

SILVIA PIERRE IRAZUSTA T. 1. 7

**ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CÉLULAR PELO
ANTICORPO ANTI-PCNA E TÉCNICA AgNOR EM
BIÓPSIAS ENSOSCÓPICAS DA MUCOSA GÁSTRICA.**

Orietadora: Profa. Dra. Miriam A.S. Trevisan *Miriam A.S. Trevisan*

Co-orientador: Prof. Dr. José Vassallo *José Vassallo*

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA**

UNIDADE	25
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	In 1e
V. Ex.	
TIPO DO B.	23153
PROC.	286/94
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/12/94
N.º CPD	

CM-00064280-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Irazusta, Silvia Pierre

Irie Estudo da proliferação celular pelo anticorpo anti-PCNA e técnica AgNOR em biópsias endoscópicas da mucosa gástrica / Silvia Pierre Irazusta. - - Campinas, SP : [s.n.], 1994.

Orientadores : Miriam Aparecida da Silva Trevisan, Jose Vassallo.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade Ciências Médicas

1. Celulas - Proliferação. 2. Região organizadora de nucleolos. 3. Mucosa gástrica. I. Trevisan, Miriam Aparecida da Silva. II. Vassallo, Jose. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

À Isadora, minha filha.

**"Um talento forma-se no silêncio, um
caráter, na luta do mundo".**

Johann Wolfgang von Goethe

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, meu maior exemplo de vida, caráter e integridade. Obrigada pela sua presença, pelo apoio e incentivo incondicionais, não só neste, mas em todos os momentos da minha vida.

Ao Guillermo, meu companheiro, pela sua paciência e compreensão neste período tenso e de constantes ausências.

A Dra. Miriam A.S. Trevisan, pela orientação deste trabalho, e, sobretudo, pela confiança e respeito com que me acompanhou na execução desta tarefa. Aprender com sua conduta rigorosa e impecável foi, para mim, uma satisfação e um privilégio.

Ao Dr. José Vassallo, pela participação na idealização deste trabalho, mas, em particular, pelo incentivo, reconhecimento e pela amizade que tenho recebido nesses últimos cinco anos, quando passei a integrar seu grupo de trabalho.

Ao Dr. Marcelo Alvarenga, pela oportunidade que me proporcionou e pelo respeito com que trata os trabalhos científicos que realizamos em seu laboratório.

Aos Profs. Luis Alberto Magna e Konradin Metze, e ao Sr. José Bianchini Neto, pela inestimável contribuição na análise estatística do trabalho.

A Glauce A. Pinto, que me proporcionou a oportunidade de retornar a vida acadêmica, a Wanda Wreck, a Marisa Matsura, ao Paulo de Tarso Rocha, meus colegas de laboratório, sempre atenciosos e colaborativos, e, de modo especial, a Rosemeire F. Dionisio, que fez toda a digitação da tese.

A Tatiane Cristine Dunder, nossa estagiária, que muito cuidadosamente confeccionou os cortes histológicos.

A Christiane Pienna Soares, pela impagável amizade e pela dedicação na confecção de todos os slides da apresentação.

A Edi Lucia Sartorato, pela paciência e tempo despendidos nas ilustrações da tese.

A Dra. Denise Engelbrecht Wittmann pela gentil colaboração na parte de computação.

A Dra. Cecília A. F. Scanhoela, pelo prestativo auxílio na elaboração das tabelas.

A todos os meus colegas do curso de Pós-graduação, pelo companheirismo sincero em todos os momentos, em especial, à Dra. Terezinha Marques.

A Comissão de Pós-graduação do Depto. de Anatomia Patológica.

RESUMO

O antígeno de proliferação celular (PCNA) é uma proteína de 36kDa, auxiliar da DNA polimerase delta e sua expressão está relacionada com o estado proliferativo das células. Métodos imuno-histoquímicos com o anticorpo anti-PCNA, PC10, têm vantagens, comparados com outras técnicas, particularmente, pela manutenção da arquitetura do tecido e simplicidade da metodologia.

As regiões organizadoras de nucléolo (NORs) têm sido identificadas por meio de uma técnica argêntica (AgNOR), em cortes de material fixado e incluído em parafina. O método revela as NORs como pontos negros no núcleo das células, decorrente da argirofilia das proteínas associadas às NORs. O número de AgNORs têm sido correlacionado à proliferação celular.

Tivemos por objetivos verificar se a quantificação desses marcadores de proliferação teria aplicação diagnóstica em biópsias gástricas endoscópicas e, também, investigar a existência de uma correlação entre o número de AgNORs interfásicas e o índice de PC10 na mucosa gástrica normal, regenerativa, displásica e neoplásica.

Em 57 biópsias endoscópicas da região pilórica foram determinados os índices de PC10 e o número de AgNORs por núcleo. Os resultados mostraram que, para ambos os marcadores, as determinações foram significativamente maiores na mucosa neoplásica em relação às demais condições ($p < 0,001$). Apesar das diferenças, a distinção entre os grupos, apenas pela quantificação, não foi possível devido à considerável sobreposição de valores.

A análise de regressão mostrou que há uma correlação positiva e significativa entre os métodos, somente para os casos normais e inflamatórios, nas outras situações, onde há perda gradual da diferenciação, esta correlação é inexistente. Esses achados são provavelmente, decorrentes do fato dessas

proteínas representarem diferentes componentes e fases do ciclo celular. Além disso, nas condições malignas, onde os mecanismos regulatórios normais da divisão celular estão comprometidos, a expressão do antígeno de proliferação pode estar desregulada pela influência da secreção autócrina de fatores de crescimento, bem como, pela presença de oncogenes.

Com relação às AgNORs, muito embora suas contagens tenham sido de pouco valor diagnóstico, a sua característica irregularidade na apresentação as definiram como marcadores morfológicos de malignidade.

SUMMARY

The proliferation cell nuclear antigen (PCNA) is a 36 Kda protein, acting as a synergist of the delta-DNA-polymerase. As compared to other methods to study cell proliferation, its detection by immuno-histochemistry using a monoclonal antibody to PCNA, PC10, has the advantage of being simple and preserves tissue morphology as well. It can be performed in formalin-fixed, paraffin embedded tissues, allowing studies in archival material. Such advantages are shared with the detection of nucleolar organizing regions by a silver impregnation technique (AgNOR). The number of black spots, which reflect the silver affinity of proteins related to NORs, has been correlated to cell proliferation.

The aim of this retrospective study is to verify to which extent the rate of PC10 - positive - cells and quantification of AgNORs can be helpful in identifying normal, inflammatory/regenerative, dysplastic and neoplastic gastric mucosa.

The results obtained by both methods in 57 endoscopic pyloric biopsies reveal significant higher counts in the neoplastic group, as compared to other conditions ($p < 0,001$). Nevertheless, distinction of each group by quantification of PC10 and AgNORs alone is not possible, due to overlap of values. This represents a handicap of both methods for diagnosis in individual cases.

Regression analysis shows a statistically significant correlation between both methods only in the normal and inflammatory/regenerative groups. For the other conditions there is no statistical significance, possibly because proteins detected by both methods are diversely expressed and regulated during the cell cycle.

Although AgNOR quantification is of limited diagnostic value, irregular shaped spots can be considered reliable markers for malignancy.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
1. MATERIAL.....	14
2. MÉTODOS.....	14
2.2. TÉCNICA AGNOR.....	19
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
RESULTADOS.....	22
DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

INTRODUÇÃO

A proliferação celular é um dos eventos mais importantes dentro dos processos biológicos e não há dúvida quanto à relevância de se avaliar a atividade proliferativa no estudo de muitos processos patológicos (HALL & LEVINSON, 1990). Independentemente de suas causas primárias, as neoplasias apresentam distúrbios no controle do ciclo celular, que levam ao aumento da divisão celular e à formação de massas tumorais (RABENHORST, BURINI, SCHMITT, 1993).

Até recentemente, pouco se conhecia sobre os eventos biológicos, bioquímicos e moleculares que precedem ou regulam a mitose, de forma que as taxas de proliferação celular eram estimadas pela simples contagem de figuras mitóticas. Essa contagem, no entanto, só é possível na fase do ciclo celular que corresponde à mitose propriamente dita. Células em intérfase, que corresponde ao período mais longo do ciclo celular não são consideradas neste tipo de contagem. A intérfase é um período de intensas atividades relacionadas com a proliferação e está dividida nas fases G1, S, G2 e Go, que são caracterizadas por mudanças no conteúdo de DNA e por alterações bioquímicas e fisiológicas (PARDEE, 1989).

Quando as células encontram-se fora do ciclo proliferativo na fase definida como Go, possuem conteúdo 2C de DNA ("C" corresponde ao conteúdo de DNA e difere de "n" que corresponde ao número de cromossomos da espécie, o qual freqüentemente está alterado nas neoplasias) e apresentam padrão cromatínico compatível com seu estado fisiológico, efetuando funções de acordo com o grau de diferenciação que atingem. Dessa maneira, Go emerge como um estágio onde a célula pode "estacionar" depois da mitose e do qual pode sair, reentrando no ciclo proliferativo frente a estímulos apropriados (MORRIS & MATHEUS, 1989).

O início do ciclo celular corresponde à fase G1, onde ocorre produção de RNA. Este é o período que apesar de ser o mais variável, é também o mais longo, caracterizado por um aumento de síntese proteica e do tamanho da célula. O conteúdo de DNA é o mesmo da fase G₀ e é chamada fase pré-sintética. O período seguinte corresponde à fase S, onde ocorre síntese e duplicação do conteúdo de DNA, que passa para 4C. Essa fase é quase sempre constante, mesmo em células neoplásicas (LEHENERT & DESIHENER, 1986 - apud FILIPE et al, 1993).

Nas fases que se seguem, G2 e mitose, as células se caracterizam por ter o dobro do conteúdo de DNA (4C). Ambas as fases normalmente apresentam maior duração em células tumorais (BRAVO & CELIS, 1980).

Como resultado da utilização de várias técnicas bioquímicas e de genética molecular, observou-se que o controle da proliferação celular foi conservado através da evolução, por meio de mecanismos moduladores similares, com o reconhecimento de genes regulatórios que parecem controlar a divisão celular (DUNPHY & NEWPORT, 1988). Essas descobertas permitiram que as células proliferantes pudessem ser detectadas mesmo sem a identificação de figuras mitóticas.

Inúmeros são os métodos já desenvolvidos com o objetivo de estudar a proliferação celular. A contagem do número de mitoses, já referida, é um desses métodos porém, apresenta alguns problemas como indicador de proliferação. Sua identificação pode ser difícil e por isso é essencial a observação microscópica criteriosa, isto é, somente aquelas células inequivocamente em mitose são aceitas para contagem. Além disso, o processo de divisão em material fixado inadequadamente irá se completar, enquanto algumas poucas e novas mitoses serão iniciadas, levando a valores subestimados do seu verdadeiro número (GRAEM & HELWEG-LARSEN, 1979).

A introdução da timidina tritiada e o desenvolvimento de autoradiografia de alta resolução, durante os anos cinquenta, levaram ao uso desse marcador como padrão ouro no estudo de cinética celular. A técnica, no entanto, requer células viáveis para incorporação da timidina ao DNA na fase S do ciclo. Consequentemente, requer a administração "in vivo" da timidina radioativa, o que raras vezes pode se justificar na prática clínica. De forma alternativa, material de biópsia pode ser incubado "in vitro" com a timidina tritiada, antes de sua fixação, isto é, em material a fresco. Em qualquer dessas situações existe crítica quanto aos riscos do uso de material radioativo na prática histológica de rotina (MALAISE, CHAUDAUDRA, TUBIANA, 1973). A síntese de DNA também pode ser medida pela incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), análogo da timidina que pode ser detectada por anticorpos específicos (WILSON et al, 1988). Embora não utilize material radioativo, suas desvantagens são as mesmas da técnica anterior, particularmente a necessidade de administração "in vivo" ou incubação "in vitro" do material a fresco.

A citometria de fluxo empregada para estimar o conteúdo de DNA baseia-se na capacidade de certos corantes se ligarem estequiometricamente ao ácido desoxirribonucleico, o que permite determinar de maneira matemática a sua quantidade no núcleo da célula. O acesso às variáveis cinéticas é complicado pela presença de aneuploidia (FRIEDLANDER, HEDLEY, TAYLOR, 1984), entretanto, com análises matemáticas adequadas, a fração de fase S pode ser determinada em muitos casos (CAMPLEJOHN, MACARTNEY, MORRIS, 1989). É de particular interesse a possibilidade da aplicação da citometria de fluxo a material fixado em formol, além de material a fresco (MELLIN, 1990). Suas desvantagens se devem ao elevado custo do equipamento requerido, à necessidade de destruição do tecido, tal que a relação espacial das subpopulações celulares é perdida, além da eventual inclusão de células não-neoplásicas na amostra (HALL & LEVINSON, 1990). A citometria digital contorna esses problemas, permitindo estudo no tecido sem alterar a sua arquitetura, além de permitir a seleção das células que se deseja estudar.

Os métodos imuno-histoquímicos com anticorpos específicos representam outra ferramenta na determinação da atividade proliferativa das células. Têm como vantagem adicional a demonstração dos antígenos relacionados ao ciclo celular, possibilitando sua orientação topográfica e arquitetural, bem como a fenotipagem das células proliferativas por meio de dupla marcação (HALL & LEVINSON, 1990; GARCIA, COLTRERA, GOWN, 1989). O anticorpo até hoje melhor estudado para o reconhecimento de células em proliferação é o "Ki-67" (assim designado por ter sido produzido na universidade de Kiel, Alemanha), o qual identifica um antígeno nuclear ainda mal caracterizado (GERDES et al, 1983). Recentemente foi identificado como produto de uma sequência gênica codificadora de uma proteína não-histona de massa molecular de 345-395 KDa (GERDES et al, 1991) e é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em Go (SASAKI et al, 1987). Muitos estudos demonstraram boa correlação entre imuno-reatividade para Ki-67 e outros métodos, tais como a marcação pela timidina radioativa, a incorporação de bromodeoxiuridina e a citometria de fluxo (SCHWARTING et al, 1986; KAMEL et al, 1989; SASAKI et al, 1987). A maior limitação de seu uso é a necessidade de se trabalhar com material de biópsia a fresco ou de congelação. Isto porque este antígeno é demasiado sensível a fixadores histológicos (QUINN & WRIGHT, 1990). A imunocoloração pelo Ki-67 parece ser uma informação útil quanto ao prognóstico de linfomas (SCHRAPE, JONES, WRIGHT, 1987; HALL et al, 1988), carcinomas colo-retais (SHEPHERD, RICHMAN, ENGLAND, 1988) e melanomas malignos (KAUDEWITZ et al, 1989).

Em 1978, MIYACHI, FRITZLER, TAM observaram que autoanticorpos no soro de pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico, reconheciam um antígeno nuclear distribuído em células proliferantes que, em decorrência disso, foi designado como PCNA (do inglês, "proliferating cell nuclear antigen"). Este antígeno é uma proteína nuclear ácida de 36KDa, não-histona, que funciona como fator auxiliar da DNA polimerase delta e é absolutamente necessária à síntese de DNA (BRAVO & McDONALD-BRAVO, 1985). Estudos de imunofluo-

rescência mostraram a existência de duas frações de PCNA durante a fase S do ciclo celular, uma nucleoplásmica, em células quiescentes, que é facilmente extraída por detergentes, e outra que é resistente à extração por solventes orgânicos e está associada a estruturas nucleares específicas, os complexos de replicons (BRAVO & McDONALD-BRAVO, 1987). Este fato demonstra que o PCNA está intimamente associado aos sítios de replicação do DNA e confirma seu papel na síntese de ácidos nucleicos (BRAVO & McDONALD-BRAVO, 1985). Esta afirmação é comprovada pelo uso de oligonúcleotídeos "anti-sense" os quais reduzem os níveis de PCNA e estão, ao mesmo tempo, associados com inibição da síntese de DNA (JASKULSKI et al, 1988). Além da síntese, admite-se que o PCNA esteja envolvido também no mecanismo de reparo do DNA (SHIVJI, KENNY, WOOD, 1992). Parece que a ocorrência dos fenômenos de síntese e reparo do DNA depende da associação entre PCNA, fator acessório da DNA polimerase delta, e as ciclinas D1 e D3. Estas últimas também deveriam associar-se com as unidades catalíticas das proteínas-quinases dependentes de ciclinas, "cdKs2", 4 e 5" (XIONG, ZHANG, BEACH, 1992). Tal associação é importante, já que a detecção da expressão destas ciclinas é recente e passou a ser considerada evento frequente e relevante na biologia dos tumores. Dentre estes, podemos citar os tumores de mama onde foram mais estudadas (BUCKLEY et al, 1993), muito embora os mecanismos envolvidos neste processo não estejam totalmente esclarecidos. Estudos realizados em diferentes linhagens celulares indicam uma provável participação da ciclina no controle do crescimento tumoral (MOTOKURA et al, 1991; WITHERS et al, 1991; LAMMIE et al, 1991). O papel inibitório ou ativador da ciclina D em relação ao PCNA ainda não foi elucidado, mas ela é importante na regulação do ciclo celular (XIONG et al, 1992).

