



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

NAÍZA MENEZES MEDEIROS ABRAHIM

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE BUBR1, MCM2, GEMININA NAS
DISPLASIAS EPITELIAIS ORAIS E SUA CORRESPONDÊNCIA COM
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES EM DIFERENTES SÍTIOS DA CAVIDADE
ORAL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

ORIENTADORA: Dr^a ADRIANA CAMARGO FERRASI

**BOTUCATU
2022**

NAÍZA MENEZES MEDEIROS ABRAHIM

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE BUBR1, MCM2, GEMININA NAS
DISPLASIAS EPITELIAIS ORAIS E SUA CORRESPONDÊNCIA COM
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES EM DIFERENTES SÍTIOS DA CAVIDADE
ORAL**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em Fisiopatologia em
Clínica Médica.

ORIENTADORA: Dr^a ADRIANA CAMARGO FERRASI

**BOTUCATU
2022**

A159e

Abrahim, Naíza Menezes Medeiros

Expressão imunohistoquímica de Bub1, Mcm2, geminina nas displasias epiteliais orais e sua correspondência com carcinomas epidermóides em diferentes sítios da cavidade oral : Expressão imunohistoquímica de Bub1, Mcm2, geminina nas displasias epiteliais orais e sua correspondência com carcinomas epidermóides em diferentes sítios da cavidade oral / Naíza Menezes Medeiros Abrahim. -- Botucatu, 2022

32 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientadora: Adriana Camargo Ferrasi

1. Câncer de boca. 2. displasia. 3. Mcm2. 4. geminina. 5. Bub1. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

NAÍZA MENEZES MEDEIROS ABRAHIM

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE BUBR1, MCM2, GEMININA NAS
DISPLASIAS EPITELIAIS ORAIS E SUA CORRESPONDÊNCIA COM
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES EM DIFERENTES SÍTIOS DA CAVIDADE
ORAL**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutora em Fisiopatologia em
Clínica Médica.

COMISSÃO EXAMINADORA

**Dr^a Adriana Camargo Ferrasi
Orientadora – UNESP/Botucatu**

**Dr^a Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto
UFAM/Manaus – Amazonas**

**Dr^a Silvia Helena Barem Habenhorst
UFC/Fortaleza – Ceará**

**Dr Jonas Byk
UFAM/Manaus – Amazonas**

**Dr^a Roberta Barroso Cavalcante
Unifor/Fortaleza - Ceará**

**BOTUCATU
12 de dezembro 2022**

RESUMO

Expressão imunohistoquímica de BUBR1, MCM2, geminina nas displasias epiteliais orais e sua correspondência carcinomas epidermóides em diferentes sítios da cavidade oral

Immunohistochemical expression of BUBR1, MCM2, geminin in oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas different sites of the oral cavity of oral cavity.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi determinar o padrão de expressão imunohistoquímica das proteínas BubR1, Mcm2 e geminina na displasia epitelial oral e carcinoma epidermóide e avaliar o perfil de expressão em diferentes sítios da cavidade oral. *Métodos:* Foram selecionadas amostras de tecidos com avaliação histopatológica de displasia epitelial oral (66) e de carcinoma epidermóide oral (63), analisados após imunocoloração para detecção das proteínas estudadas. A imunoexpressão de Ki67 foi utilizada como marcadora da atividade proliferativa. *Resultados:* Geminina, Mcm2, BubR1 e Ki67 apresentaram superexpressão nos tumores em comparação com as displasias, e demonstraram uma correlação com os diferentes sítios anatômicos analisados. Pela análise da correlação de Pearson, houve uma relação linear ($r=0.66190$) entre os valores de Li de MCM2 e Ki67 nas displasias de localização extra-oral ($p=0.0015$). Uma expressão diminuída de Ki67 foi observada nas lesões malignas de lábio. *Conclusão:* As proteínas BubR1, Mcm2 e geminina exibiram padrões de expressão crescente das displasias para os carcinomas orais, destacando seu potencial papel no desenvolvimento do câncer, o que sugere a possibilidade destes biomarcadores serem úteis na predição de transformação nas lesões com potencial de malignização.

Palavras-chave: câncer de boca, displasia, Mcm2, geminina, Bubr1

ABSTRACT

Immunohistochemical expression of BUBR1, MCM2, geminin in oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas different sites of the oral cavity of oral cavity.

Objective: The aim of this study was to determine the immunohistochemical expression pattern of BubR1, Mcm2 and geminin proteins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma and to evaluate the expression profile in different sites of the oral cavity. Methods: Tissue samples with histopathological evaluation of oral epithelial dysplasia (66) and oral squamous cell carcinoma (63) were selected and analyzed after immunostaining to detect the studied proteins. Ki67 immunoexpression was used as a marker of proliferative activity. Results: Geminin, Mcm2, BubR1 and Ki67 showed overexpression in tumors compared to dysplasias, and showed a correlation with the different anatomical sites analyzed. By Pearson's correlation analysis, there was a linear relationship ($r=0.66190$) between Li values of MCM2 and Ki67 in dysplasias of extra-oral location ($p=0.0015$). A decreased expression of Ki67 was observed in malignant lip lesions. Conclusion: BubR1, Mcm2 and geminin proteins exhibited increasing expression patterns of dysplasias for oral carcinomas, highlighting their potential role in cancer development, which suggests the possibility of these biomarkers being useful in predicting transformation in lesions with malignant potential.

Keywords: oral cancer, dysplasia, Mcm2, geminin, Bubr1.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. METODOLOGIA.....	12
3. RESULTADOS.....	13
4. DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÕES.....	28
6. REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

O câncer de boca é uma neoplasia que afeta lábios, comissuras, língua, assoalho, gengiva, mucosa jugal, região retromolar e palato duro (INCA, 2022). Mundialmente, essa neoplasia ocupa a oitava posição e representa um problema de saúde pública, visto que menos de 60% dos pacientes sobrevivem mais de 5 anos (Ng et al 2016, Rivera 2015, Amit et al. 2013).

Segundo dados da Globocan, a cada ano são esperados 377.713 novos casos e 177.757 mortes, dos quais mais de dois terços são oriundos de países em desenvolvimento (Ferlay, 2020). Na América do Sul, para o câncer de lábio e cavidade oral são estimados em 15.868 novos casos e ainda 6.046 óbitos são causados pela doença (Gupta et al. 2016).

O Brasil tem a maior incidência de câncer de boca na América Central e do Sul, e mais de 90% dos casos são representados pelo carcinoma epidermóide (Louredo et al. 2022). No país, estimam-se 15.210 casos novos de câncer da cavidade oral em 11.200 homens e 4.010 mulheres para cada ano. Trata-se do 5º câncer mais comum em homens, o 11º em mulheres (INCA, 2020).

Para região Norte são esperados 530 novos casos anualmente, sendo que destes 120 casos para o Amazonas, sendo 90 para homens e 30 para mulheres (INCA, 2020).

O carcinoma epidermóide representa 95% dos casos, é mais comum em homens, com a faixa etária mais prevalente acima dos 45 anos, acometendo mais frequentemente a língua, seguida do assoalho (Louredo et al. 2022, Waal, 2013).

O carcinoma da cavidade oral e do lábio pode desenvolver-se *de novo* ou a partir de lesões com potencial de malignização (LPM). Tais afecções foram definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como condições que apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer bucal e incluem leucoplasia, eritroplasia, líquen plano e fibrose submucosa oral (Warnakulasuriya et al. 2020, Kerawala et al 2016).

Essas alterações clínicas, manchas vermelhas e brancas em particular, possuem alterações morfológicas e citológicas semelhantes às observadas em carcinomas superficialmente invasivos; e, algumas das alterações cromossômicas, genômicas e moleculares detectadas em carcinomas epidermóides superficiais

invasivos também são encontradas em LPDs (Monteiro et al. 2021, Warnakulasuriya et al. 2020).

Apesar dos avanços nas modalidades de detecção e terapia, em geral, os pacientes com câncer oral têm o diagnóstico realizado tardiamente, acarretando tratamentos complexos, mutilantes e de alto custo, tanto financeiro, como social, e de prognóstico sombrio (Palasz et al., 2017). Há um forte interesse em compreender o mecanismo molecular subjacente ao desenvolvimento e progressão do câncer oral e na identificação de biomarcadores específicos para detecção precoce, prognóstico efetivo, melhor manejo e melhores resultados de tratamento (Teixeira et al., 2015).

