.*, v.20, p.257-62, 1989.
- 11 MATSUMURA, K., SASAKI, K., SHINOZAKI, F. The nucleolar organizer regions associated protein (AgNOR) in salivary gland tumors. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.18, p.76-8, 1989.
- 12 MORGAN, D. W. et al. Salivary gland tumors studied by means of the AgNOR technique. *Histopathology*, v.13, p.553-9, 1988.
- 13 NUNES, F. D. Leucoplasia bucal: estudo morfológico, imunohistoquímico e histoquímico. São Paulo, 1991. 85p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 14 OFNER, D. et al. Silver stained nucleolar organizer region proteins (AgNOR) as a predictor of prognosis in colonic cancer. *J. Pathol.*, v.162, p.43-9, 1990.
- 15 PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions of the optical level. *Histochem. J.*, v.18, p.5-14, 1986.
- 16 SANO, K. et al. Prognostic implication of the silver-bilding nucleolar organizer regions (AgNOR) in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, v.20, p.53-6, 1991.
- 17 VIEIRA, S. *Introdução à bioestatística*. 2.ed. Rio de Janeiro: Campus, 1991. 203p.
- 18 YANG, P., HUANG, G. S., ZHU, X. S. Role of nucleolar organizer regions in differentiating malignant from benign tumors of the colon. *J. Clin. Pathol.*, v.43, p.235-8, 1990.

Recebido em 4.4.1995.