O gene codificador da proteína do PCNA foi clonado a partir de considerável número de espécies evolutivamente diversas (CELIS et al, 1984). A conservação evolutiva do PCNA é consistente com o papel essencial do produto desse gene na replicação do DNA em eucariotos (McCORMICK & HALL, 1992).

A expressão do antígeno de proliferação é regulada a nível transcricional e pós-transcricional (CHANG et al, 1990). A indução do mRNA dessa proteína por fatores de crescimento é bem documentada (HALL et al, 1990; NASIN et al, 1992). Esta regulação parece ser diferente em células quiescentes em relação àquelas continuamente ciclantes. No último caso, há pouca variação nos níveis de proteína e RNA durante o ciclo (MORRIS & MATHEUS, 1989).

A expressão do PCNA é elevada ao máximo nas fases G1 tardia e S (fig.1), mas aparece, eventualmente nas células em G₀, talvez devido à estabilidade do mRNA / PCNA, como consequência, o mRNA dessa proteína pode ser estabilizado, e ser traduzido com maior eficiência na presença de certos fatores (HALL et al, 1990). Ainda mais relevante é a participação de oncogenes, como a proteína p53, na regulação dos níveis desse mRNA. Acredita-se que alterações na expressão dos oncogenes em neoplasias pode levar a desregulação na expressão do PCNA (MERCER et al, 1991).

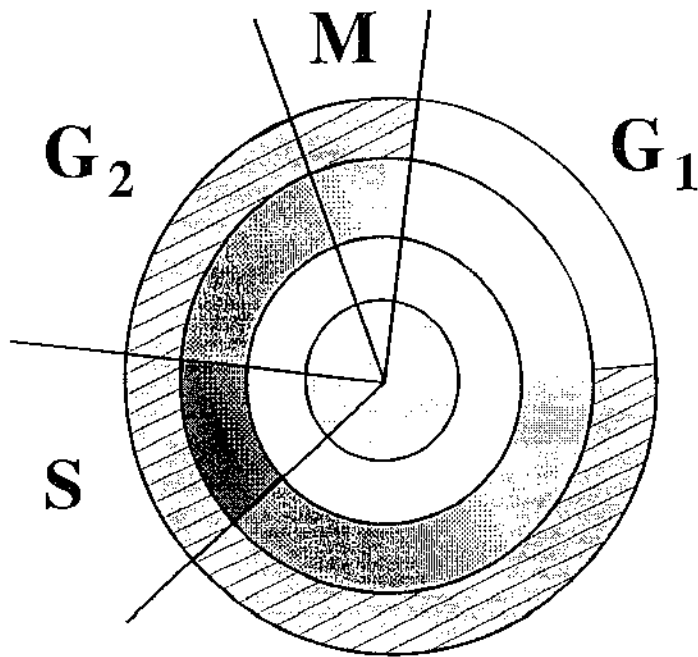


FIGURA 1 - Representação esquemática da expressão dos anticorpos Ki-67 e PC10 no ciclo celular.

Alguns anticorpos que reconhecem o antígeno de proliferação são disponíveis comercialmente, entre eles, o 19A2, 19F4 (TAKASAKI et al, 1990) e PC10 (WASEEN & LANE, 1990). Os epítomos reconhecidos por estes anticorpos parecem ser diferentes, além dos possíveis efeitos da fixação e processamento do tecido na detecção destes sítios (GARCIA et al, 1989).

Inserida no estudo da proliferação celular, encontra-se a técnica de impregnação pela prata, chamada "Ag-NOR", onde NOR, significa "núcleolar organizer regions" (UNDERWOOD & GIRI, 1988). As regiões organizadoras de nucléolo (NOR), representam alças de DNA, com genes para transcrição de RNA ribossômico, associadas a determinadas proteínas ácidas, cuja função não é inteiramente conhecida. As proteínas com propriedades argirofílicas estão provavelmente relacionadas à RNA polimerase I (WILLAIMS et al., 1982), ou outras proteínas como a "C23", também chamada nucleolina (OCHS & BUSH, 1984) ou a "B23" (LISCHWE et al., 1979). O exato papel destas proteínas permanece incerto, contudo, elas podem manter o DNA numa configuração "estendida" ou ter alguma atividade no controle da transcrição dos genes para o RNA ribossômico (FIELD, FITZGERALD, SINN, 1984).

As NORs situam-se em cinco cromossomos acrocêntricos, 13, 14, 15, 21 e 22, sendo, por isto, inferido que sua demonstração e/ou quantificação refletiria a ploidia das células num determinado tecido. Entretanto, comparando-se com a imunocoloração por Ki-67 (HALL et al, 1988), e dados obtidos por citometria de fluxo (CROCKER, McCARTNEY, SMITH, 1988), concluiu-se que as NORs são mais diretamente associadas com duplicação celular, do que com a ploidia (DERENZINI et al., 1989; TRERÉ, PESSION, DERENZINI, 1989). Desta forma, podem fornecer informações úteis quanto à estrutura do nucléolo e atividade nucleolar em condições normais, hiperplásicas e neoplásicas. A argirofilia dessas proteínas atua como marcador indireto de DNA ribossômico. Foi sugerido que o número de NORs interfásicas pode estar relacionado ao "turn-over" celular, especialmente em linfomas não-Hodgkin (JAN-MOHAMED et al,

1989). Um alto índice de correlação entre o número de AgNORs e fração de fase S medida, por citometria de fluxo, foi encontrada no estudo de linfomas não-Hodgkin (CROCKER et al, 1988).

A quantificação das NORs é aceita como de valor prognóstico em numerosas condições, incluindo tumores infantis (EGAN et al, 1987), lesões melanocíticas (CROCKER & SKILBECK, 1987), pulmonares (CROCKER, AYRES, McGOVERN, 1987), cérvico-uterinas (ROWLANDS, 1988; ALLEN & GALLIMORE, 1992) e do trato gastrointestinal (KAKEJI et al, 1991). Uma correlação positiva entre a contagem de AgNORs e sobrevida foi descrita por CANEPA et al (1993) e SMITH & CROCKER (1988) em tumores de mama.

Estudos anteriores foram ambíguos quanto aos resultados numa variedade de tipos histológicos e graus de tumores. Nos carcinomas de colo uterino, por exemplo, nenhuma associação foi encontrada entre grau de tumor e contagem de AgNORs (NEWBOLD et al, 1989), mas foi útil na diferenciação entre hiperplasia microglandular e adenocarcinoma cérvico-uterino (ALLEN & GALLIMORE, 1992). Em patologia mamária, os resultados foram variáveis (SMITH & CROCKER, 1988; GIRI et al, 1989). Estas discrepâncias podem ser, em parte, atribuídas ao problema de sobreposição dos valores entre grupos normal, hiperplásico e neoplásico, fenômeno frequente nas contagens de AgNORs (SUAREZ et al, 1989; CAIRNS et al, 1989; HANSEN et al, 1992; HANSEN & OSTERGARD, 1990), ou à heterogeneidade destes tumores, onde os genes de RNA ribossômico podem responder de forma variável à regulação hormonal (De CAPOA et al, 1985). Em alguns tecidos, como a tireóide, foi observado que as AgNORs são de pouco valor diagnóstico (NAIRN, CROCKER, McGOVERN, 1988; RIGAUD & BOGOMOLETZ, 1991).

Deve-se lembrar que a coloração pela prata demonstra as proteínas associadas às NORs, e não os cistrons de RNA propriamente ditos. Estas proteínas se dispersam durante a divisão celular e podem se reagregar ou desestabilizar lentamente. A sua determinação, pela contagem das AgNORs, entretanto, daria

uma estimativa do nível de proliferação do tecido como um todo (DARNTON, GRAY, CROCKER, 1992).

A literatura dispõe de vários estudos em mucosa gástrica, sobre o comportamento das proteínas relacionadas com proliferação celular (FILIPE et al, 1993, JAIN et al, 1991, FALK et al, 1990; De ROSA et al, 1992; YONEMURA et al, 1993), ou com as regiões organizadoras de nucléolo (SUAREZ et al, 1989; ROSA, METHA, FILIPE, 1990a; ROSA, METHA, FILIPE, 1990b; KAKEJI et al, 1991; SPATZ et al, 1990). GRAY et al (1992) realizaram um estudo experimental, pela aplicação simultânea destas técnicas.

Grande parte das biópsias endoscópicas da mucosa gástrica mostram alterações inflamatórias que podem ser de difícil interpretação ao microscópio. A importância do diagnóstico de lesões malignas traz como consequência o interesse no reconhecimento das alterações potencialmente malignas do estômago, para as quais o termo displasia é frequentemente usado, embora seja questionado se essas alterações representam de fato, uma lesão precursora do carcinoma gástrico. Isto porque, esta lesão pode persistir por longo tempo sem progressão e não é tão frequente quanto o carcinoma (FENOGLIO-PRISER et al, 1989). Acredita-se, que a metaplasia gástrica tipo intestinal, a displasia e o carcinoma se originam concomitantemente, sem um precursor obrigatório. É frequente a dificuldade de se fazer a distinção entre alterações hiperplásicas ou reacionais, carcinoma gástrico e displasia de alto grau, especialmente em pequenos espécimes.

Anormalidades celulares, como a hiper Cromasia nuclear, a anisocariose, a hipertrofia nucleolar e elevada relação núcleo/citoplasma são características reconhecidas das displasias gástricas. A displasia gástrica severa mostra ainda, estratificação nuclear, presença de inúmeras figuras mitóticas, evidência de polaridade desordenada, desaparecimento das células de Paneth e arranjo lado a lado das glândulas. A displasia de alto grau pode evoluir para carcinoma mas, sua progressão é lenta, levando vários meses. Em 25 a 35% dos casos permanece estável ou regride. (FENOGLIO-PRISER et al, 1989). Chega-se ao diagnóstico de

carcinoma quando as células displásicas rompem a membrana basal e atingem a lâmina própria, porém em algumas circunstâncias é impossível a distinção entre graus severos de displasia e carcinomas. Deve-se evitar o termo carcinoma "in situ", já que em epitélios glandulares é difícil avaliar o local de invasão, que, de qualquer forma, ainda estaria dentro da própria mucosa (carcinoma intramucoso).

SUAREZ et al (1989) compararam a contagem de AgNORs numa série de mucosas gástricas normais, regenerativas e neoplásicas malignas. Esperavam que células epiteliais malignas apresentassem maior contagem por núcleo que aquelas de natureza benigna. Seus resultados mostraram que, por meio da quantificação de AgNORs, foi possível separar os casos em três grandes grupos, normal, regenerativo e neoplásico, ainda que alguma sobreposição nos valores tenha sido observada.

Acredita-se, em geral, que a maior atividade proliferativa esteja associada a piores prognóstico e sobrevida (BAUER et al, 1986). Os estudos de YONEMURA et al (1991a,b) reforçam esta teoria, já que, utilizando a técnica imuno-histoquímica com anticorpo Ki-67 em biópsias endoscópicas de carcinomas gástricos, observaram que elevados valores deste marcador correlacionam-se com pior prognóstico, ressaltando o método como de grande valor prognóstico no câncer de estômago. Estes mesmos pesquisadores também avaliaram a expressão do antígeno de proliferação no câncer gástrico, por meio da marcação com o clone p105 do anticorpo monoclonal anti-PCNA, em material histológico a fresco e incluído em parafina (YONEMURA et al, 1991b). Os índices de marcação com p105 estavam em relação direta com os índices de Ki-67. Não houve, todavia, correlação do p105 com o tipo histológico e estágio clínico. Ainda em neoplasias gástricas, JAIN et al. (1991) avaliaram o valor prognóstico do anticorpo anti-PCNA, clone PC10, em material de rotina. O fato de poder-se aplicar este anticorpo a material incluído em parafina já lhe confere uma vantagem adicional sobre o Ki-67, uma vez que o antígeno reconhecido é resistente à fixação. Não foi possível, entretanto, correlacionar o índice de PCNA com o grau histológico e,

tampouco com a profundidade de invasão ou presença de metástase em linfonodos. Muito embora os pacientes com altos índices de PCNA apresentassem prognóstico ligeiramente pior, a diferença não teve significância estatística. Estes dados foram corroborados pelos trabalhos de FALK et al. (1990). Com exceção de alguns poucos autores (SUAREZ et al, 1989; FILIPE et al, 1993; ROSA et al, 1990a), há uma tendência em se procurar relacionar a proliferação celular, por meio destes marcadores, somente a condições de malignidade. A comparação destes métodos na mucosa gástrica não está descrita na literatura.

OBJETIVOS:

- I - Avaliação crítica dos métodos imuno-histoquímico e AgNOR, e suas possíveis aplicações como adjuntos no diagnóstico de biópsias gástricas endoscópicas.
- II - Verificar uma possível correlação entre os dois métodos como marcadores de proliferação na mucosa gástrica normal, inflamatória, displásica e neoplásica.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MATERIAL:

Através da revisão dos arquivos do Gastrocentro - UNICAMP, nos anos de 1992 e 1993, foram selecionadas 87 biópsias de casos diagnosticados como mucosa normal (N), inflamatória (I), displásica (D) e neoplásica (C).

Todo material examinado havia sido enviado a este serviço fixado em formalina a 10% e submetido aos procedimentos habituais para inclusão em parafina.

As lâminas coradas pela hematoxilina e eosina (H&E) foram examinadas e selecionados os blocos onde o material foi mais representativo e os melhores cortes foram escolhidos para o processamento das reações de imunohistoquímica para PCNA (IHQ) e impregnação pela prata para AgNOR. Este estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental - CAISM - UNICAMP, de acordo com os seguintes procedimentos:

2. MÉTODOS:

2.1. TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA: A pesquisa do antígeno de proliferação nuclear (PCNA) foi realizada segundo procedimentos habituais de imunohistoquímica, técnica da Streptavidina-biotina-peroxidase descritos por Hsu e cols. (1981), com modificações.

A reação da imunoperoxidase permite a localização de antígenos celulares via enzima peroxidase em continuação com um anticorpo específico.

Uma substância geradora de cor é adicionada para reagir com a enzima e se precipita no local do antígeno. A reação foi proporcional à quantidade de antígeno e os componentes das células foram contrastados pela contra-coloração, com hematoxilina de Mayer. São usados 3 reagentes : o anticorpo específico primário monoclonal anti-PCNA (clone PC10 - Dakopats-Denmark cod. M879), para o antígeno a ser localizado; anticorpo secundário capaz de ligar-se ao primário, conjugado à biotina, e o complexo de peroxidase conjugado à estreptavidina e biotina. A estreptavidina contém 4 sítios para ligação da biotina, sendo que um deles vai ser ocupado pela biotina ligada ao anticorpo secundário e os outros 3 sítios serão acoplados ao complexo biotina peroxidase da solução. (fig. 2). Sumariamente procedeu-se como se segue:

- a. **Cortes histológicos:** secções de 4 µm foram colocadas em lâminas previamente lavadas e desengorduradas, tratadas com solução de organossilano a 2% em acetona (3-Aminopropil-trietoxi-silano - SIGMA cód. A3648). As lâminas com os cortes foram deixadas à temperatura ambiente até o momento da reação imuno-histoquímica.(HALL et al,1990).
- b. **Desparafinação:** 1 banho de xilol a 60°C (15 minutos) e 2 banhos de xilol à temperatura ambiente (10 minutos cada) para retirar o excesso de parafina.