Com o advento das tecnologias que permitem avaliar perfil genômico, proteico e metabólico, foram descobertos biomarcadores abrangentes que podem identificar tumores com maior potencial invasivo e metastático. Investigação de novos biomarcadores abrirão ainda mais o caminho para o desenvolvimento de terapias verdadeiramente personalizadas para pacientes com câncer de boca (LI et al., 2018).

Proteínas reguladoras do ciclo celular, incluindo aquelas que promovem a iniciação da síntese de DNA, como proteínas de manutenção de minicromossomos (MCM), aquelas que ajudam a regular a diferenciação e proliferação celular, como a geminina, e a proteínas componentes do ponto de verificação de montagem do fuso mitótico como BubR1, têm demonstrado desregulação em várias lesões malignas de diferentes tecidos humanos (Sun, Cheng, Liu 2022, Rizzardi et al., 2010, Tamura et al., 2010, Torres-Rendon et al. 2009).

A proteína BubR1 (BUB-enxerto não inibido por benzimidazoles relacionado a proteína), também chamado de Bub1b ou Mad3, é uma proteína importante no ponto de verificação de montagem do fuso mitótico (SAC), um ponto de verificação que protege a célula da segregação cromossômica e aneuploidia durante a mitose (Chou et al., 2015). Análises sobre nível da expressão BUBR1 demonstraram que essa proteína estava superexpressa em carcinomas do pulmão, cólon, estômago, mama, bexiga, rim, esôfago, tireóide, ovário, ducto salivar e fígado (Rizzardi et al., 2010). Estudos em câncer de boca também evidenciam a expressão aumentada de BubR1 (Hsieh et al., 2010; Rizzardi et al., 2010; Teixeira et al., 2015), além de que, a superexpressão de *BUBR1* parece ser um novo marcador tumoral para prever um comportamento biológico mais agressivo (Hsieh et al., 2010).

As proteínas de manutenção do minicromossomo (Mcm 2-7) são um pré-requisito para a replicação do DNA e iniciação do ciclo celular, são extremamente importantes na manutenção da estabilidade genômica e são expressas ao longo de todo o ciclo celular, incluindo as células que saem de G0 para entrar na fase G1 (Sun, Cheng, Liu 2022, Torres-Rendon et al., 2009, Kearsey e Labib, 1998).

A expressão e a ativação aberrantes de Mcm2-7 prejudicam diretamente a replicação do DNA, causam instabilidade genômica e foram correlacionadas com tumorigênese e malignidade (Sun, Cheng, Liu 2022). No ciclo celular, o complexo de manutenção do minicromossomo (Mcm2-7) desempenha um papel importante na facilitação da replicação do DNA, e Mcm2 e Mcm7 demonstraram ser biomarcadores confiáveis de proliferação de CA de pulmão de células pequenas (Haruki et al., 2011).

Altos níveis de Mcm-2 em displasias epiteliais orais podem sugerir um mecanismo defensivo durante o dano genômico antes que a transformação maligna ocorra. Estudos sugerem que as células do carcinoma epidermóide estão em alto estado proliferativo, conforme demonstrado pelos altos níveis de Mcm2, geminina e Ki67, o LI (*Labelling Index*) para Mcm2 se mostrou um marcador de proliferação eficaz. (Torres-Rendon et al., 2009)

A geminina, expressa durante as fases S, G2 e M, também é uma proteína que desempenha um papel crucial na regulação do ciclo celular. Após o início da replicação do DNA no início da fase S, a geminina inibe o recrutamento do complexo MCM para os cromossomos e previne um segundo ciclo de replicação (Haruki et al., 2011).

Alguns estudos demonstraram que a geminina é expressa especificamente em linfócitos em proliferação, células germinativas masculinas e várias células epiteliais, incluindo as da pele, colo uterino e cólon. Quanto às neoplasias malignas, vários relatos revelaram que a geminina foi superexpressa em várias células cancerígenas humanas, e sua expressão foi aumentada com o grau do tumor levando a um prognóstico ruim. Portanto, parece que a geminina pode refletir as atividades proliferativas de tumores malignos e pode ser um biomarcador de prognóstico útil (Haruki et al., 2011).

Em um estudo em carcinomas orais, o LI (*Labelling Index*; porcentagem de células tumorais imunorreativas na área avaliada) da geminina não se correlacionou com nenhum perfil clínico-patológico. Os autores especulam que o LI

para geminina pode refletir tumores em proliferação na fase S-G2-M, esse estudo mostrou que maiores LI para geminina estavam associados a um melhor prognóstico (Tamura et al., 2010).

A proteína Ki67 foi identificada por Scholzer e Gerdes no início da década de 1980 (Scholzen e Gerdes, 2000). Ki67 tem meia-vida de ~1-1,5 hora, está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas está ausente nas células em repouso (G0), nas fases posteriores da mitose (durante a anáfase e a telófase), ocorre uma grande diminuição nos níveis de Ki-67 (TAKKEM et al., 2018). Em um estudo da proteína Ki67 em displasias epiteliais e carcinomas orais, os autores concluíram que proliferação celular nessas lesões pode ser determinada pela sua taxa de crescimento utilizando anticorpo monoclonal anti-Ki-67 e que a expressão de Ki67 é significativamente maior em tecidos com carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado e em displasias moderadas ou graves e fornece um critério objetivo para determinar a gravidade das displasias e a classificação histológica de carcinomas orais (TAKKEM et al., 2018). O antígeno nuclear Ki67 tem sido usado como biomarcador de elevada proliferação celular (Sun e Kaufman, 2018).

O sítio anatômico de ocorrência da lesão tem uma significativa relação com o comportamento biológico do tumor e o prognóstico da doença, bem como o tipo de resposta ao tratamento. Estudos que se propõem a analisar a expressão de diferentes biomarcadores proteicos e a sua relação individual e combinada com os diferentes sítios tumorais, poderão contribuir para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos com a doença, bem como auxiliar no esclarecimento sobre as variadas respostas ao tratamento.

O objetivo deste estudo foi determinar o padrão de expressão proteica por imuno-histoquímica de BubR1, Mcm2 e geminina na displasia epitelial oral e carcinoma epidermóide e avaliar o perfil de expressão em diferentes sítios da cavidade oral, buscando por biomarcadores de risco para a carcinogênese oral.

2. METODOLOGIA

Após aprovação pelo Comitê Institucional de Ética em Pesquisa Envolvendo Humanos (Protocolo número: 2.300.886), amostras de tecidos com diagnósticos de displasia epitelial oral (66) e de carcinoma epidermóide oral (63) foram selecionadas dos arquivos do Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade de Fortaleza e os dados laboratoriais obtidos do Labgem - Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal do Ceará. O tamanho das amostras foi de conveniência, sendo dimensionado para um nível de confiança de 95%.

Dados clínico-patológicos e demográficos foram obtidos dos prontuários. Os critérios a seguir foram usados para selecionar os amostra:

Critérios de inclusão: blocos parafinizados de pacientes com diagnóstico histopatológico de displasia epitelial oral e de carcinoma epidermóide oral; com descrição de gênero, idade e localização tumoral.

Critérios de exclusão: blocos de parafina que não continham quantidade e qualidade suficientes de material para análise morfológica. Amostras de carcinomas obtidas de pacientes previamente submetidos a radioterapia ou quimioterapia.

Os cânceres foram classificados de acordo com o *American Joint Committee in Cancer (AJCC) Staging System 7^a edição*. Nenhum paciente havia sido submetido à quimioterapia antes de obter o espécime. Cada caso foi avaliado por um patologista da equipe a fim de confirmar o diagnóstico, diferenciação e estadiamento tumoral. Cortes histológicos com 4 µm de espessura foram preparados a partir dos blocos selecionados e colocados em lâminas de vidro tratadas com silano para procedimentos de imuno-coloração.

Amostras Clínicas

Após desparafinização e reidratação, as lâminas foram colocadas em recipiente com 10 mM de solução tampão citrato (pH 6,0) e a recuperação do antígeno foi realizada em câmara de pressão Pascal (Dako) durante 5 minutos a 120°C. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 3% solução de H₂O₂. Anticorpos primários foram incubados por 16 horas a 4–8°C em câmara úmida. A reação foi detectada com o Kit universal de polímero HRP MACH 4 (Biocare Medical) de acordo com as recomendações do fabricante. A contra

coloração foi realizada com hematoxilina de Carazzi. Casos positivos conhecidos de carcinomas gástricos foram usados como controles positivos para cada marcador. A coloração marrom nos núcleos foi considerada para Ki67, enquanto que para BubR1, geminina, Mcm2 foram consideradas separadamente a coloração nuclear e citoplasmática.