Método Estreptavidina-Biotina-Peroxidase

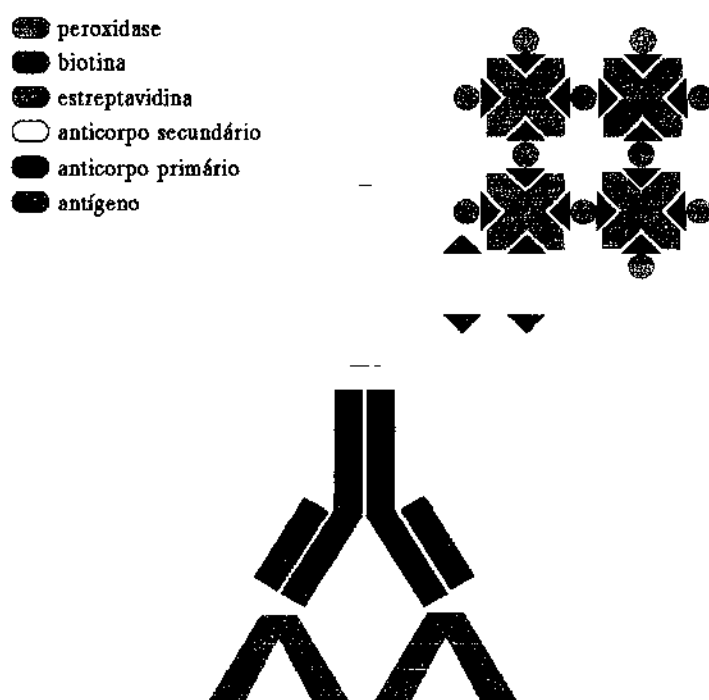
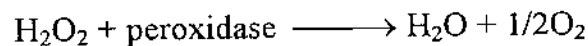


FIGURA 2. Representação esquemática do sistema de revelação Estreptavidina-Biotina-Peroxidase.

- c. **Hidratação:** realizada em gradiente decrescente de álcoois (3 banhos de álcool absoluto, 2 minutos cada; 1 vez em álcool 80% por 2 minutos, 1 vez em álcool 50% por 2 minutos; (todos à temperatura ambiente). Seguiu-se lavagem em água corrente por 2 minutos e passagem em água destilada.
- d. **Inibição da peroxidase endógena:** banho em solução a 3% de peróxido de hidrogênio em metanol por 15 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em água corrente e passagem por água destilada. Incubação em tampão PBS (phosphate buffer saline, pH 7,6).
- e. **Bloqueio de reações inespecíficas:** visa evitar que o anticorpo primário se ligue a outros antígenos do tecido, eliminando, desta forma, reação inespecífica de fundo. A incubação com soro não imune deve ser de um animal diferente daquele onde é produzido o anticorpo primário e de preferência, igual ao secundário. O soro normal utilizado foi de cavalo (Kit Vector pK002) - diluição 1:60, incubação durante 20 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. A seguir, retirou-se o excesso de soro normal, sem lavagem posterior.
- f. **Reação antígeno-anticorpo primário:** incubação com o anticorpo primário anti-PCNA/PC10 (DAKOPATS cód. M879), monoclonal, produzido em camundongo, diluição 1:150 em PBS com 0,1% de soro albumina bovina. Incubação "overnight" a 4°C em câmara úmida. Na manhã seguinte, retirado o excesso do anticorpo primário, seguiram-se 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada, à temperatura ambiente.
- g. **Reação com o anticorpo secundário biotilado (porção Fc):** dirigido contra o anticorpo primário (cadeia pesada). Incubação

com anticorpo secundário (anti-Imunoglobulinas de camundongo, coelho e cabra, produzidos em porco, Kit Biogenex "StreptaVigen" cod. LP000-UL), diluição 1:50 em tampão PBS durante 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. Retirado o excesso do anticorpo secundário biotilado, seguiram-se 3 lavagens em PBS, 5 minutos cada, à temperatura ambiente.

- h. **Reação S-ABC - complexo estreptavidina-biotina peroxidase:** incubação com complexo S-ABC (Kit Biogenex-StreptaVigen cod. LP000-UL), diluição 1:50 em tampão PBS, 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, seguindo-se lavagem em tampão PBS.
- i. **Coloração:** realizada com DAB (3,3" tetra-hidrocloroeto diaminobenzidina, Sigma D5637), cromógeno de cor marrom impregnado no local onde ocorre reação:



Preparo: 40mg de DAB em 100ml de tampão PBS e 40µl de peróxido de hidrogênio 30%. Deixam-se as lâminas na solução cerca de 2 a 3 minutos, à temperatura ambiente, ou até visualização de coloração levemente acastanhada dos cortes.

Lavagem em água corrente e passagem em água destilada.

- j. **Contra-coloração:** realizada com hematoxilina de Mayer, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. Em seguida, lavagem em água corrente (foram colocadas algumas gotas de amoníaco na água para melhor evidenciar a contra-coloração e obter-se melhor contraste). Seguiu-se lavagem em água corrente e passagem em água destilada.

- k. **Desidratação:** 3 vezes álcool absoluto, passagem em 3 xilóis. Em seguida, montagem das lâminas com Entellan (Merck, n^o 7961).
- l. **Observação dos resultados:** foi feita em microscópio óptico comum, aumento de 400x, sendo considerados positivos todos os núcleos corados de marrom independentemente da sua intensidade. Serviu de controle positivo dos cortes a coloração de tecido normal de linfonodo, que mostra intensa coloração dos núcleos das células nos centros germinativos.
- Embora seja este um método que preserva detalhes morfológicos, a contagem de núcleos positivos em 1000 células em 10 diferentes campos, foi realizada sem conhecimento do diagnóstico da coloração de H&E. A região escolhida para contagem das células positivas, foi preferencialmente a região da base das glândulas. Cada lâmina foi analisada duas vezes pelo mesmo observador, a fim de se verificar a variação intraobservador.
- m. **Índice de PCNA:** foi determinado pela porcentagem de células positivas em 1000.

2.2. TÉCNICA AgNOR:

- a. **Reação:** realizada em cortes de 4 μ m de espessura. A solução de coloração consiste de:
- SOLUÇÃO A: nitrato de prata (AgNO_3) a 50% em água destilada.
 - SOLUÇÃO B: gelatina a 2% em solução 1% de ácido fórmico.

No momento do uso preparou-se uma solução contendo 2 volumes de A para 1 de B. Esta solução foi gotejada sobre os cortes, que em seguida foram cobertos por lamínula. A incubação se desenvolveu em ambiente escuro por 30 minutos. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada e deionizada.

- b. **Desidratação e Montagem:** conforme descrito para a técnica de imuno-histoquímica.
- c. **Contagem das AgNORs:** A quantificação foi realizada em microscópio óptico comum, em objetiva de imersão. Foram contadas 100 células em 8 a 10 campos. Para fins de contagem, foi considerada uma unidade cada ponto individualizado, isolado ou em agrupamento. Uma média de número de Ag-NORs por núcleo foi calculada.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os grupos normal (N), inflamatório (I), displásico (D) e neoplásico (C), foram comparados pelos testes não paramétricos de Kruskal Wallis e Dunn para as 2 determinações. Uma análise de regressão linear foi realizada entre as duas técnicas para cada grupo, e o respectivo coeficiente de correlação (r) foi determinado e sua significância avaliada, admitindo-se como margem de confiabilidade 95%.

Para melhor visualizar o grau de sobreposição dos valores individuais entre os grupos, constitui-se um gráfico de dispersão destes pontos. Para ilustrar a discriminação entre os grupos, construiu-se uma curva teórica de distribuição normal para cada um deles considerando-se as estimativas de média e desvio padrão como os valores dos respectivos parâmetros. Desse modo, pode-se

determinar o ponto de intersecção entre as distribuições analisadas. Esta análise foi realizada com os dados de ambas as determinações e, ainda, os grupos inflamatório e displásico foram considerados como representantes da mesma população (não neoplásica).

A concordância intraobservador foi avaliada por meio da análise das diferenças entre as leituras em duplicata pelo teste "t" de Student para dados emparelhados.

RESULTADOS

Do levantamento realizado nos arquivos do Gastrocentro-UNICAMP para este estudo, foram selecionados 87 casos cujos diagnósticos emitidos através do exame das lâminas de H&E, foram de mucosa gástrica normal, inflamatória (normalmente borda de úlcera) displásica e neoplásica. Os demais casos selecionados inicialmente possuíam material pouco representativo pela análise da H&E.

Ao final do trabalho experimental, contamos com apenas 57 desses casos, nos quais as colorações foram satisfatórias para ambos os marcadores. Houve, como se vê, em um terço dos casos, fracas colorações imunohistoquímicas e, principalmente, ausência de positividade, em particular nos casos de neoplasia. Esse problema não ocorreu com a técnica AgNOR.

A imuno-reatividade para o PCNA foi identificada nos núcleos celulares, apresentando-se com aspecto difuso ou granuloso, de intensidade variável. Algumas raras vezes foi possível observar-se uma leve coloração citoplasmática. Somente os núcleos corados foram computados, independentemente da intensidade de cor. (Tabela I).

Os núcleos positivos para PCNA foram, em geral, distribuídos heterogeneamente por todo o corte; em alguns casos, ainda, sua distribuição foi focal, em "clusters" (Figs. 6a,7a,8a e 9a).

Abundantes células coradas foram tipicamente encontradas no colo das glândulas, região que procuramos não utilizar para contagem das células. Os índices médios de PC10 para cada grupo são mostrados na Tabela II.

TABELA I - Relação dos casos com os respectivos valores das contagens de Ag-NORs e índices de PCNA

	CASOS	AgNOR	PCNA
N O R M A L	52	2,66	6,4
	88	3,26	28,1
	185	3,17	36,9
	4441-2	3,11	25,6
	4691	3,07	12,7
	4021-1	2,76	15,1
	4171-IV	2,32	8,6
	4361-2	3,00	21,6
	3873	2,79	7,9
	3761	2,42	12,7
I N F L A M M A T Ó R I O	495	2,37	33,3
	498-1	2,41	26,9
	498-2	2,60	29,6
	699-2	4,18	76,8
	622	3,50	46,3
	575-2	3,18	60,3
	702-2	3,00	38,4
	500-1	3,28	49,9
	499-1	2,64	49,9
	636	4,63	69,8
	4607-2	4,44	66,4
	4642	3,50	33,0
	4690	3,80	43,7
	4695-1	4,90	34,5
	4710	4,80	52,80
	4718-2	5,10	48,7
4724-2	4,40	59,9	
4744	3,16	32,5	
4757-1	4,00	54,7	
4686	4,42	55,1	
D I S P L Á S I C O	320-1	3,79	23,9
	320-2	4,97	27,0
	66	3,93	57,8
	106	3,87	60,3
	278-5	2,56	48,0
	278-4	3,13	23,9
	278-1	2,27	24,1
	895-1	3,66	41,0
	895-2	3,91	33,2
	3924	4,33	15,1
3778-2	3,79	24,2	
2846-2	4,88	32,4	
N E O P L Á S I C O	685-1	5,63	47,1
	527-2	4,07	79,5
	95	3,59	64,9
	344	3,99	67,0
	207	4,97	45,3
	79	4,26	82,5
	110	4,79	84,5
	129	6,02	72,3
	501	5,63	38,3
	307	6,34	70,2
	4786-1	5,31	63,5
	4508	6,20	85,7
	4338-II	4,40	56,9
3981	4,90	36,6	
3799	4,90	42,9	

Os índices de PCNA foram significativamente diferentes entre os quatro grupos ($H=30,74, p<0,001$), sendo que os grupos N, I e D foram estatisticamente menores que o C ($p<0,05$). Apesar destas diferenças, nota-se, considerável sobreposição entre os valores. A distribuição dos dados individuais dos índices estão ilustrados na figura 3A, que mostra esta sobreposição claramente. Pelo gráfico, determina-se, ainda, um ponto de corte separando os grupos normal e neoplásico, no valor aproximado de 37% de positividade.

TABELA II - Valores das médias e desvios-padrão dos índices de PCNA e contagens de Ag-NORs por grupo

	AgNOR		PCNA	
	X	S	X	S
NORMAL(10)	2,85	0,31	17,56	9,58
INFLAMATÓRIO(20)	3,71	0,85	48,12	13,82
DISPLÁSICO(12)	3,76	0,78	34,32	13,86
NEOPLÁSICO(15)	5,00	0,82	62,48	16,50

DISPERSÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS DAS CONTAGENS DE PCNA.

A.

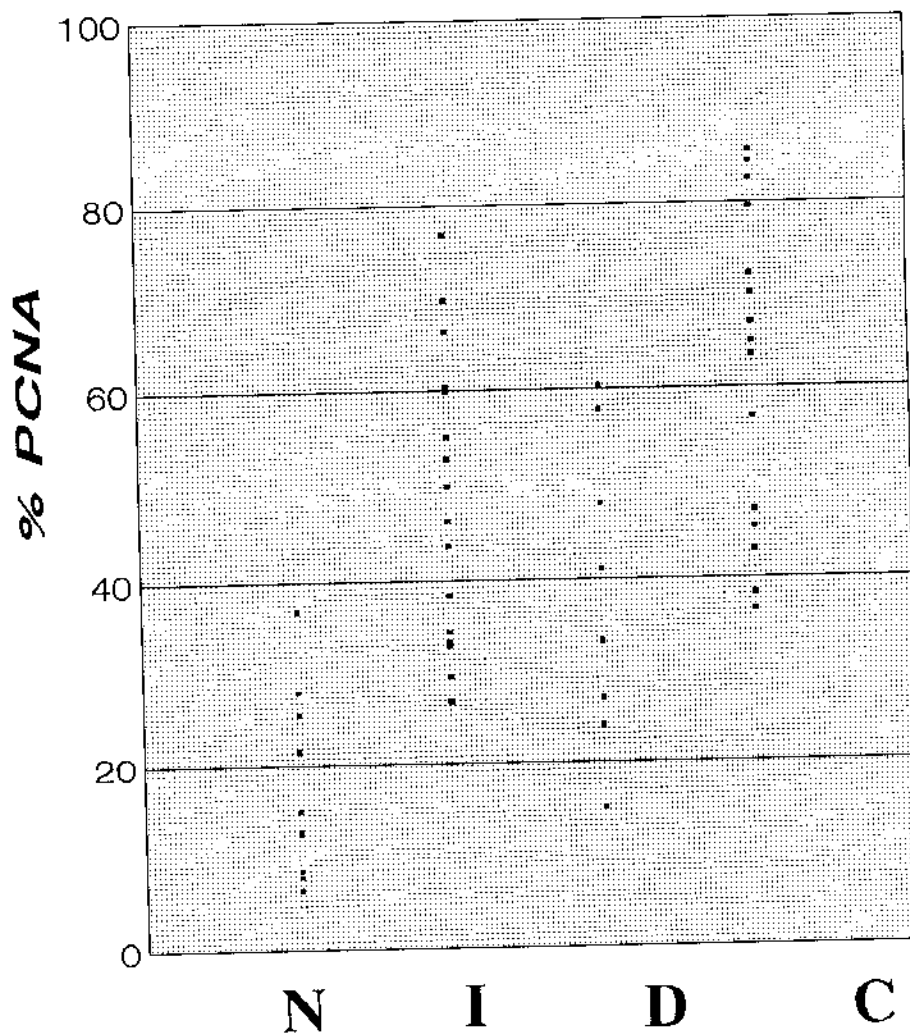


Figura 3A - Porcentagem de células positivas para PC10 para cada um dos quatro grupos estudados.

Com o método AgNOR, foi identificado em todos os núcleos um número variável de pontos negros bem definidos e, em muitos casos, esses pontos apresentaram-se reunidos, formando agrupamentos ("clusters"). Foi necessária cuidadosa focalização, de tal modo, que todos os pontos pudessem ser enumerados. Estes dados podem ser vistos (juntamente com os do PC10, na Tabela I). Com relação à forma, as AgNORs mostraram-se caracteristicamente maiores, mais irregulares, algumas vezes em formas bizarras, nas células malignas. Por outro lado, nas biópsias normais os pontos tinham formas mais regulares e eram facilmente distintos (Figs. 6b, 7b, 8b e 9b).

As médias das AgNORs em cada grupo são dadas na Tabela II. Aqui também os grupos diferiram significativamente entre si ($H=25,77, p<0,001$). Como para o PC10, os casos não-neoplásicos tiveram contagens estatisticamente menores que os neoplásicos malignos ($p<0,05$). Da mesma forma, notamos grande sobreposição entre os valores de AgNORs dos grupos inflamatório, displásico e neoplásico. Um ponto de corte entre biópsias normais e neoplásicas malignas foi definido no valor aproximado de 3,5 AgNORs/núcleo, como mostra o gráfico de dispersão (figura 3B).

DISPERSÃO DOS VALORES INDIVIDUAIS DAS CONTAGENS DE AgNORs.

B.

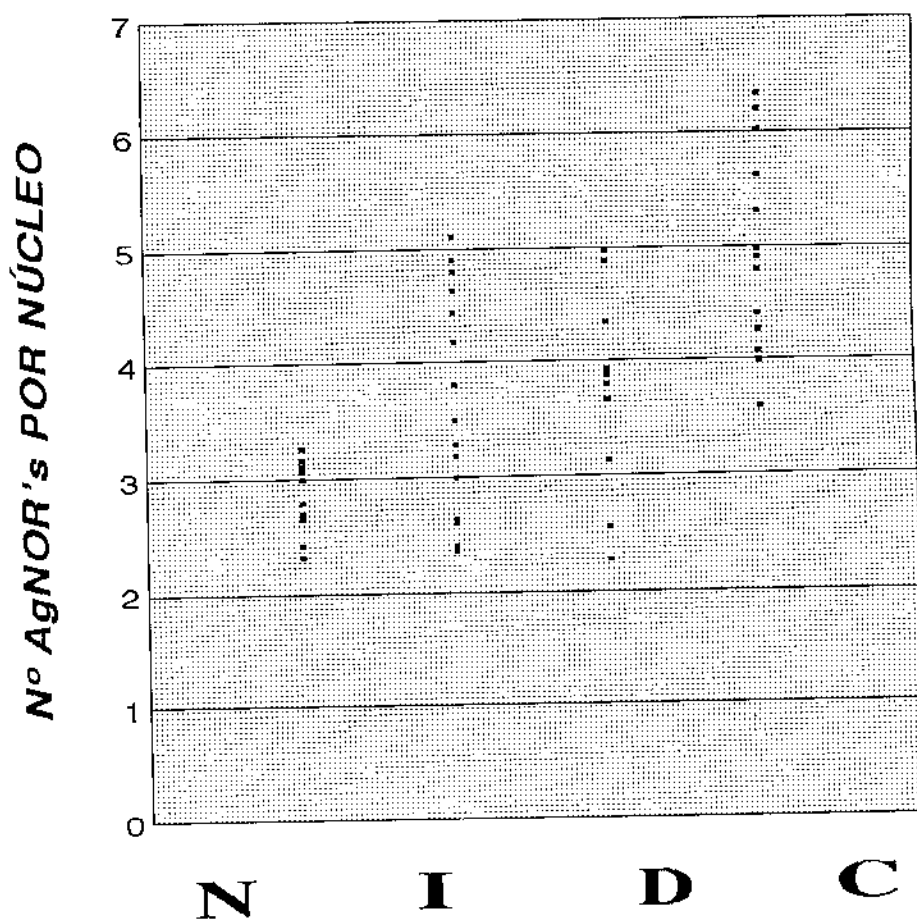


Figura 3B - Número médio de AgNORs por núcleo para cada um dos quatro grupos estudados.

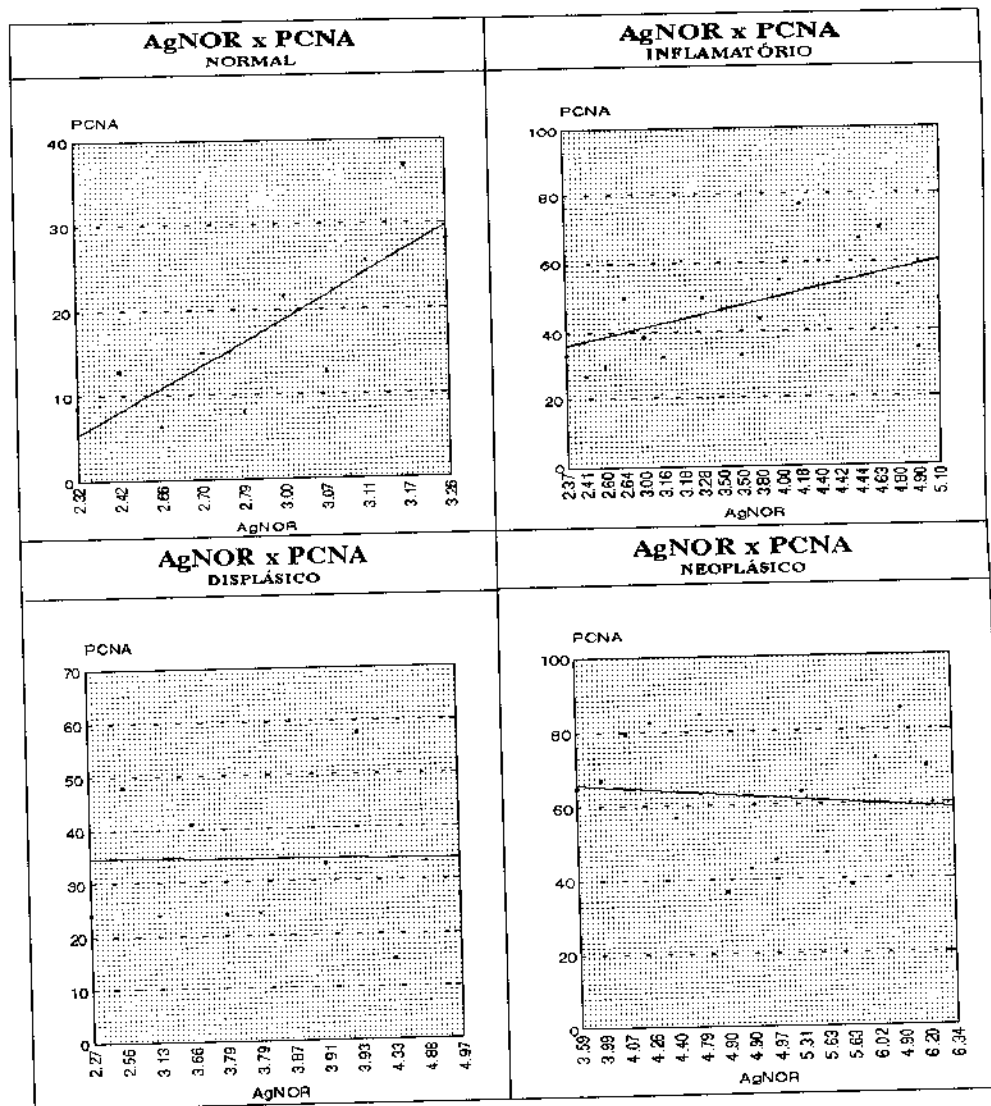


Figura: 4 - A. Normal; B. Inflamatório; C. Displásico; D. Neoplásico.

A análise de discriminação está ilustrada nos gráficos da Figura 5 A e B, onde foi determinada a intersecção das curvas dos grupos inflamatório mais displásico (não neoplásico) e neoplásico nas duas técnicas. O ponto de intersecção para o AgNOR foi no valor de 4,76 AgNORs por núcleo. Da área sob as curvas observa-se que 10,32% dos casos não-neoplásicos se encontram dentro da distribuição dos neoplásicos e 38,78% desses últimos se encontram na distribuição do grupo inflamatório/displásico. Para o PC10, o ponto de intersecção foi no valor de 62,73% de positividade e 9,9% dos casos não-neoplásicos encontram-se na distribuição do grupo neoplásico 50,62% destes últimos estão na distribuição do grupo não-neoplásico. Nota-se, portanto, que para as AgNORs há cerca de 50% e para o PC10, aproximadamente 60% de probabilidade falsos diagnósticos.

A análise de regressão linear, entre os 2 métodos, - AgNOR e PCNA - foi realizada, e o coeficiente de correlação determinado para cada situação. Os gráficos das figuras 4 A e B mostram a correlação entre as duas técnicas para os grupos normal e inflamatório, onde ela foi positiva e significativa ($p < 0,05$) e os coeficientes de correlação (r) foram de 0,76 e 0,55, respectivamente. Isto mostra que os métodos apresentam o mesmo padrão de determinação com seus coeficientes altamente significantes nesses dois grupos. Ao contrário, a figura 4 C e D mostra os gráficos de regressão linear para os outros grupos (displásico e neoplásico), onde não houve correlação alguma ($r = -0,08$ e $0,05$ respectivamente).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a primeira e a segunda leitura realizadas separadamente, pelo mesmo observador, ($p < 0,001$) para as duas determinações.

ANÁLISE DE DISGRIMINAÇÃO

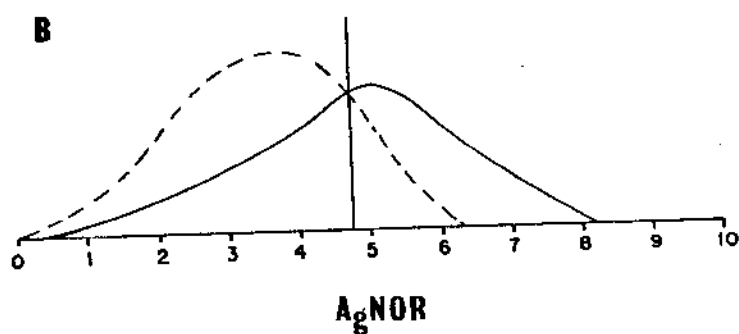
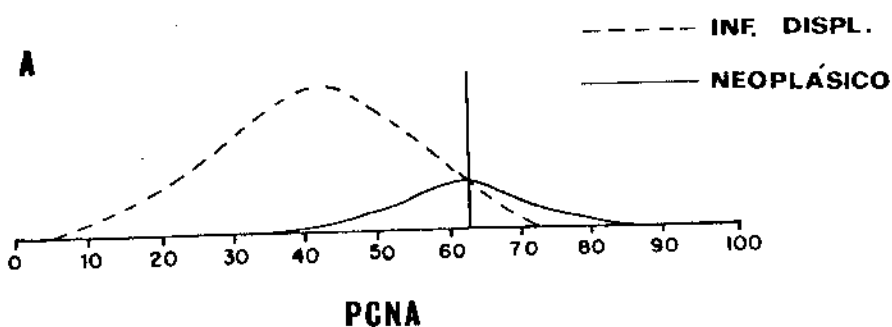


Figura 5 - Análise de discriminação entre as populações não neoplásica e neoplásica para A. índice de PC10 e B. N^o de AgNORs/núcleo.

Figura 6 - Caso normal nº 4441-2, a. Índice de PC10 = 25,6% e b. Nº médio de AgNORs/núcleo = 3,11.

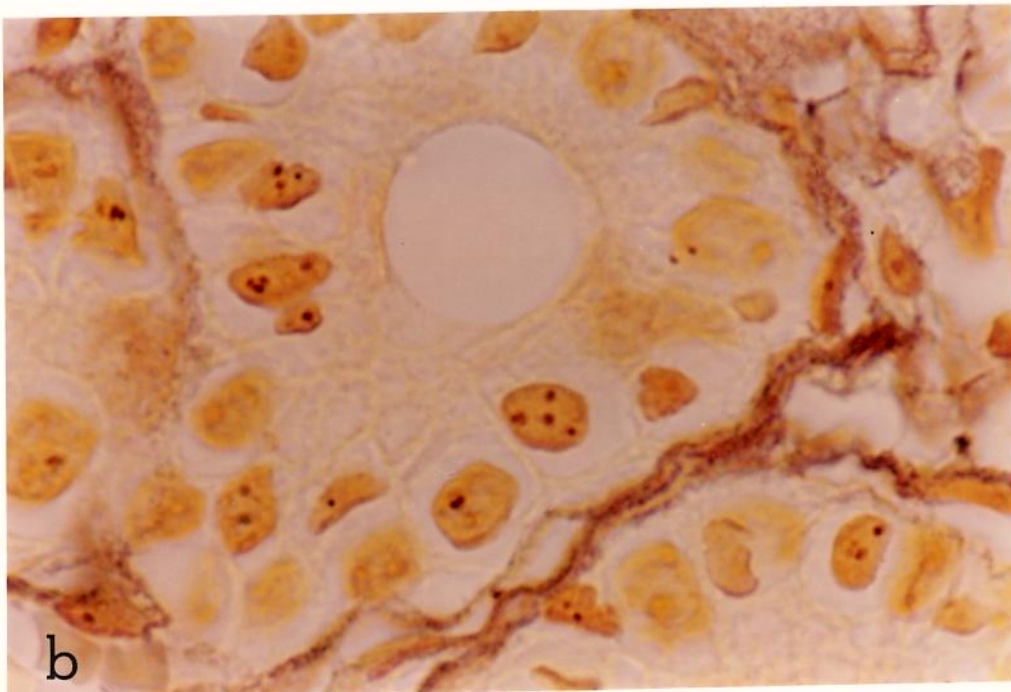
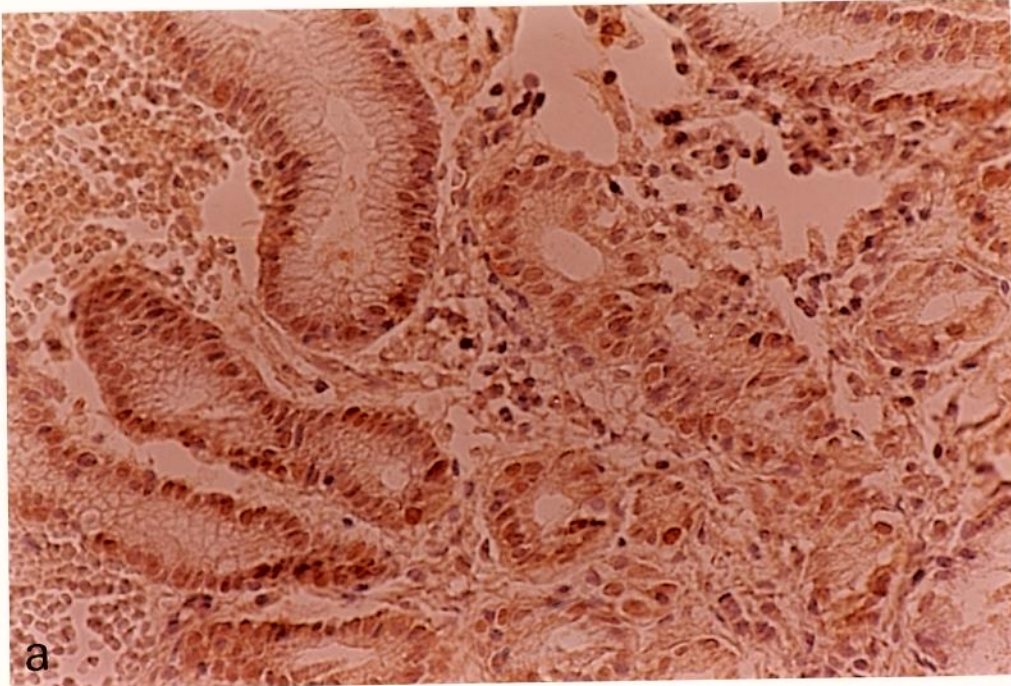


Figura 7 - Caso inflamatório nº 4718-2, a. Índice de PC10 = 48,7% e b. Nº médio de AgNORs/núcleo = 5,10.