3. RESULTADOS

A casuística estudada constituiu-se de 129 pacientes, com lesões em cavidade oral, sendo 66 com diagnóstico de displasia epitelial (leve 21, moderada 24, grave 21) e 63 com carcinoma epidermóide em cavidade oral.

A tabela 1 apresenta os casos distribuídos de acordo com o gênero e a tabela 2 agrupa-os em localização extra-oral e intra-oral.

Tabela 1. Classificação histopatológica das lesões distribuída de acordo com o gênero.

Gênero	CANCER	DISPLASIA	ANÁLISE ESTATÍSTICA	
	(n=63)	(n=66)	OR (95%IC)	P-value*
M	43	33	1.955 (0.9463 - 4.037)	0.1008
F	20	30	0.5116 (0.2477 - 1.057)	0.1008

Teste exato de Fisher; OR: razão de chances; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *P ≤ 0,05 é considerado uma relação estatisticamente significativa

Tabela 2. Classificação histopatológica das lesões distribuída de acordo com os grandes sítios.

Sítio	CÂNCER	DISPLASIA	ANÁLISE ESTATÍSTICA	
	n=63 n (%)	n=66 n (%)	OR (95%IC)	P-value*
Intra-oral	53 (84.13)	46 (68.66)	2.419 (1.034 - 5.662)	0.0417*
Extra-oral	10 (15.87)	21 (31.34)	0.413 (0.177 - 0.967)	0.0417*

Teste exato de Fisher; OR: razão de chances; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *P ≤ 0,05 é considerado uma relação estatisticamente significativa

Foram considerados intra-orais as localizações língua, mucosa jugal, região retromolar, palato, assoalho e extra-oral a região do lábio, por essas regiões apresentando carcinogênese diferenciada, como descrito na literatura (INCA,

2022). A tabela 3 apresenta os casos separados de acordo com a localização anatômica de ocorrência do tumor.

Tabela 3. Classificação histopatológica das lesões distribuída de acordo com a localização anatômica.

Sítio	CÂNCER	DISPLASIA	ANÁLISE ESTATÍSTICA	
	n=63 n (%)	n=66 n (%)	OR (95%IC)	P-value*
Lábio	10(15.87)	21(31.34)	0.413 (0.177 - 0.967)	0.0417*
Assoalho e língua	9(14.29)	0(00.00)	**	0.9716
Rebordo alveolar	3(4.76)	11(16.42)	0.255 (0.067 - 0.960)	0.0434*
Mucosa jugal	3(4.76)	6(8.96)	0.508 (0.122 - 2.126)	0.3541
Palato	4(6.35)	6(8.96)	0.689 (0.185 - 2.567)	0.5791
Retromolar	6(9.52))	1(1.49)	6.944 (0.812 - 59.375)	0.0768
Assoalho	15(23.81)	2(2.99)	10.156 (2.217 - 46.52)	0.0028*
Língua	13(20.63)	19(28.63)	0.657 (0.292 - 1.475)	0.3086

Teste exato de Fisher; OR: razão de chances; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *P ≤ 0,05 é considerado uma relação estatisticamente significativa; **a distribuição dos dados não permitiu estabelecer um teste de associação entre os grupos.

O sítio mais acometido em pacientes com câncer foi assoalho seguido de língua, e nas displasias, foi o lábio seguido de língua. De acordo com o *Odds Ratio* (0,255), lesões localizadas no lábio e rebordo alveolar tiveram menor risco de representarem um tumor (p = 0.417 e 0.0434, respectivamente).

Tabela 4. Expressão das proteínas estudadas distribuída de acordo com a classificação histopatológica das lesões.

PROTEÍNAS	CANCER	DISPLASIA	ANÁLISE ESTATÍSTICA	
	Média (LI) (n=63)	Média (LI) (n=66)	OR (95%CI)	P-value*
Geminina	23.74	15.45	1.169 (1.101 - 1.242)	<.0001
MCM2	44.31	33.47	1.063 (1.032 - 1.094)	<.0001
BUBR1nuc	39.74	31.17	1.028 (1.007 - 1.049)	0.0097
BUBR1cito	57.43	32.14	1.076 (1.047 - 1.105)	<.0001
Ki67	35.22	24.95	1.021 (1.004 - 1.039)	0.0161

Teste exato de Fisher; OR: razão de chances; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *P ≤ 0,05 é considerado uma relação estatisticamente significativa, marcação nuc: nuclear e cito: citoplasmática

Geminina, MCM2, BUBR1 (marcação nuclear e citoplasmática) e Ki67 apresentaram superexpressão, com significância estatística, nos tumores em comparação com as displasias. Os resultados sugerem que as células do carcinoma epidermóide estão em um estado de alta proliferação, como demonstrado pelos níveis das proteínas analisadas (Tabela 4).

A seguir são apresentadas as médias (\bar{x}) do LI (*Labelling Index*), que representa a porcentagem das células marcadas para cada proteína analisada. O LI indica a expressão proteica do marcador estudado por imunohistoquímica e, no presente estudo, a casuística foi agrupada segundo limiar estabelecido como: valores de LI abaixo da média ($LI < \bar{x}$) e, valores de LI acima ou iguais à média ($LI \geq \bar{x}$).

Tabela 5 - Expressão imunohistoquímica das proteínas estudadas nos cânceres, distribuídas entre os casos agrupados por sítio da lesão.

		BUBR1nuc	BUBR1cito	Geminina	MCM2	Ki67
	LI \bar{x}	40,33	55,42	23,55	44,00	38,30*
Intraoral	LI < \bar{x}	35 (66,03)	28 (52,83%)	24 (45,28%)	23 (43,39%)	33 (62,26%)
	LI $\geq \bar{x}$	18 (33,96)	25 (47,16%)	29 (54,71%)	30 (56,60%)	20 (37,73%)
	LI \bar{x}	36,65	68,12	24,73	46,01	18,9*
Extra-oral	LI < \bar{x}	7 (70%)	4 (40%)	5 (50%)	5 (50%)	6 (60%)
	LI $\geq \bar{x}$	3 (30%)	6 (60%)	5 (50%)	5 (50%)	4 (40%)

Teste exato de Fisher; OR: razão de chances; IC=95%; *Correlações com p significativo $p < 0.05$; Valores de p não apresentados. LI \bar{x} = LI média

Uma expressão diminuída de Ki67 foi observada nas lesões malignas extra-orais, apresentando correlação estatística. O índice de LI para Ki67 no presente estudo o confirma como um efetivo marcador de proliferação celular, quanto às localizações extra-oral e intra-oral (Tabela 5).

A tabela 6 apresenta os resultados da expressão nuclear e citoplasmática de BubR1.

Tabela 6. Expressão imunohistoquímica da proteína BubR1 distribuída entre os casos agrupados por sítio da lesão

		BUBR1nuc				BUBR1cito				
		Displasia	Câncer	OR (95%IC)	p-value		Displasia	Câncer	OR (95%IC)	p-value
Intra-oral	LI \bar{X}	32.62 ± 20.93	40.33±16.43	1.023: 1.000 - 1.047	0.0488*	LI \bar{X}	31.07±16.73	55.42±19.07	1.084: 1.047 - 1.122	<.0001*
Extra-oral	LI \bar{X}	28.75±14.40	36.65±18.34	1.033: 0.983 - 1.085	0.2045	LI \bar{X}	34.06±17.16	68.12±24.71	1.075: 1.023 - 1.130	0.0045*

Teste exato de Fisher; OR: razão de chances; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *Correlações com p significativo $p < 0.05$; LI \bar{X} = LI média

A tabela 7 apresenta os resultados da expressão imuno-histoquímica da geminina.