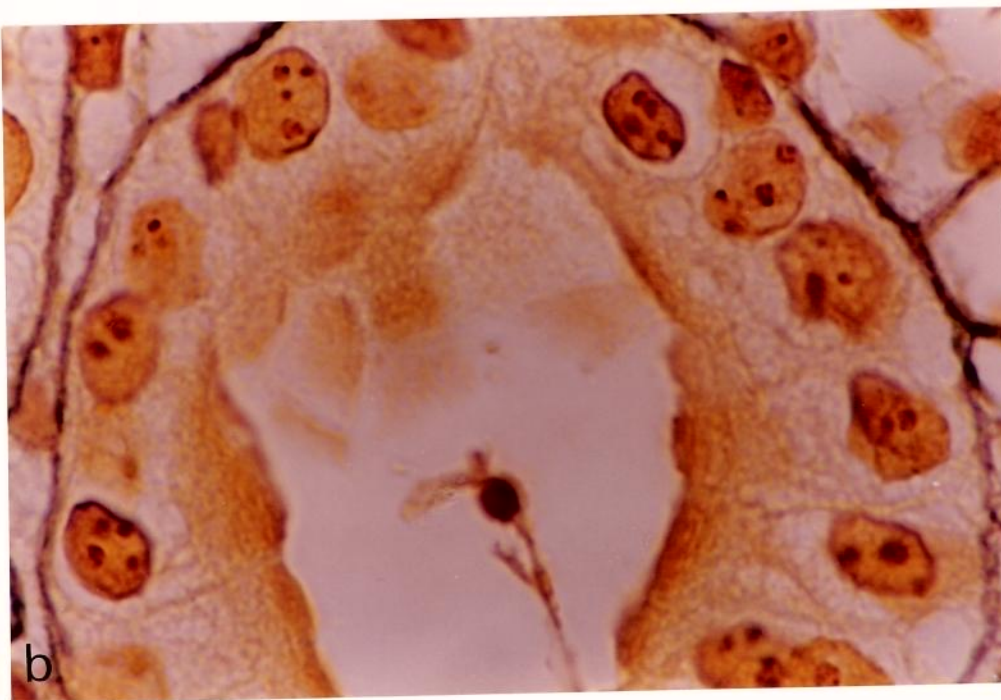
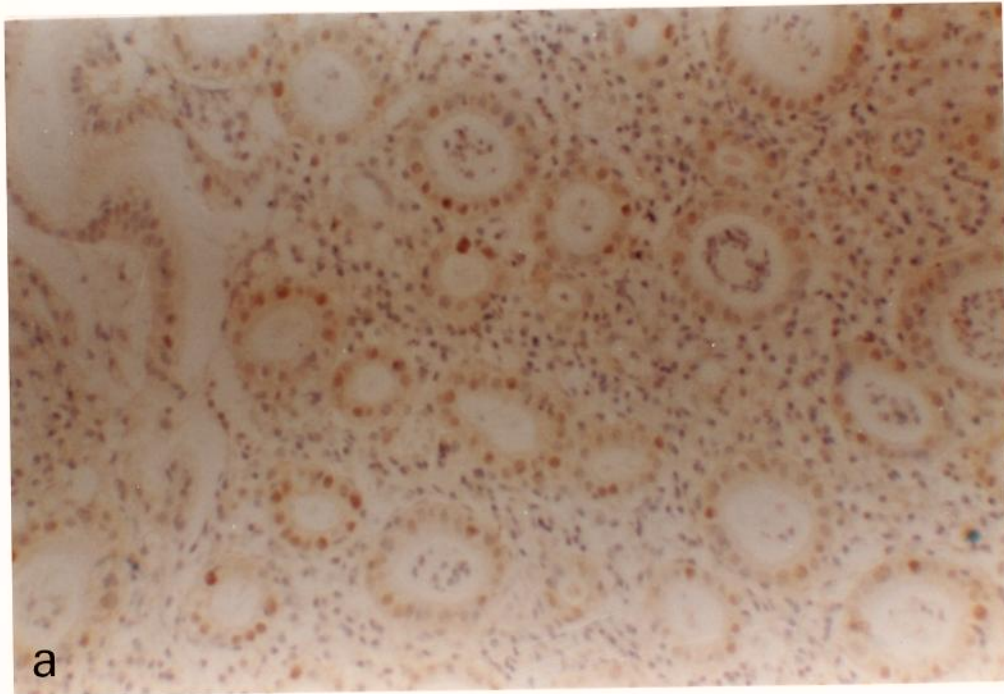


Figura 8 - Caso displásico nº 320-2, a. Índice de PC10 = 27% e b. N.º o. médio de AgNORs/núcleo = 4,97)

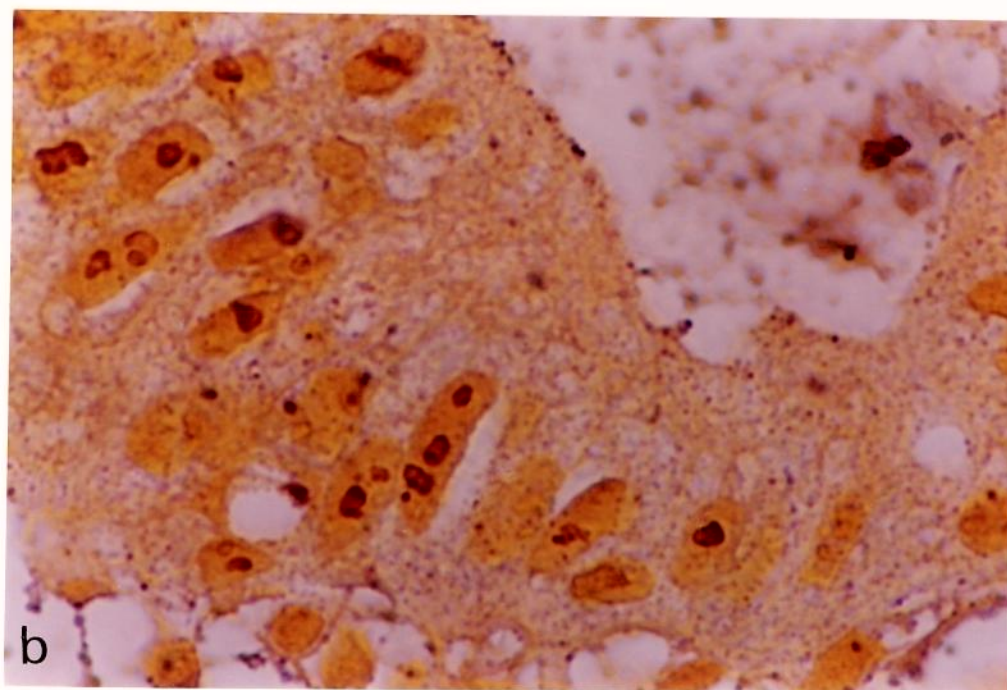
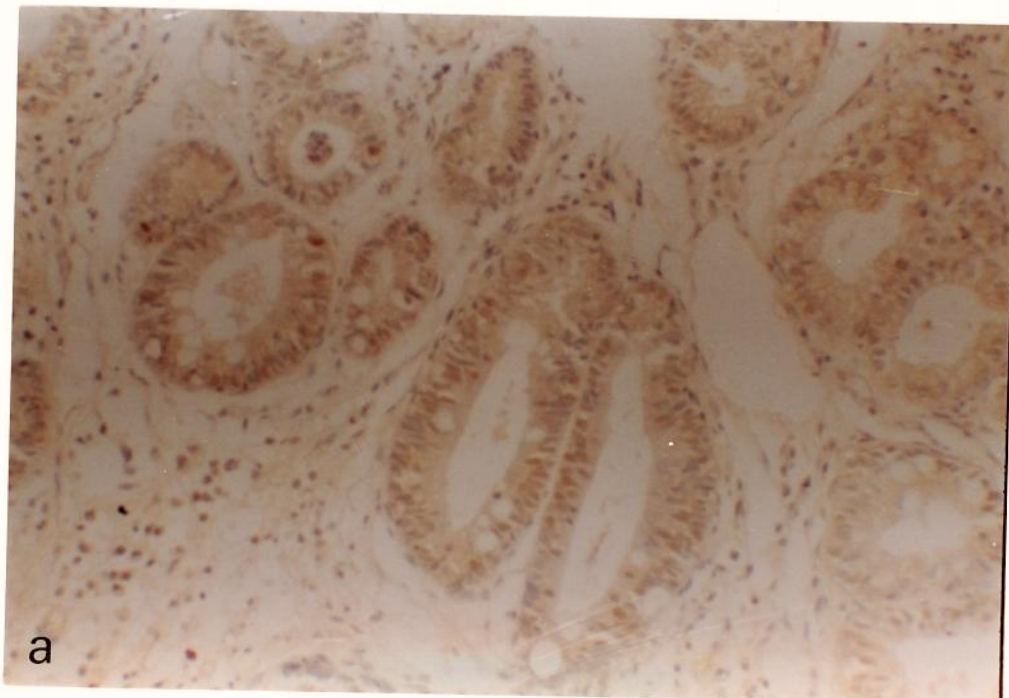
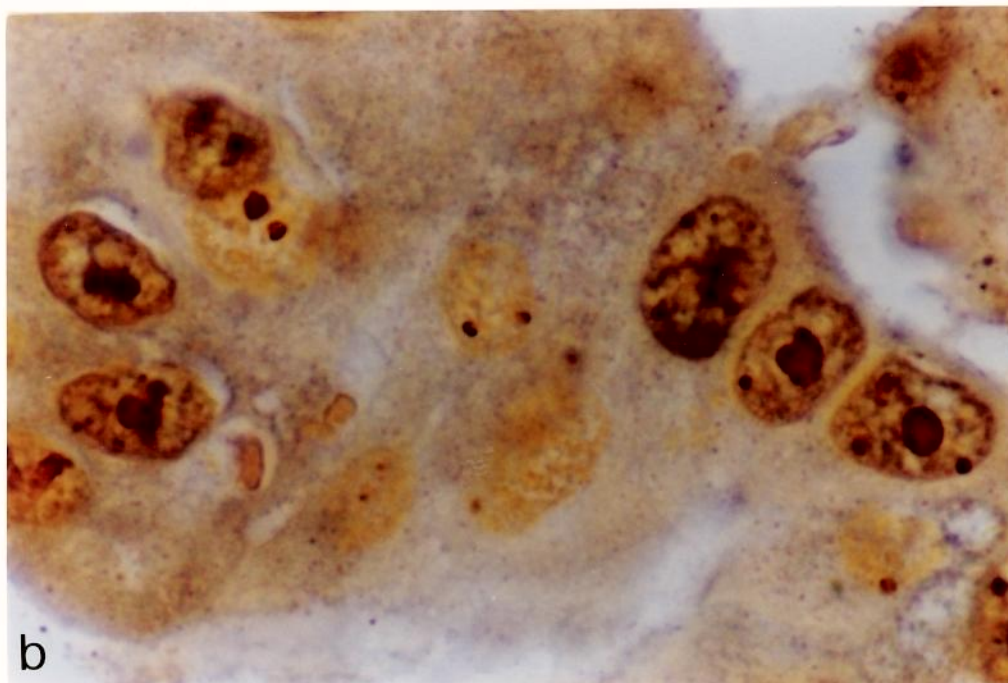
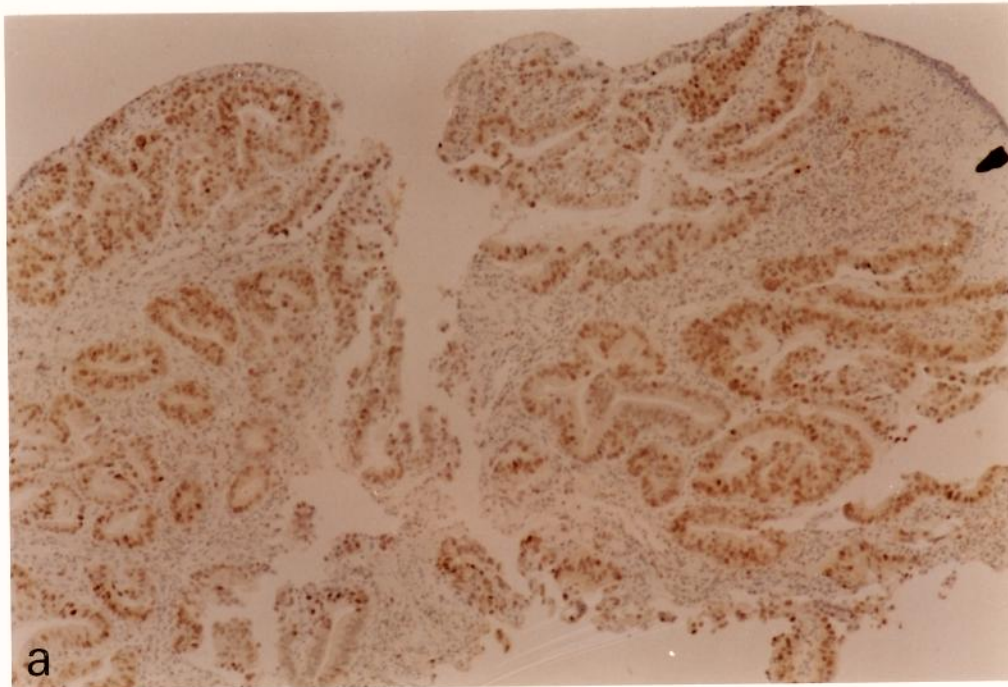


Figura 9 - Caso neoplásico maligno nº 129, a. Índice de PC10 = 72,3% e b. Nº médio de AgNORs/ núcleo = 6,02



DISCUSSÃO

É crescente entre os histopatologistas o interesse sobre o papel do núcleo, do DNA, da cinética celular e de como as investigações científicas nesta área podem ajudar no estudo de doenças, principalmente com a finalidade de auxílio no diagnóstico e no fornecimento de dados para avaliação do prognóstico. Tradicionalmente, a proliferação celular tem sido estudada por métodos envolvendo a incorporação ao DNA de substâncias como a timidina tritiada, ou seu análogo não radioativo, a bromodeoxiuridina, ou por técnicas baseadas na contagem mitótica. A citometria de fluxo é outro método rápido, estatisticamente preciso e pode fornecer informações úteis neste sentido (O'RELLEY et al, 1989). Estas técnicas, contudo, não são aplicáveis às lesões muito pequenas ou tampouco, a situações onde a morfologia é de particular importância. Esta última característica, só é respeitada quando se utilizam os métodos histoquímicos e imuno-histoquímicos de medida da proliferação, pela detecção de proteínas relacionadas ao ciclo celular. São técnicas relativamente simples, que permitem a localização topográfica das células marcadas e não usam material radioativo.

O câncer gástrico avançado possui prognóstico muito desfavorável, o que torna importante seu diagnóstico precoce. Esta definição é obtida pela identificação de grupos nos quais a doença tem maior probabilidade de se desenvolver. A gastrite atrófica crônica, a metaplasia intestinal e a displasia são consideradas condições potencialmente precursoras do carcinoma gástrico (CORREA, 1988). O diagnóstico de displasia, por exemplo, requer acompanhamento e existem critérios para se graduar essa lesão, que nem sempre são fáceis de serem aplicados, além de, muitas vezes, ocorrerem problemas na distinção entre alterações reacionais e neoplásicas (FILIFE et al, 1993). Há, pois, interesse no desenvolvimento de métodos quantitativos para se definir e graduar lesões pré-neoplásicas e monitorar sua evolução. Estes métodos devem ser de fácil execução

e interpretação (YU et al, 1992), e principalmente, utilizáveis em material rotineiro, previamente fixado e incluído em parafina.

Estudos anteriores, usando timidina tritiada, coletaram considerável quantidade de informações sobre a cinética celular da mucosa gástrica humana, em várias condições patológicas. Uma atividade proliferativa aumentada e desordenada foi evento paralelo à gastrite atrófica, sendo de particular interesse a observação de maiores índices de marcação radioativa em regiões de epitélio normal e com metaplasia intestinal em estômago de pacientes com câncer gástrico, comparados àqueles sem neoplasia (FILIPE et al, 1993). A análise da ploidia (YONEMURA et al, 1988), da atividade proliferativa medida por bromodeoxiuridina (YONEMURA et al, 1991a) e Ki67 (YONEMURA et al, 1991b) são considerados poderosos marcadores de prognóstico em pacientes com câncer gástrico.

Nos últimos anos foram identificados numerosos antígenos proteicos com importante função na regulação do crescimento. A detecção destas proteínas, pela imuno-histoquímica, permite o estudo detalhado da proliferação normal e patológica. Dentro do elenco de moléculas relacionadas ao ciclo proliferativo está o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Seus níveis são altos nas fases G1/S, diminuindo de nove a dez vezes no meio da fase S (três horas pós-liberação) e aumentando duas a três vezes quando as células progridem para o final desta fase (GAZITT, ERDOS, COHEN, 1993). Vários anticorpos monoclonais que reconhecem estas proteínas já foram produzidos (TAKASAKI et al, 1990; WASEEN & LANE, 1990). Estes anticorpos foram testados na detecção de células proliferativas em diferentes tecidos com resultados variáveis (KAMEL et al, 1991; LANDEBERG e ROOS, 1991; GALAND & DEGRAEF, 1989; GARCIA et al, 1989). A reatividade destes anticorpos em determinada fase do ciclo é dependente, de modo especial, do procedimento de fixação, bem como do anticorpo utilizado (LANDEBERG & ROOS, 1991).

O clone PC10, comercialmente disponível, foi o anticorpo anti-PCNA empregado em nosso estudo. Sua reatividade foi quase totalmente restrita ao núcleo celular com padrão difuso ou granuloso e raramente foi observada coloração citoplasmática. Estas características de coloração nuclear foram também descritas por outros autores (HALL et al, 1990; GALAND & DEGRAEF, 1989; HELL et al, 1993; SCHMID, SWEENEY, ISAACSON, 1992; MONTORINI et al, 1993). Em relação à coloração citoplasmática, inferiu-se que ela representasse síntese ou catabolismo da proteína no citoplasma (HALL et al, 1990). Estes últimos autores relataram, ainda, que a expressão do PC10 em tecidos normais é coerente com a associação entre PCNA e células em proliferação, validando seu emprego como marcador de atividade proliferativa. Maior comprovação foi obtida ao compará-lo ao anticorpo Ki-67, este último adotado como padrão-ouro nas pesquisas imuno-histoquímicas de marcadores relacionados ao ciclo celular (GERDES et al, 1983; GERDES et al, 1984). Uma correlação positiva entre esses anticorpos foi documentada na mucosa colo-retal (DIEBOLD, LAI, LOHRS, 1992), em doenças linfoproliferativas (KAMEL et al, 1991), em tumores de mama (DAWSON, NORTON, WEINBERG, 1990), embora uma ausência de associação também tenha sido descrita (LEONARDI et al, 1992), inclusive em carcinoma gástrico por ROSA et al (1992). Para esses autores a perda de correlação entre PCNA e Ki-67 pode ser decorrente de fatores como o reduzido tamanho do fragmento destinado ao Ki-67, à longa meia vida do antígeno e, principalmente, à grande heterogeneidade intra e inter-tumoral na sua expressão.

Em nossos casos de mucosa gástrica neoplásica, a heterogeneidade intra-tumoral na expressão, de PC10 com variável intensidade de coloração dos núcleos, foram fenômenos constantemente observados, corroborando os dados de outros estudos anteriores no mesmo órgão (JAIN et al, 1991; ROSA et al, 1992; FILIPE et al, 1993) e também em outros tecidos (YANG et al, 1993; DERVAN et al, 1992; ODA et al, 1993; DIEBOLD et al, 1992; GARCIA et al, 1989). Admite-se que a variável intensidade de cor decorra, talvez, do fato de que células fortemente coradas estejam na fase S do ciclo, enquanto a positividade mais

fraca seria característica de outras fases. A referida longa meia vida do antígeno, de aproximadamente 20 horas (BRAVO & McDONALD-BRAVO, 1987), permite que ele seja detectado inclusive naquelas células que já deixaram o ciclo, o que implicaria em uma superexpressão dessa proteína (HALL et al 1990). A coloração difusa, não associada à proliferação, pode ser reduzida pelo tratamento com metanol ou solventes orgânicos (WASEEN & LANE, 1990; KNUCHEL et al, 1993).

A porcentagem de positividade do PC10 variou, em nossa amostra, entre os valores mínimo e máximo de 6,4% e 85,0%, respectivamente, com média de 50,6%. Os números encontrados na literatura são menores que os nossos, variando entre zero e 77% (MONTORINI et al, 1993; YU et al, 1991; YANG et al, 1993; WOODS et al, 1991; VISAKORPI, 1992; THOMAS et al, 1993; TATAYAMA et al, 1993). Níveis acima de 50% de marcação foram descritos, também em mucosa gástrica, por JAIN et al (1991).

De particular interesse é a observação de que enquanto há nítidas variações na quantidade do PCNA através do ciclo celular, os seus níveis de expressão raramente são indetectáveis pela imuno-histoquímica (BRAVO & McDONALD-BRAVO, 1985), justamente, em função de sua longa meia-vida (BRAVO & MACDONALD-BRAVO, 1987). Ao contrário, o Ki-67 tem vida muito curta, provavelmente devido a sua rápida degradação. Estes fatos são relevantes na presença de variações da ligação antígeno-anticorpo, quando se usam diferentes concentrações do antisoro, o que pode ser comprovado, ainda, pelo emprego de sistemas de detecção de distintas sensibilidades (McCORMICK et al, 1993; LINDEN et al, 1992).

Considerando-se uma população celular onde o PCNA é continuamente expresso, dada uma baixa concentração do anticorpo, nenhum sinal é detectado, mesmo em células que sabidamente contêm o antígeno. Quando a diluição é reduzida, atinge-se um ponto onde o sinal é detectado no menor número de células com alta concentração de antígeno. Após este valor limite, um pequeno

aumento na concentração do anticorpo, leva a um rápido aumento no sinal atingindo um nível máximo, após o qual não há efeito adicional. É possível mover a curva para a direita, aumentando-se a diluição do anticorpo, utilizando-se de um sistema de detecção mais sensível ou um anticorpo de maior afinidade (McCORMICK et al, 1993; LINDEN et al, 1992)). Estudos demonstraram uma considerável alteração nas porcentagens de células coradas pelo PC10 quando a sua diluição variou de 1:500 a 1:5000, o mesmo não sendo encontrado para o clone 19A2 (COLTRERA, SKELLY, GOWN, 1993).

Determinamos, empiricamente, a diluição de 1:150 do anticorpo concentrado e a incubação foi a 4°C por 16-18 horas, "overnight". A diluição do PC10 não é consensual e depende, ainda, das condições de incubação. Proporções de 1:20 (PANDLETON et al, 1993) a 1:500 (COLTRERA et al, 1993), podem ser encontradas na literatura. O período de incubação prolongado foi referido por grande número de autores (EVANS et al, 1992; THEUNISSEN, LEERS, BOLLEN, 1992; DIEBOLD et al, 1992; ROSA et al, 1990a; WOODS et al, 1991). Teoricamente, um anticorpo monoclonal de alta afinidade teria igual sensibilidade com incubação curta ou longa. Entretanto, quando este período é aumentado, mesmo com anticorpo monoclonal, obtém-se maior sensibilidade do procedimento. Acredita-se, que substâncias que interferem com a interação antígeno/anticorpo são removidas pelo simples umedecimento dos tecidos por longo período. De fato, foi descrito que a incubação "overnight" somente com tampão, seguida por incubação de 1 hora com o anticorpo primário pode melhorar a sensibilidade da reação (BATTIFORA, comunicação pessoal).

A inconstante reatividade do PCNA pode estar ligada também à sua susceptibilidade a fixação, o que pode levar eventualmente, a alteração do perfil das neoplasias (LEONARDI et al, 1992). Este procedimento parece exercer profunda influência sobre as técnicas de marcação por PCNA, sendo que o formol tem efeito deletério sobre a reatividade e apenas o clone PC10 fornece resultados satisfatórios em tecidos assim fixados (COLTRERA et al, 1993; GARCIA et al, 1989). Prolongada ou má fixação foi proposta como possível causa da perda de

associação entre PC10 e fração de fase S medida por citometria de fluxo (VISAKORPI, 1992), e com o Ki-67 (ROSA et al, 1992). O intervalo de tempo, além do tipo de fixador, influenciam a coloração, resultando em perda de reatividade proporcional ao tempo de exposição (COLTRERA et al, 1993), sendo que no formol a 10% tamponado ou não, por período superior a 24 horas, observa-se drástica diminuição da marcação, a imuno-reatividade é em geral, totalmente abolida após 72 horas no fixador (HALL et al, 1990; WOLF & DIETRICH, 1992). Ao contrário, para START et al (1992) a imuno-reatividade do PCNA não foi alterada pelo tempo de fixação, até o limite de 24 horas, talvez segundo os autores, em decorrência de sua longa meia-vida. Esta relação reatividade/tempo de fixação pode se apresentar diferentemente em tecidos com distintos requerimentos metabólicos e "turn overs" celulares. As características do fragmento, forma e tamanho, podem também influenciar esse tempo (ROOS et al, 1993). O PC10 mostrou boa especificidade num intervalo de 6 a 48 horas em formalina 10%, com preservação do tecido superior à obtida com Carnoy (TSUJI et al, 1992).

Nossos resultados foram obtidos em biópsias fixadas em formalina 10%, não tamponada, sem um controle rígido das condições de fixação, pois trata-se de material de arquivo. A secagem dos cortes nas lâminas foi à temperatura ambiente, já que é referido, que o seu aquecimento em estufa a 60°C pode prejudicar a imuno-reatividade do PC10, efeito este, cujas razões não são totalmente conhecidas (HALL et al, 1990). Os procedimentos normalmente empregados para desmascarar o antígeno facilitando o acesso do anticorpo, não melhoraram a qualidade da nossa reação final. O uso de microondas com tampão citrato, por exemplo, não promoveu nenhum benefício, muito embora boa recuperação do antígeno no microondas tenha sido relatada anteriormente (MALMSTRÖM et al, 1992). Não adotamos outras técnicas para desmascarar o antígeno, já que é descrito efeito adverso da digestão enzimática, o qual pode abolir a reatividade do anticorpo (HALL et al, 1990).

Ao final do trabalho experimental, constatamos uma perda de cerca de 30% dos casos, onde houve ausência total de imuno-reatividade ou escasso número de células coradas nos tecidos tumorais. Como resultado, houve considerável redução da casuística, pois as lâminas coradas para AgNOR não puderam ser comparadas aos seus correspondentes PCNAs. À semelhança de nossos dados, KAMEL et al (1992) relataram perda em 21% de seus casos, onde também constataram ausência de reatividade ou extensa coloração inespecífica de fundo, de modo que foi impossível a interpretação dos resultados. A coloração inexistente poderia ser decorrente de vários fatores, entre eles, a destruição do antígeno por má ou prolongada fixação, bem como da natureza do fixador, além da possível incapacidade de detecção do antígeno pelo anticorpo na diluição empregada. Esse último fator, segundo alguns autores (COLTRERA et al, 1993; McCORMICK et al, 1993) parece ser o responsável pelas diferentes formas e níveis de positividade observados.

A considerável heterogeneidade, em particular intratumoral, na expressão do antígeno de proliferação observada neste estudo, é relatada frequentemente na literatura (YANG et al, 1993; DERVAN et al, 1992; GARCIA et al, 1989; ODA et al, 1993; VISAKORPI, 1992; DIEBOLD et al, 1992) e parece ser uma característica intrínseca ao tecido. Na mucosa gástrica a heterogeneidade intratumoral foi, da mesma forma, descrita por JAIN et al (1991) e ROSA et al (1992). Admite-se que o fenômeno seja decorrente da coexistência de diferentes clones celulares com distintas frações de crescimento (SIITONEN et al, 1993), isto é, o tumor estaria apresentando múltiplas regiões de crescimento focal (YANG et al, 1993).

As biópsias gástricas endoscópicas demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos normal (N) reacional (I) e displásico (D) e o grupo neoplásico maligno (C), $p < 0,05$. A distribuição dos pontos apresentada no gráfico da figura 3A mostra que, embora os grupos tenham sido significativamente diferentes entre si ($H=30,74$, $p < 0,001$), há nítida sobreposição, sobretudo entre inflamatórios e displásicos. Observa-se, no entanto, um ponto de corte

ao redor do valor de 37% de positividade entre mucosa normal e neoplásica, sendo que os grupos intermediários podem ser considerados como pertencentes a uma mesma população. O gráfico da figura 5A, mostra uma análise de discriminação entre os grupos inflamatório/displásico (não-neoplásico) em relação ao neoplásico maligno. Determinamos, por meio desta análise, um ponto de intersecção entre as populações, a nível de 62,73%. A área circunscrita pela união das curvas mostra que 9,9% dos casos não-neoplásicos estão dentro da distribuição dos casos neoplásicos e 50,62% desses últimos encontram-se dentro da distribuição da população não neoplásica. Há, portanto, cerca de 60% de sobreposição na distribuição dos índices de PCNA, o que significa que esses valores isoladamente, não ajudam no diagnóstico de casos individuais.

Existem críticas quanto à subjetividade da análise quantitativa da marcação pelo PC10 do modo como a realizamos (CLARKE e REID, 1993; ODA et al, 1993; TSUJI et al, 1992; VISAKORPI, 1992; DAWSON et al, 1990). Estes estudos preconizam o uso da análise de imagem, que poderia compensar os possíveis erros da contagem visual e aumentar o nível de concordância intra e interobservador. Entretanto, a comparação das leituras realizadas em duplicata mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os índices de PCNA determinados ($p < 0,001$). O mesmo fato foi demonstrado por McCORMICK et al, 1993; FREEMAN et al, 1993). Outros autores, trabalhando com mucosa gástrica, defenderam o método semi-quantitativo de avaliação, que permitiria a observação global do corte, contemplando, inclusive os casos onde a coloração não é homogeneamente distribuída. O "grau" de PC10 ($>$ ou $<$ 50%), como foi designado, mostrou-se superior como indicador prognóstico entre grupos de carcinomas de alto e baixo graus (JAIN et al, 1991). O mesmo foi proposto por START et al (1992) para tumores de mama e THEUNISSEN & BLAAUW (1993) em astrocitomas cerebrais.

Lesões displásicas da mucosa gástrica apresentaram alterações quantitativas e também qualitativas quanto ao padrão e localização das células marcadas pelo PC10 em mucosa portadora de tumor, quando comparadas as

mesmas lesões em mucosa sem carcinoma (FILIPE et al, 1993). Segundo estes autores, essas informações seriam úteis na previsão de risco de câncer gástrico. Observações semelhantes em relação a essas lesões foram, encontradas em nosso material, onde a distribuição das células positivas foi característica. Em outros tecidos, como epitélio brônquico displásico, o índice de PCNA diferiu significativamente do normal (PANDLETON et al, 1993), sendo o mesmo descrito no colo uterino (SHURBAJI, et al, 1993), na mucosa oral (TSUJI et al, 1992), e na próstata (MONTORINI et al, 1993).

De maneira geral, ainda que os índices de PCNA sejam elevados em tecidos em proliferação, essa elevação também se dá em resposta a danos do DNA (SHIVJI, KENNY, WOOD 1992), bem como a estímulos originados da secreção autócrina de fatores de crescimento (HALL et al, 1990), que poderiam, da mesma forma, estar associados com a carcinogênese (CHANG et al, 1990). Estudos anteriores descreveram elevada expressão de fatores de crescimento numa grande proporção de carcinomas gástricos tipo intestinal, bem como em lesões mais precoces. A frequência e intensidade foram crescentes da mucosa normal para a neoplásica (LEMOINE et al, 1992; NASIN et al, 1992). Foi sugerida uma possível ligação entre tais níveis elevados de expressão dos fatores de crescimento e índices de marcação por PCNA (FILIPE et al, 1993). Estes resultados corroboram os nossos em relação à crescente marcação por PC10 à medida em que se perde a diferenciação da mucosa gástrica, ainda que exista considerável sobreposição entre os grupos.