Tabela 7. Expressão imunohistoquímica da proteína Geminina distribuída entre os casos agrupados por sítio da lesão

		Geminina			
		Displasia	Câncer	OR (95%IC)	p-value
Intra-oral	LI \bar{X}	15.89±6.77	23.55±7.00	1.170: 1.090 - 1.255	<.0001*
Extra-oral	LI \bar{X}	14.90±8.42	24.73±7.39	1.159: 1.031 - 1.304	0.0137*

Teste exato de Fisher; OR: razão de chances; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *Correlações com p significativo $p < 0.05$; LI \bar{X} = LI média

Quanto a expressão de geminina, esta estava aumentada nas lesões malignas nos casos intra ($p < 0.0001$ displasia 15.89 ± 6.77 , câncer 23.55 ± 7.00) e extra-orais ($p = 0.0137$, displasia 14.90 ± 8.42 , câncer 24.73 ± 7.39), com significância estatística.

A expressão imuno-histoquímica de MCM2 é apresentada na tabela 8.

Tabela 8. Expressão imunohistoquímica da proteína MCM2 distribuída entre os casos agrupados por sítio da lesão

		MCM2			
		Displasia	Câncer	OR (95%IC)	p-value
Intra-oral	LI \bar{X}	32.17 \pm 13.03	43.99 \pm 12.96	1.072 : 1.035 - 1.111	0.0001*
Extra-oral	LI \bar{X}	36.10 \pm 14.30	46.01 \pm 14.09	1.051 : 0.993 - 1.114	0.0879

Teste exato de Fisher; OR: razão de chances; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; *Correlações com p significativo $p < 0.05$; LI \bar{X} = LI média

MCM2 se mostrou um potencial marcador de malignidade nos casos tumorais intra-orais ($p = 0.0001$, displasia 32.17 ± 13.03 , câncer 43.99 ± 12.96) e parecem estar mais expressos nos casos extra-orais, contudo, não apresentaram significância estatística.

Para verificar a relação entre da expressão das proteínas estudadas e a atividade proliferativa das lesões, foi estudada a correlação entre as médias de expressão imuno-histoquímica (LI \bar{X}) com as médias de expressão de Ki67, marcador de proliferação celular. A análise de regressão linear foi realizada com o procedimento REG do Statistical Analysis System (SAS) e os resultados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Análise de Regressão linear entre as médias de expressão imunohistoquímica de BubR1, MCM2 e geminina e as médias de expressão de Ki67, distribuídos entre os casos, agrupados por lesão e sítio.

	BUBR1nuc/Ki67		BUBR1cito/Ki67		Geminina/Ki67		MCM2/Ki67	
	Displasia	Câncer	Displasia	Câncer	Displasia	Câncer	Displasia	Câncer
Intra-oral	0.2483	0.0685	0.2495	0.5839	0.1736	0.0131*	0.2118	0.2340
Extra-oral	0.3731	0.7927	0.0733	0.5362	0.0473*	0.2813	0.0015*	0.2734

Regressão Linear (REG – Statistical Analysis System (SAS); Dados informados: valor de P; *Correlações com p significativo $p < 0.05$

A tabelas 10 e 11 apresentam a Matriz de correlação linear de Pearson, para as médias da expressão imuno histoquímica (LI \bar{X}) das proteínas analisadas em relação ao índice de expressão de Ki67 para câncer e displasia.

Foi observada relação linear de moderada a forte ($r=0.66190$) entre os valores de LI de MCM2 e Ki67 nas displasias localização extra-oral ($p=0.0015$) e essa relação pode ser ilustrada na tabela 10 e no gráfico 1. Também houve associação entre os índices de geminina nas displasias ($p=0.0090$) e câncer ($p=0.0174$) (tabela 11 e gráfico 2), porém com fraca correlação linear ($r < 0.50$).

Em adição, essa análise evidenciou a correlação entre a expressão de BubR1nuc e BubR1cit ($p=0.0050$), já apontada anteriormente; e entre BubR1 nuc e cito e MCM2 ($p=0.0147$ e $p=0.0133$) nas displasias (tabela 10).

Tabela 10. Matriz de correlação linear de Pearson, para as médias de expressão das proteínas analisadas em relação a expressão de Ki67 nas amostras de displasias.

	BUBR1nuc	BUBR1cit	GEMININA	MCM2	Ki67
BUBR1nuc	-	-0.00729	0.25682	0.39694	0.18684
BUBR1cit	0.58841	-	0.30844	0.28889	0.18638
GEMININA	0.40080	0.20948	-	0.40094	0.21947
MCM2	0.52429	0.53068	0.46749	-	0.20180
Ki67	0.21047	0.40902	0.44861	0.66190	-

Valores de Rho **em negrito** indicam p-value<0.05; Valores **sombreados** (extra-oral) e valores não sombreados (intra-oral)

Tabela 11. Matriz de correlação linear de Pearson, para as médias de expressão das proteínas analisadas em relação a expressão de Ki67 nas amostras de câncer.

	BUBR1nuc	BUBR1cit	GEMININA	MCM2	Ki67
BUBR1nuc	-	0.18841	0.19423	0.18539	0.25215
BUBR1cit	0.03610	-	0.21792	0.06264	0.07696
GEMININA	-0.51697	-0.22922	-	0.36206	0.33860
MCM2	-0.49198	-0.01845	0.46330	-	0.16629
Ki67	0.09563	-0.22278	0.37810	-0.38391	-

Valores de Rho **em negrito** indicam p-value<0.05; Valores **sombreados** (extra-oral) e valores não sombreados (intra-oral)

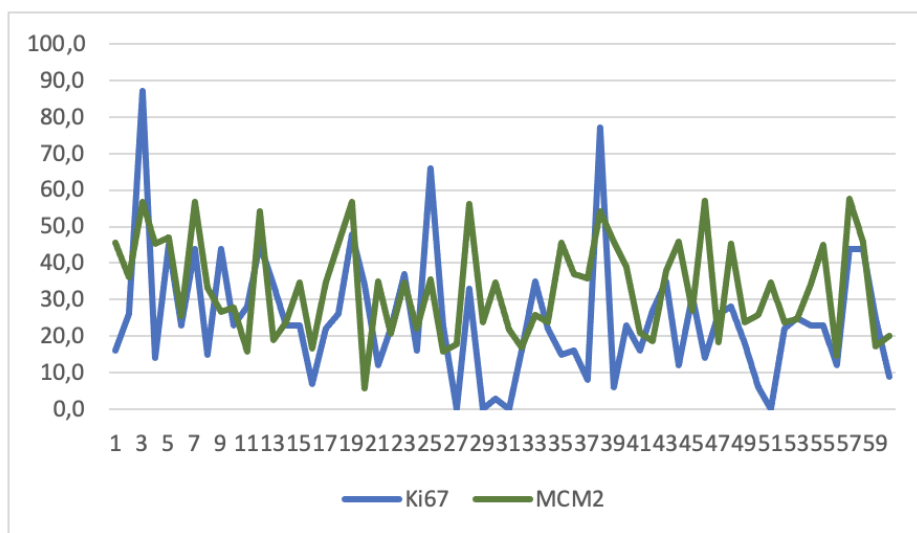


Gráfico 1 - Relação entre valores de LI (Labelling Index) entre MCM2 e Ki67 nas displasias localização extra-oral. O eixo Y mostra os valores de LI e o eixo X apresenta cada umas amostras analisadas.

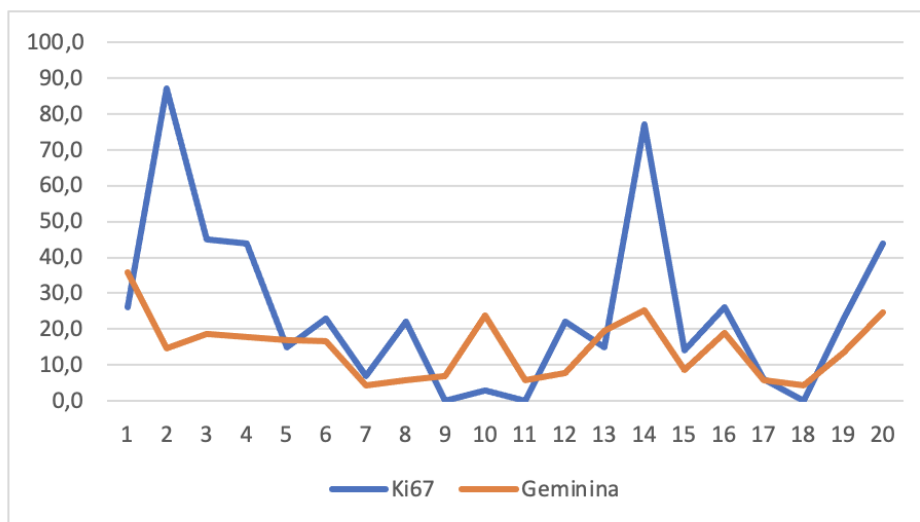


Gráfico 2 - Relação entre valores de LI (*Labelling Index*) entre Geminina e Ki67 nas displasias localização extra-oral. O eixo Y mostra os valores de LI e o eixo X apresenta cada umas amostras analisadas.

A curva ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*) foi construída para os marcadores analisados, buscando verificar se representariam bons marcadores de risco para câncer oral.

Neste modelo de análise, quanto mais próximo a área sob a curva (AUC, *Area Under the ROC Curve*) for próximo de 1, significa que temos uma boa medida de separabilidade, o que descreve a sua capacidade discriminativa. A curva é obtida pela representação dos valores de sensibilidade e especificidade em pontos de coordenadas, onde, por convenção, a sensibilidade é representada no eixo das ordenadas (Y) e a especificidade é representada no eixo das abcissas (X), variando ambas de 0 a 1 (0-100%)(Martinez, 2003) .

Foram considerados como bons ou excelentes biomarcadores aqueles com Área Sob a Curva (AUC) maior que 0,8, alta sensibilidade e alta especificidade. AUC, do inglês *Area Under the ROC Curve*, é uma medida estatística que avalia se o modelo sugerido (nesse caso, a LI) é acurado para discriminar o que se propõe; uma AUC elevada indica que o modelo é preciso e que marcador separa os grupos comparados, no presente caso, o câncer oral da displasia. As regras gerais, segundo Osmer, para se interpretar valores AUC são:

AUC = 0,5	- Sem discriminação (resultados aleatórios)
$0,7 \leq \text{AUC} < 0,8$	- Discriminação aceitável
$0,8 \leq \text{AUC} < 0,9$	- Discriminação excelente
$\text{AUC} \geq 0,9$	- Discriminação Notável (muito rara)

Assim, quanto mais perto a curva ROC ficar localizada ao canto superior esquerdo do gráfico e quanto maior a AUC, melhor será o marcador para indicar a malignidade.

A seguir são apresentados os resultados das análises de acurácia baseadas nas curvas ROC:

Para o marcador BubR1 (citoplasmático) na localização intra-oral a AUC foi de 0.8558 e extra-oral 0.8762 (Gráfico 3).

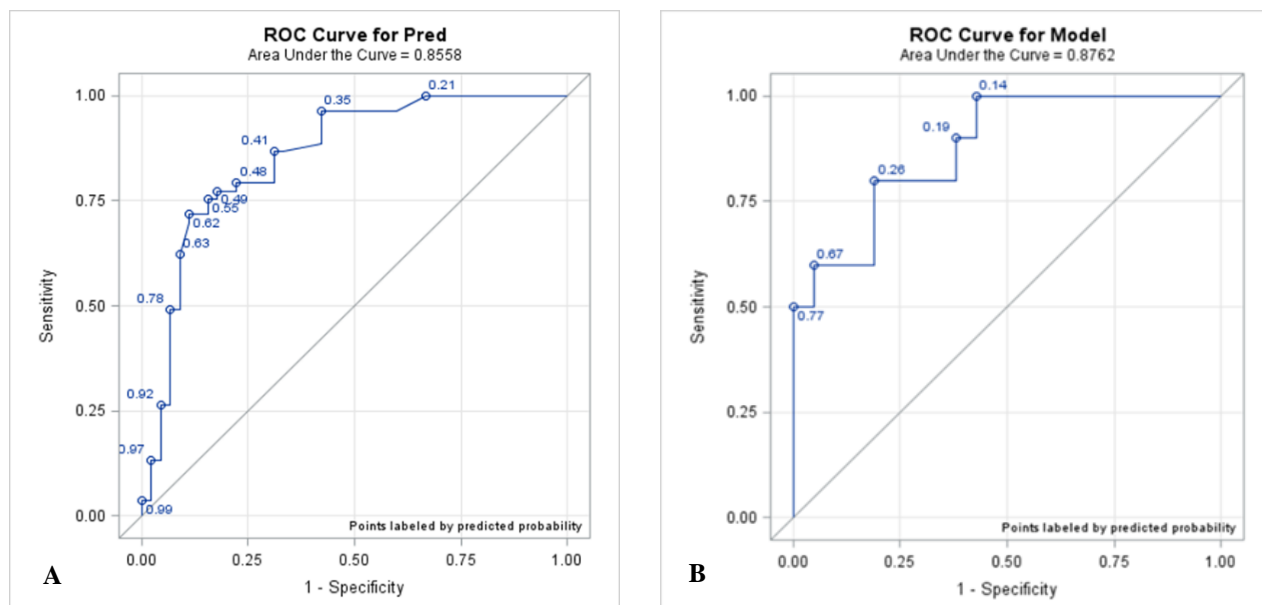


Gráfico 3- Curva ROC para o marcador BubR1 (citoplasmático) de localização intra-oral (A) e extra-oral (B), onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%;

Nas análises de geminina intra-oral, a AUC foi 0.7857 e extra-oral foi de 0.7952 (Gráfico 4) e, para MCM2 câncer intra-oral e extra-oral foram de 0.7384 e 0.6738, respectivamente.

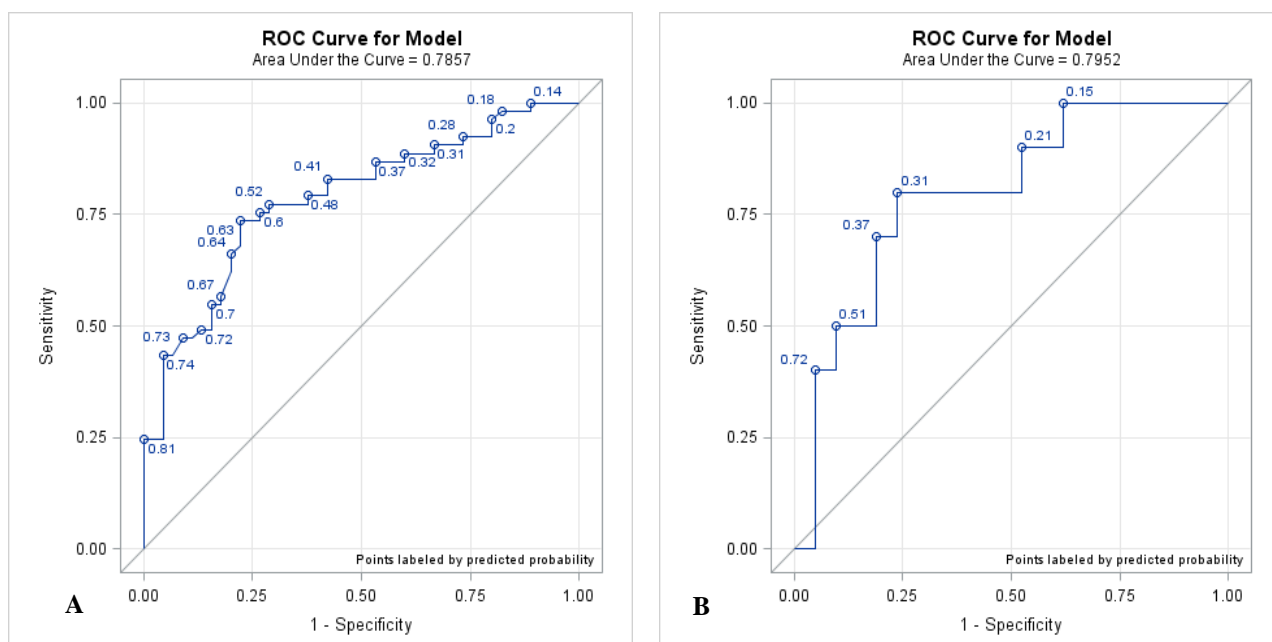


Gráfico 4- Curva ROC para Geminina na localização intra-oral (A) e extra-oral lesão(B), onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%;