A informação sobre a cinética celular pode, portanto, ser adjuvante na classificação histológica dos tecidos e na compreensão do comportamento biológico dos tumores. Outras proteínas estão envolvidas no processo de proliferação celular, muitas vezes com papel regulatório. A identificação e caracterização das mesmas como marcadores de atividade proliferativa pode ter aplicação clínica e fornecer subsídios na interpretação da biologia celular e do tumor. As proteínas associadas às regiões organizadoras de nucléolo (NOR) apontam como bons marcadores de atividade proliferativa, já que apresentaram boa correlação

com Ki-67 (FALK et al, 1990), índice de DNA e fração de fase S + G2/M (ROSA et al, 1990b). A distribuição espacial das NORs é responsável pela morfologia do nucléolo e diferenças entre tumores malignos e benignos podem ser avaliadas considerando-se o número e o tamanho das NORs na intérfase (DERENZINI et al, 1986). O método de coloração pela prata foi descrito por HOWEL & BLACK (1980) e modificado por PLOTON et al (1986), estes últimos, tornando possível a execução da técnica à temperatura ambiente.

Para garantir a reprodutibilidade e correta interpretação com o método AgNOR alguns fatores devem ser observados com cuidado. O tempo de coloração pela prata por exemplo, parece ser crítico, de tal modo que, se for muito prolongado, pode prejudicar a identificação dos pontos individuais, enquanto o contrário pode fornecer detalhes mais finos, mas as contagens seriam inaceitavelmente baixas (SMITH et al, 1988). Em geral, tempos mais curtos de incubação foram preferidos, geralmente ao redor de 30 minutos (SMITH & CROCKER, 1988; CROCKER et al, 1987; CROCKER & NAR, 1987). A fixação também interfere nos resultados obtidos, isto é, o tipo de fixador usado, além do tempo decorrido entre a remoção da peça e sua fixação podem alterar substancialmente o acesso às NORs (GRIFFITHS et al, 1989). Sabe-se que o mecanismo da reação argirofílica envolve os grupos sulfidríla (S-H) que formam micro depósitos de prata, enquanto os grupos carboxila (C = O) reagem com o metal, resultando nos pontos negros visíveis ao microscópio. Deste modo, a formalina, que forma pontes de metileno entre os grupos sulfidríla e carboxila adjacentes, pode inibir a sua reação com a prata. A lavagem com álcool parece quebrar essas pontes, deixando os grupos ativos disponíveis para os íons metálicos. Além disso, as reações químicas envolvidas na fixação aldeídica são pH dependentes e se processam melhor em elevados valores de pH. Esse efeito, porém, parece ser irrelevante em relação as AgNORs, de vez que foi demonstrado que tanto o formol tamponado (pH 7,0) quanto o formol/cálcio (pH 5,8), o formol/salina (pH 6,5) ou o formol/ácido acético (pH 5,6) resultam em ótimas colorações (SMITH et al, 1988). Nosso material, embora não tenha sido submetido a rígido controle do

processo, apresentou colorações satisfatórias com fixação em formalina 10%, não tamponada.

Quanto à homogeneização da amostragem, a mesma, parece não ser absolutamente necessária, pois estudos sistemáticos demonstraram não haver interferência significativa sobre as contagens, as características de idade, sexo, ou estado de menopausa (CANEPA et al, 1993).

O processo de quantificação das AgNORs é controvertido, sendo que as determinações são realizadas basicamente por meio de dois métodos. No primeiro, o número real de AgNORs é dado pela contagem de cada ponto individual (intra e extranucleolar), mesmo quando se apresentem agrupados ou sobrepostos (SMITH & CROCKER 1988). O segundo envolve a quantificação dos pontos visivelmente isolados em cada núcleo, e os pontos sobrepostos ("clusters") são computados como um único (CANEPA et al, 1993; TOIKKANEN & JOENSUU, 1993). O primeiro procedimento fornece números duas a três vezes maiores, mas pode estar associado com considerável grau de variação do observador (GIRI et al, 1987). Discordamos desses argumentos e adotamos a técnica de contagem total, por considerá-la melhor e menos subjetiva, concordando com outros autores (PRASAD & RAY, 1993). Além disso, as contagens em duplicata realizadas em todos os casos não mostraram diferenças significantes entre si ($p < 0,001$). A eventual variação intra e interobservador pode ser parcialmente atribuída à perda de resolução da técnica, decorrente do reduzido tamanho dos pontos e, sobretudo, da sua grande tendência em se agregar, fenômeno frequente na fase proliferativa do ciclo celular, além da heterogeneidade das populações de células tumorais, ou da espessura do corte (CROCKER et al, 1989). Essas características poderiam dificultar a quantificação (HANSEN et al, 1992). O método de análise de imagem é sugerido como alternativa, pois as determinações são dadas pela medida da área ocupada pelos pontos (DERENZINI & TRERÉ, 1991). Sua limitação está no acesso a esse aparelho na prática rotineira. Para CROCKER et al (1989b), ambos os métodos discutidos apresentam bases racionais e não são excludentes. A padronização definitiva da quantificação não é

consensual ZALATNAI, LAPIS, FEHER, (1993), por exemplo, não utilizaram a objetiva de imersão, normalmente empregada na contagem, pois acreditavam que seu uso traz incertezas na enumeração. Esses autores encontraram diferenças significativas entre os grupos estudados, sem sobreposição nos valores individuais, e a variação interobservador foi baixa (2 a 6%).

Nossos resultados da contagem das AgNORs, mostraram diferenças significativas entre os quatro grupos ($H = 25,33$, $p < 0,001$). Os três grupos não-neoplásicos diferiram significativamente do grupo neoplásico maligno ($p < 0,05$). Nota-se que os valores foram crescentes da mucosa normal para a neoplásica, passando pelos grupos intermediários, concordando com os achados de ROSA et al (1990a) e SUAREZ et al (1989). Os valores das contagens de AgNORs variaram de 2,27 a 6,34, com média de 3,83 "pontos" por núcleo. Observamos alguma disparidade comparando os nossos com os valores encontrados na literatura (ROWLANDS, 1988; EGAN et al, 1987; TOIKKANEN & JOENSUU, 1993), que variaram entre os números de 1,00 a 18,5 AgNORs/núcleo. Pode-se observar ainda, considerável sobreposição na distribuição de pontos entre grupos, em particular, entre inflamatórios e displásicos (figura 3B). Foi estabelecido um ponto de corte entre os grupos normal e neoplásico no valor aproximado de 3,5 AgNORs/núcleo. Essa distinção entre células epiteliais benignas e malignas no estômago foi demonstrada por outros autores (SPATZ et al, 1990; ROSA et al, 1990a). SUAREZ et al (1989), além dessas diferenças, mostraram do mesmo modo sobreposição de valores, especialmente nos grupos regenerativo e neoplásico. Esse fenômeno parece não ser incomum, e foi descrito na comparação de células malignas e benignas da tireóide (NAIRN, CROCKER, McGOVERN, 1988), neoplasia intraepitelial da cérvix uterina (ROWLANDS et al, 1988), lesões endometriais (WILKINSON et al, 1990) e tumores de próstata (SCHENED, 1993). A superposição intergrupos parece, portanto, limitar a utilização da técnica no diagnóstico diferencial de lesões intermediárias, quando se consideram as contagens isoladamente. Este fato está melhor ilustrado no gráfico da figura 5B, onde as curvas representam a distribuição teórica das populações de casos não-

neoplásicos (inflamatórios/displásicos) e neoplásicos. Foi determinado um ponto de intersecção no valor de 4,7 AgNORs/núcleo e a área comum delimitada mostra que 10,32% da população não-neoplásica encontram-se dentro da distribuição neoplásica e 38,78% dos casos neoplásicos podem ser encontrados na primeira distribuição. Pode-se, portanto, assumir que há aproximadamente, 50% de possibilidade de falso positivo e/ou negativo.

É provável que as contagens de AgNORs observadas nos tecidos malignos maiores que em seus correspondentes normais, reflita maior atividade ribossomal em células ativamente proliferantes (DERENZINI & TRERÈ, 1991). De fato, foi demonstrado que a quantidade de AgNORs estaria relacionada com a velocidade de duplicação celular, que quanto mais rápida, maiores os seus números (TRERÈ et al, 1989; DERENZINI et al, 1989a). Por outro lado, é de especial interesse a observação de que o núcleo da célula tumoral, além de maior número de AgNORs, tende a apresentá-los sistematicamente maiores e mais polimórficos. Esta característica foi descrita em outros estudos realizados na mucosa gástrica (SUAREZ et al, 1989). De ROSA et al.(1992) observaram que a distribuição dos pontos argirofílicos em carcinoma de células basais tipo 2, na pele, se apresentou de forma mais dispersa e irregular que no tipo 1. Dada a impossibilidade de se quantificar tal observação, os autores sugeriram que o aspecto das AgNORs pode fornecer informações adicionais na identificação desses carcinomas. Essas formas aberrantes foram características também em células carcinomatosas do timo (TATAYAMA et al, 1993). Além disso, estudos realizados em vários tecidos mostraram que o tamanho dos agrupamentos de pontos argirofílicos, mais que seu número, correlacionou-se consistentemente com o estado proliferativo das células (LEEK et al, 1991). É provável que esses parâmetros sejam diferentes formas da mesma variável, isto é, a maior expressão das proteínas associadas às NORs resulta em maiores "clusters" que, por sua vez, representam simplesmente, uma coalescência dos pontos que não podem ser distinguidos como unidade (QUINN & WRIGHT, 1993). As alterações morfológicas do nucléolo em células cancerosas foram descritas por TRERÈ et al. (1989). Já DERENZINI et al (1988) e

TAKANO, 1993). Realmente, há evidências de que PCNA e AgNORs sejam expressos em diferentes componentes do ciclo celular (DELAHUNT et al, 1993; YU et al, 1992).

Em dois sistemas completamente diferentes, por meio de colorações sequenciais, foi observado um fenômeno similar em relação aos resultados obtidos por PCNA e AgNOR. O primeiro deles foi realizado numa série de linfomas de alto e baixo graus de malignidade (SMITH et al, 1993), o outro, foi feito em mucosa gástrica normal e hiperproliferativa de ratos (GRAY et al, 1992). Nos dois casos, as contagens de AgNORs foram maiores nas situações de maior proliferação hiperplasia e neoplasias respectivamente, tanto nas células positivas quanto nas negativas para o PC10. As elevadas contagens de AgNORs em células negativas para o PCNA em tecidos neoplásico e hiperplásico podem refletir a propriedade das proteínas associadas às NORs de terem ainda maior meia vida que esse antígeno, que é de aproximadamente 20 horas (HALL et al, 1990). Outra possibilidade é de serem tantas as proteínas que se coram, que a impregnação argêntica pode, eventualmente, ser inespecífica. A afirmação seria verdadeira inclusive, para células fora do processo de divisão (DARNTON et al, 1992).

Estas afirmações poderiam, pelo menos em parte, explicar a perda de correlação encontrada entre as duas determinações à medida em que o tecido se torna menos diferenciado. Devemos salientar, ainda, que nessas condições a expressão do antígeno de proliferação pode estar desregulada, obedecendo a estímulos provenientes da secreção autócrina de fatores des crescimento (HALL et al, 1990), levando à sua superexpressão, decorrente da detecção em células fora do ciclo. Desta forma, a imuno-reatividade do PC10 pode ocorrer sem uma estrita relação com neoplasia (McCORMICK & HALL, 1992). É fundamental ao patologista, portanto, ao empregar reagentes imunológicos, interpretá-los com cuidado, ser criterioso nas conclusões e sempre considerar a biologia das moléculas investigadas.

RUSCHOFF et al (1990), relataram que menor número e tamanho das AgNORs são características de células tumorais e que o contrário seria propriedade das condições normais.

Muito embora nossos resultados não tenham permitido nítida distinção entre as diferentes condições da mucosa gástrica somente pela quantificação das AgNORs, nossos dados sugerem essa possibilidade, já que a dispersão das NORs é uma reconhecida propriedade das células malignas (LEEK et al, 1991; SUAREZ et al, 1989; De ROSA et al, 1992; SIVRIDIS et al, 1993). Realmente, essa tendência, somada à irregularidade morfológica e elevadas contagens, foi confirmada em nosso estudo, bem como em outros (SIVRIDIS et al, 1993; ZALATNAI et al, 1993; CAIRNS et al, 1989).

Dos resultados expostos podemos concluir que o comportamento de ambos os marcadores de proliferação - PCNA e AgNOR- foi bastante semelhante em relação à mucosa gástrica. A análise de regressão linear comparando as duas determinações em cada grupo histológico mostrou que apresentam positiva e significativa correlação entre si nas condições normal e inflamatória ($r=0,7$ e $0,5$, respectivamente). Esta relação desaparece nas situações de menor diferenciação, ou seja, a displasia e a neoplasia. Foi igualmente demonstrada uma ausência de correlação em melanomas (EVANS et al, 1992), em tumores mesenquimatosos gastrointestinais (YU et al, 1992) e carcinomas de ducto biliar (SUSUKI & TAKANO, 1993). Ao contrário, uma boa correlação entre os métodos foi descrita em tumores do sistema nervoso central (KORKOLOPOULOU et al, 1993a), em linfomas não-Hodgkin (KORKOLOPOULOU et al, 1993b) e em carcinomas de células transicionais da bexiga (SKOPELITOU et al, 1992).

Admite-se que o número de AgNORs em condições normais varia de acordo com o estágio de proliferação em que as células se encontram, aumentando na fase S e início de G3 e diminuindo no final desta, em direção às fases S e G2, no sentido oposto ao do PCNA. Assim, é muito provável, que as proteínas associadas às NORs tenham funções distintas daquelas do PCNA (SUSUKI &

O método de coloração pela prata das proteínas associadas às NORs nos parece discriminar melhor as diversas condições da mucosa gástrica, variando numericamente entre limites mais restritos que o PC10 e, mais importante que sua quantificação, sua morfologia parece desempenhar relevante papel como marcador de malignidade.

CONCLUSÕES

- I - Os índices de PCNA (PC10) e os números de AgNORs são estatisticamente diferentes nos carcinomas do estômago em relação aos demais grupos.
- II - Apesar das diferenças estatísticas entre os grupos histológicos, a sobreposição dos valores impede a sua discriminação.
- III - Embora as proteínas detectadas - PCNA e AgNOR - estejam relacionadas com o processo de proliferação, representam diferentes componentes e fases do ciclo celular.
- IV - A imunoreatividade do anticorpo PC10 é adversamente influenciada por má fixação do tecido, heterogenidade das neoplasias e, em grau variável, por propriedades intrínsecas ao anticorpo e sistema de detecção.
- V - A técnica AgNOR é menos influenciada por variáveis da reação e numericamente oscila entre limites mais restritos.
- VI - As AgNORs se constituem marcadores morfológicos de malignidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, J.P. & GALLIMORE, A.P.- Núcleolar organizer regions in benign and malignant glandular lesions of the cervix. **J. Pathol.** 166:153-56, 1992.
2. BAUER, K.D.; CLEVINGER, C.V.; ENDOW, R.K.; MURAD, T.; EPSTEIN, A.L.; SCARPELLI, D.G.- Simultaneous nuclear antigen and DNA content quantification using parafin-embedded colonic tissue and multiparameter flow cytometry. **Câncer Res.** 46:2428-34, 1986.
3. BRAVO, R. & CELIS, J.E.- A search for differential polypeptide synthesis throughout of the cell cycle of HeLa cells. **J. Cell. Biol.** 84:795-802, 1980.
4. BRAVO, R. & McDONALD-BRAVO, H.- Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. **EMBO J.** 4:655-61, 1985.
5. BRAVO, R. & McDONALD-BRAVO, H.- Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during cell cycle: Association with DNA replication sites. **J. Cell. Biol.** 105:1549-554, 1987.
6. BUCKLEY, M.F.; SWEENEY, K.J.E.; HAMILTON, J.A.; SINI, R.L.; MANNING, D.L.; NICHOLSON, R.I. ;de FAZIO, A.; WATTS, C.K.W.; MUSGROVE, E.A.; SUTHERLAND, R.L.- Expression and amplification of cyclin genes in human breast câncer. **Oncogene** 8:2127-33, 1993.
7. CAIRNS, P.; SUAREZ, V.; NEWMAN, J.; CROCKER, J.- Núcleolar organizer regins in transional cell tumors of the bladder. **Arch. Pathol. Lab. Med.** 113:1250-52, 1989.