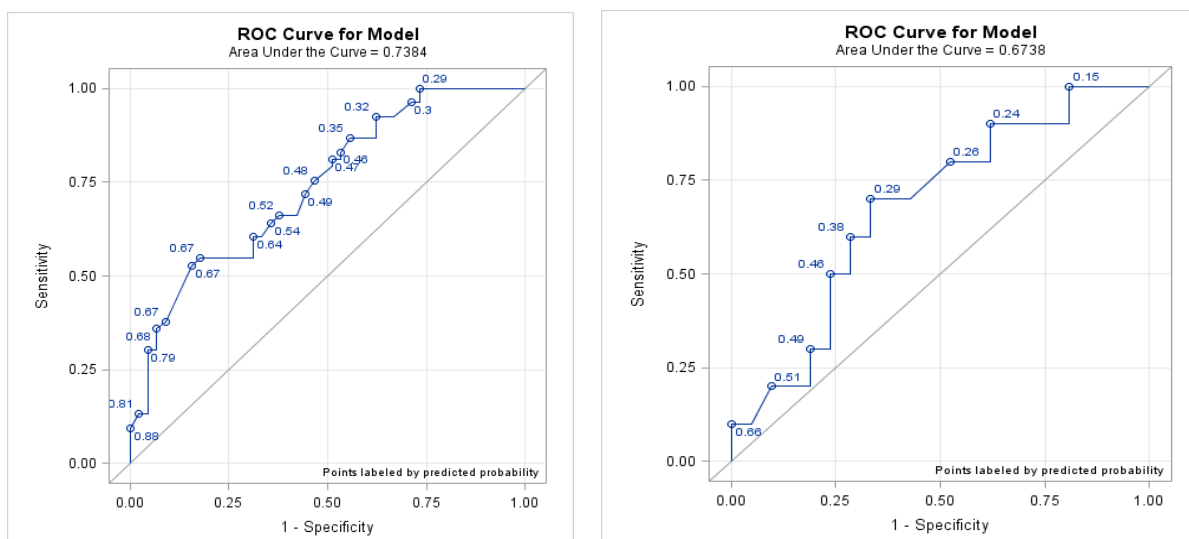


Gráfico 5- Curva Roc para o marcador MCM2 localização intra-oral(A) e extra-oral lesão(B), onde pode ser observada a área sob a curva (AUC) com IC de 95%;

4. DISCUSSÃO

Os tumores malignos da cavidade oral acometem os dois terços anteriores da língua, assoalho, mucosa bucal, trígono retromolar, palato duro e gengiva, os tumores do lábio requerem consideração separada, pois sua história natural difere da doença da cavidade oral, além de especificidades anatômicas e histológicas (INCA 2022, Kerawala et al 2016, Sobin, Gospodarowicz E Wittekind, 2010).

Essas duas patologias se distinguem na carcinogênese, no câncer de boca os principais agente carcinogênicos são tabaco e álcool e para lábio exposição solar e tabaco (Kerawala et al 2016). Contudo muito estudos não fazem esta categorização, havendo divergências nos limites anatômicos da cavidade oral ou ainda consideram o câncer de lábio um tipo de câncer de generalizado de boca (Louredo et al. 2022, Ren et al. 2020). Outros autores, classificam como sítios diferentes, como em nosso estudo onde o câncer de lábio foi considerado como sítio extra-oral, conforme Tabela 2 (Louredo et al. 2022).

Quando houver a detecção dessas lesões a biópsia é indicada para confirmação diagnóstica, os aspectos histológicos podem variar desde uma simples hiperplasia epitelial a displasia severa, a presença e o grau de displasia epitelial mostraram utilidade prognóstica na estratificação do risco de desenvolvimento de câncer (Warnakulasuriya et al. 2021, Ranganathan and Loganathan, 2019). Para a

presente análise foram selecionados 66 casos de displasia e 63 de carcinomas epidermóides.

Pelos dados apresentados na Tabela 1, de acordo com o valor do *odds ratio* (OR), a chance de ser homem e ter câncer é 2,316 vezes maior, este perfil epidemiológico está de acordo com o que já fora previamente descrito (Louredo et al. 2022, Speight et al. 2017, Warnakulasuriya 2009). Os sítios mais acometidos em pacientes com câncer foram assoalho e língua, achados compatíveis com a literatura (Louredo et al. 2022, Wall 2013).

Quando consideramos a localização intra-oral a língua se constitui o sítio mais prevalente, autores chamam atenção para os aspectos clínicos determinantes em relação a malignização das lesões pré-malignas, e um dos fatores de risco relatados é que lesões localizadas em assoalho e borda lateral de língua tem maior risco de transformação maligna (Ranganathan e Kavitha, 2019; Waal, 2013). Estes resultados corroboram com os dados apresentados na tabela 3, onde as lesões localizadas em assoalho constituem-se como um fator de risco para câncer, (OR 10,156; $p = 0.0028$).

A avaliação histopatológica para displasia epitelial é considerada o padrão-ouro atual para prever a transformação maligna de lesões orais com potencial de malignidade (LOPM), presença de displasia epitelial é um indicador do potencial de transformação dessas lesões (Warnakulasuriya et al. 2021). O estudo de marcadores biológicos podem ser úteis neste processo, evidenciando o padrão de expressão como na presente pesquisa, onde os objetos de estudo foram proteínas reguladores do ciclo celular, MCM2, geminina e BubR1.

No geral, encontramos uma tendência de expressão crescente de todos os marcadores durante a etapa da carcinogênese oral, tanto nas displasias quanto nos carcinomas. As proteínas BubR1, MCM2, geminina e ki-67 apresentaram menor expressão nas displasias, mas sua expressão aumentou na presença de carcinomas, com relações estatisticamente significantes (Tabela 4).

O padrão de expressão de BubR1 em lesões malignas diferiu de lesões com potencial de malignização, (Tabela 6) e está de acordo com diferentes estudos, onde houve um aumento da imunexpressão de BubR1, o que sugere que a desregulamentação do ponto de checagem do fuso mitótico é um evento precoce e importante na pré-malignidade (Monteiro et al. 2022, Sravya et al. 2016, Teixeira et al. 2015, Hsieh et al. 2010). Autores afirmam que a superexpressão da proteína

BUBR1 foi observada não apenas em doenças potencialmente malignas, mas também em carcinomas orais e postulam que essa superexpressão está associada à amplificação do centrossomo e, sugerem que a proteína BUBR1 é um dos fatores contribuintes envolvidos na patogênese do carcinoma epidermóide (Monteiro et al. 2022, Hsieh et al. 2010).

A imunocoloração de BubR1 foi encontrada tanto núcleo quanto citoplasma, reportado também por outros estudos (Monteiro et al. 2022, Chou 2015, Hsieh et al. 2010). Segundo Chou et al., em comparação com o papel de guarda no *checkpoint* do processo mitótico em células normais, onde há acúmulo dessas proteína ao redor do núcleo, os autores sugerem que o acúmulo citosólico de BubR1 pode estar mais provavelmente associado à progressão da carcinogênese do carcinoma epidermóide oral (Chou et al. 2015).

A entrada anormal no ciclo celular é umas características presentes nas displasias epiteliais e lesões malignas, as proteínas-chave do complexo de pré-replicação, as proteínas de manutenção do minicromossomo (Mcm2-7), são marcadores sensíveis e específicos de células em ciclo (Scott et al. 2006). Nos carcinomas orais os índices de LI de MCM2 foram maiores relação a displasia, sugerindo a aplicação deste marcador na progressão de lesões com potencial de malignidade.

Estudos apontam o papel de Mcm2 na via de progressão da carcinogênese, em mucosa oral normal para displasia e posterior carcinoma (Menaka et al. 2022, Zakaria et al. 2016, RAZAVI et al. 2015, Torres–Rendon et al. 2009, Scott et al. 2006, Kodani et al. 2002).

Torres-Rendon et al. sugerem que células que apresentam expressam por Mcm2 estão na fase de transição G0–G1 e as que expressam geminina e Ki67 estão realmente no ciclo celular. Segundo os autores, em contraste com a mucosa oral, os níveis de Mcm2, geminina e Ki67 foram elevados nas displasias epiteliais indicando uma constante reentrada no ciclo celular (Torres–Rendon et al. 2009). Scott et al. afirmam que a expressão desregulada das proteínas de pré-replicação pode caracterizar os estados de doença displásica e maligna (Scott et al. 2006). Para Kodani et al, o Mcm2 é um marcador confiável e útil para avaliar o crescimento de populações de células normais e neoplásicas em fases diferentes além de G0 e a fase mitótica, bem como prognóstico do paciente (Kodani et al. 2002).

A análise de imunocoloração de geminina, de acordo com sítios e progressão de malignidade entre as lesões, revelou correlações estatisticamente significativas em qualquer uma das variáveis estudadas, resultados semelhantes aos observados no presente estudo foram relatados anteriormente (Pereira et al. 2016, Torres–Rendon et al. 2009). Segundo Scott et al. a geminina está presente apenas nos estágios posteriores do ciclo celular e fornece uma indicação da “taxa” do ciclo celular (Scott et al. 2006).

Tamura et al. especulam que o LI para geminina pode refletir tumores em proliferação na fase S-G2-M, e encontraram que as maiores taxas de LI para geminina estava associado a um melhor prognóstico (Tamura et al. 2010). Em outro estudo, autores presumem que a geminina possa ser um marcador valioso para estimar a agressividade do tumor e o resultado clínico em carcinomas de glândulas salivares (Vargas et al. 2008). Por outro lado, níveis de expressão de geminina estavam significativamente associados a um prognóstico ruim e metástases à distância em pacientes com câncer de mama (Kushwaha et al. 2016).

O índices de LI para carcinomas foram maiores para BubR1 marcação citoplasmática e Mcm2, seguidos de BubR1 nuclear, Ki67 e geminina tanto para as displasias quanto para carcinomas. Assim, as diferenças nos Lis das moléculas podem refletir os diferentes modos de expressão, devido à fase do ciclo celular (Tamura et al. 2010).

A análise combinada dos índices entre os LI dos Mcm2 e Ki67, e geminina e Ki67 demonstraram uma correlação positiva estatisticamente significativa. Outros autores, observaram uma correlação linear positiva entre os Lis destes marcadores (Torres-Rendon et al. 2009, Scott et al. 2006). Pereira et al., em um estudo que analisou 44 casos de carcinomas em língua demonstraram uma fraca correlação positiva entre os índices Ki67-LI e Mcm-2-LI, e afirmam que apesar de diferentes funções, Mcm-2 pode ser usado como uma célula mais sensível marcador de proliferação do que Ki-67 (Pereira et al. 2016).

A quantificação feita no presente estudo focou não somente no diagnóstico histológico das lesões, mas também em sítios anatômicos, diferenciando-os em carcinomas de lábio e carcinomas orais, levando em consideração as diferenças teciduais e carcinogênese. Esta categorização é adotada pela Classificação Internacional de Doenças (CID-10), desenvolvida pela Organização Mundial da

Saúde (OMS) e classifica os carcinomas de cavidade oral e lábio de acordo com os subsítios anatômicos (Sobin, Gospodarowicz e Wittekind, 2010).

Uma expressão diminuída de Ki 67 foi observada nas lesões malignas em lábio. O sítio anatômico tem uma significativa relação com o prognóstico do paciente, Louredo et al. em seu estudo conclui que há diferenças em relação a sobrevida de 5 anos entre câncer de boca e câncer de lábio, onde o câncer de lábio possui melhores índices (Louredo et al. 2022). Além disso, Takkem e colaboradores afirmam que proteína nuclear Ki-67 é um marcador prognóstico e preditivo estabelecido para a avaliação de biópsias de pacientes com displasia epiteliais orais e carcinomas epidermóides (Takkem et al., 2018).

Um estudo avaliou a relação entre o sítio anatômico primário com o resultado do tratamento em pacientes com câncer de cavidade oral em estágios avançado, os quais foram tratados com cirurgia e radioterapia. O sítio anatômico teve uma relação significativa com o resultado da terapia (Sim et al., 2019)

Alguns estudos tem relatado que o aumento do risco para metástase linfonodal depende da localização do tumor primário, foi encontrado um maior risco de metástase linfonodal em pacientes com tumores em assoalho de boca e região anterior de língua do que em pacientes com tumores na região retromolar e gengiva (Villanueva-Alcojol, 2016).

Zeleftsky e colaboradores afirmam que infelizmente, muitas séries relatam os resultados da terapia pós-operatória para tumores de cavidade oral em geral sem subsítio específico, em seu estudo afirma que tumores em assoalho bucal e tumores de língua tem comportamentos biológicos distintos (Zeleftsky et al., 1990).

Além de levar em consideração os sítios anatômicos, nós especulamos que a análise combinada com a expressão de marcação pode ser um importante preditor para diagnóstico e tratamento das lesões com potencial de malignização e malignas.

Autores afirmam que as diferentes origens do tumor poderiam ter diferentes radiosensibilidades, este resultado é compatível com a questão dos diferentes comportamentos tumorais e resultados de tratamento de diferentes subsítios anatômicos (Lin et al., 2010).

Estudos relataram que as células na fase G2 ou M eram mais radiosensíveis, e quase todas as células na fase S eram mais quimiossensíveis,

de modo que as células positivas para geminina são mais sensíveis a radioquimioterapia do que as células negativas para geminina (Tamura et al. 2010).

A diferença de expressões das proteínas estudadas em lesões com potencial de malignização e câncer sugerem que essas proteínas podem ser consideradas como alvos para terapias moleculares direcionadas contra a gênese do câncer, tais achados requerem confirmação com estudos adicionais.

A expressão e principalmente a crescente expressão desses marcadores ao longo da história natural, principalmente em estágios avançados de lesões com potencial de malignização, sugere que essas proteínas podem ser consideradas alvos para terapias moleculares direcionadas contra a gênese do câncer. Estudos recentes, tiveram como alvo a proteína BubR1 e outras do ponto de verificação de checagem para testar novas abordagens terapêuticas in vitro ou de forma adjuvante de drogas quimioterápicas foi relatado que uma redução nos níveis de BubR1 induz um aumento na sensibilidade das células tumorais a doses clinicamente relevantes de paclitaxel, resultante de graves defeitos de segregação cromossômica (Monteiro et al. 2021).

5. CONCLUSÕES

Os dados observados de Ki67 parecem indicar uma correlação entre o índice de proliferação e os sítios anatômicos estudados, o que poderia ser aplicável no entendimento para o prognóstico das lesões.

Além disso, as proteínas BubR1, MCM2 e geminina exibiram padrões de expressão crescente de displasias para carcinomas orais sugerindo seu potencial papel no desenvolvimento do câncer, o que indica a possibilidade destes biomarcadores serem úteis na predição de transformação na lesões com potencial de malignização.

6. REFERÊNCIAS

Algazi AP, Grandis JR. Head and neck cancer in 2016: A watershed year for improvements in treatment? *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;14(2):76–8.

Amit M, Yen TC, Liao CT, Chaturvedi P, Agarwal JP, Kowalski LP, et al. Improvement in survival of patients with oral cavity squamous cell carcinoma: An international collaborative study. *Cancer*. 2013;119(24):4242–8.

Chaudhari, N., Tupkari, J., Joy, T., & Ahire, M. (2016). Human MutL homolog 1 immunoexpression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: A prospective study in Indian population. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 20(3), 453–461. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.190948>

Chou CK, Wu CY, Chen JYF, Ng MC, Wang HMD, Chen JH, et al. BubR1 acts as a promoter in cellular motility of human oral squamous cancer cells through regulating MMP-2 and MMP-9. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):15104–17

de Lima, M. A. P., Cavalcante, R. B., da Silva, C. G. L., Nogueira, R. L. M., Macedo, G. E. C., de Galiza, L. E., Pinheiro, J. V., Maia Filho, P. H. B., Santos, S. F., & Rabenhorst, S. H. B. (2021). Evaluation of HPV and EBV in OSCC and the expression of p53, p16, E-cadherin, COX-2, MYC, and MLH1. *Oral Diseases*, February, 1–19. <https://doi.org/10.1111/odi.13814>

Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al, eds. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. International Agency for Research on Cancer; 2020.

Gupta N, Gupta R, Acharya AK, Patthi B, Goud V, Reddy S, Garg A, Singla A. Changing Trends in oral cancer – a global scenario. *Nepal J Epidemiol*. 2016;6(4); 613-619

Haruki, T., Shomori, K., Hamamoto, Y., Taniguchi, Y., Nakamura, H., & Ito, H. (2011). Geminin expression in small lung adenocarcinomas: Implication of prognostic significance. *Lung Cancer*, 71(3), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.06.013>

Hsieh PC, Chen YK, Tsai KB, Shieh TY, Chang YY, Chang JG, et al. Expression of BUBR1 in human oral potentially malignant disorders and squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;109(2):257–67.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). *INCA, 2020 MS / INCA / Estimativa de Câncer no Brasil, 2020*.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). *Diagnóstico precoce do câncer de boca / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : INCA, 2022. 137p. : il. ISBN 978-65-88517-20-8 (versão eletrônica)*

Kannan Ranganathan Loganathan Kavitha. (2019). Oral epithelial dysplasia: Classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 23(1), 19–27. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_13_19

Kerawala C, Roques T, Jeannon JP, Bisase B. Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol*. 2016 May;130(S2):S83-S89. doi: 10.1017/S0022215116000499. PMID: 27841120; PMCID: PMC4873943.

Li CC, Shen Z, Bavarian R, Yang F, Bhattacharya A. Oral Cancer: Genetics and the Role of Precision Medicine. *Dent Clin North Am*. 2018;62(1):29–46.

Lin, C. Y., Wang, H. M., Kang, C. J., Lee, L. Y., Huang, S. F., Fan, K. H., Chen, E. Y. C., Chen, I. H., Liao, C. T., & Chang, J. T. C. (2010). Primary tumor site as a predictor of treatment outcome for definitive radiotherapy of advanced-stage oral cavity cancers. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 78(4), 1011–1019. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.09.074>

Louredo BV, Vargas PA, Pérez-de-Oliveira ME, Lopes MA, Kowalski LP, Curado MP. Epidemiology and survival outcomes of lip, oral cavity, and oropharyngeal squamous cell carcinoma in a southeast Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2022 May 1;27 (3):e274-84.

MARTINEZ E. Z., L.-N. F. . P. B. D. B. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadernos de Saúde Coletiva*, Rio de Janeiro, 11, 2003. 7-31

Monteiro L, Silva P, Delgado L, Amaral B, Garcês F, Salazar F, Pacheco JJ, Lopes C, Bousbaa H, Warnakulasuriya S. Expression of spindle assembly checkpoint proteins BubR1 and Mad2 expression as potential biomarkers of malignant transformation of oral leukoplakia: an observational cohort study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2021 Nov 1;26(6):e719-e728.doi: 10.4317/medoral.24511. PMID: 34704983; PMCID: PMC8601638.

Menaka TR, Ravikumar SS, Dhivya K, Thilagavathi N, Dinakaran J, Kalaichelvan V. Immunohistochemical expression and evaluation of cyclin D1 and minichromosome maintenance 2 in oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2022 Jan-Mar;26(1):44-51. doi: 10.4103/jomfp.jomfp_446_21. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35571317; PMCID: PMC9106226.

Ng JH, Iyer NG, Tan MH, Edgren G . Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck*. 2017 Feb;39(2):297-304.

OSMER D.W., L. S. *Applied Logistic Regression*. 2. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2000. 156-164 p.

Pałasz, P.; Adamski, Ł.; Górska-Chrząstek, M.; Starzyńska, A.; Studniarek, M. Contemporary Diagnostic Imaging of Oral Squamous Cell Carcinoma – A Review of Literature. *Polish J Radiol*. 2017, 82:193–202.

Pallavi, N., Nalabolu, G. R. K., & Hiremath, S. K. S. (2018). Bcl-2 and c-Myc expression in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study to assess tumor progression. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 22(3), 325–331. https://doi.org/0.4103/jomfp.JOMFP_13_19

Pandey, M., Prakash, O., Santhi, W. S., Soumithran, C. S., & Pillai, R. M. (2008). Overexpression of COX-2 gene in oral cancer is independent of stage of disease and degree of differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37(4), 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2008.01.004>

PEREIRA, J. S.; BARROSO, K. M. A.; NONAKA, C. F. W.; PINTO, L. P. & DE SOUZA, L. B. Immunoexpression of cell proliferation markers in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Odontostomat.*, 10(3):513-520, 2016

Ren Z-H, Hu C-Y, He H-R, Li Y-J, Lyu J. Global and regional burdens of oral cancer from 1990 to 2017: Results from the global burden of disease study. *Cancer Communications*. 2020;40:81–92. <https://doi.org/10.1002/cac2.12009>

Rivera, César. Review Article Essentials of oral cancer *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(9):11884-11894

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours*: John Wiley & Sons; 2011

Rizzardi, C.; Torelli, L.; Barresi, E.; Schneider, M.; Canzonieri, V.; Biasotto, M.; di Lenarda, R.; Melato, M. Bubr1 expression in oral squamous cell carcinoma and its relationship to tumor stage and survival. *Head Neck* 2011, 33, 727–733.

Scott IS, Odell E, Chatrath P, Morris LS, Davies RJ, Vowler SL, et al . A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. *Br J Cancer* 2006;94:1170-5.

Speight, P. M., Epstein, J., Kujan, O., Lingen, M. W., Nagao, T., Ranganathan, K., & Vargas, P. (2017). Screening for oral cancer—a perspective from the Global Oral Cancer Forum. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 123(6), 680–687. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2016.08.021>

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours*: John Wiley & Sons; 2011.

Sun Y, Cheng Z, Liu S. MCM2 in human cancer: functions, mechanisms, and clinical significance. *Mol Med*. 2022 Oct 27;28(1):128. doi: 10.1186/s10020-022-00555-9. PMID: 36303105; PMCID: PMC9615236.

Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. 2018 Jun;127(2):175-186. doi: 10.1007/s00412-018-0659-8. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29322240; PMCID: PMC5945335.

Tamura, T., Shomori, K., Haruki, T., Nosaka, K., Hamamoto, Y., Shiomi, T., Ryoike, K., & Ito, H. (2010). Minichromosome maintenance-7 and geminin are reliable

prognostic markers in patients with oral squamous cell carcinoma: Immunohistochemical study. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 39(4), 328–334. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00861.x>

Teixeira JH, Silva PMA, Faria J, Ferreira I, Duarte P, Delgado ML, et al. Clinicopathologic significance of BubR1 and Mad2 overexpression in oral cancer. *Oral Dis*. 2015;21(6):713

Torres-Rendon, A., Roy, S., Craig, G. T., & Speight, P. M. (2009). Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *British Journal of Cancer*, 100(7), 1128–1134. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604967>

P.A. Vargas, Y. Cheng, A.W. Barrett, G.T. Craig, P.M. Speight, Expression of MCM-2, Ki-67 and geminin in benign and malignant salivary gland tumours, *J. Oral Pathol. Med.* 37 (2008) 309e318, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00631.x>

Pereira, J. S.; Barroso, K. M. A.; Nonaka, C. F. W.; Pinto, L. P. & De Souza, L. B. Inmunoexpresiones de marcadores de proliferacion celular en carcinoma de celulas escamosas oral. *Int. J. Odontostomat.*, 10(3):513-520, 2016.

Villanueva-Alcojol, L. (2016). Contralateral neck dissection in oral squamous cell carcinoma: when it should be done? *Plastic and Aesthetic Research*, 3(6), 181. <https://doi.org/10.20517/2347-9264.2016.14>

Verma, G., Vishnoi, K., Tyagi, A., Jadli, M., Singh, T., Goel, A., Sharma, A., Agarwal, K., Prasad, S. C., Pandey, D., Sharma, S., Mehrotra, R., Singh, S. M., & Bharti, A. C. (2017). Characterization of key transcription factors as molecular signatures of HPV-positive and HPV-negative oral cancers. *Cancer Medicine*, 6(3), 591–604. <https://doi.org/10.1002/cam4.983>

Zeleftsky MJ, Harrison LB, Fass DE, et al. Postoperative radio-therapy for oral cavity cancers: Impact of anatomic subsite on treatment outcome. *Head Neck* 1990;12:470–475. Sim, Y. C., Hwang, J. H., & Ahn, K. M. (2019). Overall and disease-specific survival outcomes following primary surgery for oral squamous cell carcinoma: Analysis of consecutive 67 patients. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 45(2), 83–90. <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2019.45.2.83>

Waal, I. V. D Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; Some considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; 18(1):33-7.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009; 45: 309–316

Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR, Lodi G, Mello FW, Monteiro L, Ogden GR, Sloan P, Johnson NW. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis*. 2021 Nov;27(8):1862-1880. doi: 10.1111/odi.13704. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33128420.