8. CAMPLEJOHN, R.S.; MACARTNEY, J.C.; MORRIS, R.W.- Measurement of S-phase fraction in lymphoid tissue: Fresh versus paraffin embedded tissue and 4',6'diamino-2, phenylindole dihydrochloride versus propidium iodide staining. *Cytometry* **10**:410-416, 1989.
9. CANEPA, M.; GAMBINI, C.; BORGIANI, L.; PASTORINO, A.; BUCCARAN, G.; GALLO, L. STORACE, A. ROVIDA, S.- Nucleolar organizer regions: a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma in the breast. *PATHOLOGICA* **85**:151-62, 1993.
10. CELIS, J.E.; BRAVO, R.; LARSEN, P.M.; FEY, S.J. Cyclin: A nuclear protein whose level correlates directly with the proliferative state of normal as well as transformed cells. *Leukemia Res.* **8**:143-57, 1984.
11. CHANG, C-D.; OTTAVIO, L.; TRAVALI, S.; LIPSON, K.E.; BASERGA, R. - Transcriptional and post-transcriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol. Cell. Biol.* **10**:3289-96, 1990.
12. CLARKE, A.M.T. & REID, W.A.- Combined proliferating cell nuclear and morphometric analysis in the diagnosis of cutaneous lymphoid infiltrates. *J. Clin. Pathol.* **46**:129-34, 1993.
13. COLTRERA, M.D.; SKELLY, M.; GOWN, A.M.- Anti-PCNA antibody PC10 yields unreliable proliferation indexes in routinely processed deparaffinized, formalin-fixed tissue. *Appl. Immunohistochem.* **1**:193-200, 1993.
14. CORREA, P.- A human model of gastric carcinogenesis. *Câncer Res.* **48**:3544-60, 1988.

15. CROCKER, J. & SKILBECK, N.- Núcleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. **J. Clin. Pathol.** 40:885-89, 1987.
16. CROCKER, J.; McCARTNEY, J.C.; SMITH, P.J.- Correlation between DNA flow cytometry and núcleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. **J. Pathol.** 154:151-56, 1988.
17. CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, M.J.- How should we count AgNORs? Proposal for a standardized approach. **J. Pathol.** 158:185-88, 1989.
18. CROCKER, J. & NAR, P.- Núcleolar organizer regions in lymphomas. **J. Pathol.** 151:111-18, 1987.
19. CROCKER, J.; AYRES, J.; McGOVERN, J.- Núcleolar organizer regions in small cell carcinoma of the bronchus. **Thorax** 42:972-75, 1987.
20. de CAPOA, A.; BALDINI, A.; MARLEKAJ, P.; NATOLI, C.; ROCCHI, M.; ARCHIDIACONO, N.; CIANFARANI, S.; SPADONI, G.L.; BOSCHERINI, B.- Hormone-modulated rRNA gene activity is visualized by selective staining of the NORs. **Cell. Biol. Intern. Rep.** 9:791-96, 1985.
21. De ROSA, G.; STAIBANO, S.; BARRA, E.; ZEPPA, P.; SALVATORE, G.; VETRANI, A.; PALOMBINI, L.- Núcleolar organizer regions in aggressive and nonaggressive basal cell carcinoma of the skin. **Câncer** 69:123-26, 1992.
22. DARNTON, S.J.; GRAY, M.R.; CROCKER, J.- Another cautionary note on the use of PCNA and AgNORs as markers of proliferation. **J. Pathol.** 168:87, 1992.

23. DAWSON, A.E.; NORTON, J.A.; WEINBERG, D.S.- Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. **Am. J. Pathol.** 136:1115-24, 1990.
24. DELAHUNT, B.; BETHWAITE, P.B.; NACEY, J.N.; RIBAS, J.L.- Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: Comparison with tumor grade, mitotic index and silver-staining nucleolar organizer region numbers. **J. Pathol.** 170:471-77, 1993.
25. DELAHUNT, B.; BETHWAITE, P.B.; NACEY, J.N.; RIBAS, J.L.- Variation in AgNOR scores for renal cell carcinoma. **J. Pathol.** 168:424-25, 1992.
26. DERENZINI, M.; BETTS, C.M.; CECCARELLI, C.; EUSEBI, V.- Ultrastructural organization of nucleoli in benign nevi and malignant melanomas. **Virchow's Arch. (B)**:52:343-52, 1986.
27. DERENZINI, M.; ROMAGNOLI, T.; MINGAZZINI, P.; MARINOZZI, V.- Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. **Virchow's Arch.(B)** 54:334-40, 1988.
28. DERENZINI, M.; PESSION, A.; FARABEGOLI, F.; TRERÉ, D.; BADIALI, M.; DEHAN, P.- Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. **Am. J. Pathol.** 134:925-34, 1989.
29. DERENZINI, M. & TRERÉ, D.- Importance of interphasic nucleolar organizer regions in tumor pathology. **Virchow's Arch.** 61:1-8, 1991.

30. DERVAN, P.A.; MAGEE, H.M.; BUCKLEY, C.; CARNEY, D.N.- Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed,paraffin-embedded tissue correlates with Ki-67 in fresh tissue. **Am. J. Clin. Pathol.** 97:S21-28, 1992 (suplemento 1).
31. DIEBOLD, J.; LAI, M.D.; LOHRS, U.- Analysis of proliferative activity in colorectal mucosa by immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): Methodological aspects and application to routine diagnostic material. **Virchow's Arch.(B)** 62:283-89, 1992.
32. DUNPHY, W.G.& NEWPORT, J.W.- Unraveling of mitotic control mechanisms. **Cell.** 55:925-28, 1988.
33. EGAN, M.J.; RAAFAT, F.; CROCKER, J.; SMITH, K.- Núcleolar organizer regions in small cell tumors of childhood. **J. Pathol.** 153:275-80, 1987.
34. EVANS, A.T.; BLESSING, K.; ORREL, J.M.; GRANT, A.- Mitotic indeces,anti-PCNA immunostaining and AgNORs in thick cutaneous melanomas displaying paradoxal behaviour. **J. Pathol.** 168:15-22, 1992.
35. FALK, V.G.; NOVELLI, M.R.; WRIGHT, N.A.; ALEXANDER, N.- Gastric displasia: inter-observer variation,sulphomucin staining and núcleolar organizer region counting. **Histopathology** 16:141-49, 1990.
36. FENOGLIO-PREISER, C.M.; LANTZ, P.E.; LISTOM, M.B.; DAVIS, M.; BILKE, F.O. - The neoplatri Stomach. In: ____ - Gastrointestinal Pathology. New York, Raven Press, 1989. p.193-223.
37. FIELD, D.H.; FITZGERALD, P.H.; SINN, F.Y.T. - Núcleolar silver-staining proteins related to cell cycle phase and cell generation of PHA-stimulated human lymphocytes. **CYTOBIOS** 41:23-33, 1984.

38. FILIPE, M.I.; MENDES, R. LANE, D.P.; MORRIS, R.W.- Assessment of proliferating cell nuclear antigen expression in precursor stages of gastric carcinoma using the PC10 antibody to PCNA. **Histopathology** **22**:349-54, 1993.
39. FREEMAN, J.; KELLOCK, D.B.; CROCKER, J.; YU, C.C-W.; LEVINSON, D.A.; HALL, P.A.- Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) and nucleolar organizer regions in Hodgkin'desease:Correlation with morphology. **J. Clin. Pathol.** **46**:446-49, 1993.
40. FRIEDLANDER, M.L.; HEDLEY, D.W.; TAYLOR, I.W. - Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumors. **J. Clin. Pathol.** **37**:961-74, 1984.
41. GALAND, P. & DEGRAEF, C. - Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S-phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. **Cell. Tissue Kinet** **22**:383-92, 1989.
42. GARCIA, R.L.; COLTRERA, M.D.; GOWN, A.M. - Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues: Comparison with flow cytometric analysis. **Am. J. Pathol.** **134**:733-39, 1989.
43. GAZITT, Y.; ERDOS, G.W.; COHEN, R.J.- Ultrastructural localization and fluctuation in the level of the proliferating cell nuclear antigen and myc oncoproteins in synchronized neuroblastoma cells. **Câncer Res.** **53**:1899-905, 1993.

44. GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISH, H.; WACKER, H-H.; SCHWAB, U.; STEIN, H.- Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J. Immunol.** **133**:1710-1715, 1984.
45. GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H.- Production of a mouse monoclonal antibody reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Câncer** **31**:13-20, 1983.
46. GERDES, J.; LI, L.; SCHLUETER, C.; DUCHROW, M.; WOHLLENBERG, C.; GERLACH, C.; STAHRMER, I.; KLOTHS, S.; BRANDT, E.; FLAD, H-D. - Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am. J. Pathol.** **138**:867-73, 1991.
47. GIRI, D.D.; DUNDAS, S.A.C.; SANDERSON, P.R.; HOWAT, A.J. - Silver-binding nûcleoli and nûcleolar organizer regions in fine needle aspiration cytology of the breast. **Acta. Cytol.** **33**:173-75, 1989.
48. GRAEM, N. & HEWELG-LARSEN, K.- Mitotic activity and delay in fixation of tumor tissue. **APMIS Scand.A** **87**:375-78, 1979.
49. GRAY, M.R.; DARNTON, S.J.; HUNT, J.A.; IRLAN, R.W.; WILLIAMS, D.F.; KINGNORTH, A.N. - Localization and quantification of accelerated gastric epithelial proliferation by computer aided image analysis of PCNA immunostaining and AgNOR counts lends insight into cell cycle events. **J. Pathol.** **167**:103A, 1992 (resumo).
50. GRIFFITHS, A.P.; BUTLER, C.W.; ROBERTS, P.; DIXON, M.F.; QUIRKE, P.- Silver-stained structures(AgNORs) their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. **J. Pathol.** **159**:121-27, 1989.

51. HALL, P.A.; CROCKER, J.; WATTS, A.; STANSFELD, A.G.- A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. **Histopathology** 12:373-81, 1988.
52. HALL, P.A.; LEVINSON, D.A. Review: Assessment of cell proliferation in histological material. **J. Clin. Pathol.** 43:184-92, 1990.
53. HALL, P.A.; LEVINSON, D.A.; YU, C.C.-W.; KELLOCK, D.B.; WATKINS, J.A.; BARNES, M.; GILLET, C.E.; COMPLEJOHN, R.; DOVER, R.; WASEEN, N.H.; LANE, D.P.- Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation expression in some neoplasms. **J. Pathol.** 162:285-94, 1990.
54. HALL, P.A. & WOODS, A.L. - Immunohistological markers of cell proliferation: Achievements, problems and prospects. **Cell Tissue Kinect.** 23:531-49, 1990.
55. HANSEN, A.B.; BJERREGAARD, B.; OVESEN, H.; HORN, T. - AgNOR counts and histological grade in stage pTa bladder tumors: reproducibility and relation to recurrence pattern. **Histopathology** 20:257-62, 1992.
56. HANSEN, A.B. & OSTERGARD, B.- Nucleolar organizer regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue. **Virchow's Arch.(A)** 417:9-13, 1990.
57. HELL, K.; LORENZEN, J.; HANSMANN, M.L.; FELLBAUM, C.; BUSH, R.; FISCHER, R.- Expression of the proliferating cell nuclear antigen in the different types of Hodgkin's disease. **Am. J. Clin. Pathol.** 99:598-603, 1993.

58. HOWAT, A.J.; GIRI, D.D.; WRIGHT, A.L.; UNDERWOOD, J.C.E. - Silver-stained núcleoli and núcleolar organizer region counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. **J. Pathol.** 156:227-32, 1988.
59. HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. - Controlled silver-staining of núcleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. **Experientia** 36:1014-16, 1980.
60. HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H.- A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.** 75:734-38, 1981.
61. JAIN, S.; FILIPE, M.I.; HALL, P.A.; WASEEN, N.; LANE, D.P.; LEVINSON, D.A.- Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. **J. Clin.Pathol.** 44:655-59, 1991.
62. JAN-MOHAMED, R.M.; ARMSTRONG, S.J.; CROCKER, J.; LEYLAND, M.J.; HULTEN, M.A.- The relationship between number of interphase NORs and NOR-bearing chromosomes in non-Hodgkin's lymphoma. **J. Pathol.** 158:3-7, 1989.
63. JASKULSKI, D.; DeREIL, J.K.; MERCER, W.E.; CALABRETTA, B.; BASERGA, R.- Inhibition of cellular proliferation by ntisense oligo deoxynúcleotides to PCNA cyclin. **Science** 240:1544-46, 1988.
64. KAKEJI, Y.; KORENAGA, D.; TSUJITANI, S.; HARAGUCHI, M.; MAEHARA, Y.; SUGIMACHI, K.- Predictive value of Ki-67 and argyrophilic núcleolar organizer region staining in limph node metastasis in gastric câncer. **Câncer Res.** 51:3503-06, 1991.

65. KAMEL, O.W.; LEBRUN, D.P.; DAVIS, R.E.; BERRY, G.J.; WARNKE, R.A.- Growth fraction estimation of malignant lymphomas in formalin-fixed paraffin-embedded tissue using anti-PCNA/cyclin 19A2. Correlation with Ki-67 labeling. **Am. J. Pathol.** **138**:1471-77, 1991.
66. KAMEL, O.W.; FRANKLIN, W.A.; RINGER, J.C.; MEYER, J.S. - Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in lesions of the breast. **Am. J. Pathol.** **134**:107-113, 1989.
67. KANIATIS, J.; HOYO, E.; HEMIER, C.; CHOUVET, B.; TRIVOLET, J. - Núcleolar organizer region enumeration in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas of the skin. **Câncer** **69**:2937-2941, 1992.
68. KAUDEWITZ, P.; BRAUN-FALCO, O.; ERNST, M.; LANDTHALER, M.; SHOLZ, W.; GERDES, J. - Tumor cell growth fraction in human malignant melanomas and the correlation to histopathologic tumor grading. **Am. J. Pathol.** **134**:1036-1048, 1989.
69. KNUECHEL, R.; BURGAN, M.; RUSCHOFF, J.; HOFSTEADTER, F. - Proliferating cell nuclear antigen in normal urothelium and urothelial lesions of the urinary bladder: a quantitative assessment using a true color image analyses system. **Virch. Arch. (B)** **64**:137-144, 1993.
70. KORKOLOPOULOU, P.; CHRISTODOULOU, P.; PAPANIKOLAU, A.; THOMAS-TSAGLI, E. - Proliferating cell nuclear antigen and núcleolar organizer regions in CNS tumors: Correlation with histological type and tumor grade. **Am. J. Surg. Pathol.** **17**(9): 912-919, 1993a.

71. KORKOLOPOULOU, P.; PATESOURIS, E.; PANGALIS, G.; TSENGA, A.; ELEME NOGLOU, J.; THOMAS-TSANGLI, E.; SPANDIDOS, D.; KITTAS, C.- A comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), c-myc PC2 and nucleolar organizer region (NOR) staining in non-Hodgkin's lymphomas: a histochemical and immunohistochemical study of 200 cases. **Hum. Pathol.** 24:371-377, 1993b.
72. LAMMIE, G.A.; FANTL, V.; SMITH, R.; SCHUURING, E.; BROOKES, S.; MICHAELIDES, R.; DICKSON, C.; ARNOLD, A.; PETERS, G.- D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1. **Oncogene** 6:439-44, 1991.
73. LANDERBERG, G. & ROOS, G.- Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in human malignant hematopoietic cells. **Acta Oncol.** 30:917-21, 1991.
74. LEEK, R.D.; ALISON, M.R.; SARRAF, C.E.- Variation in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. **J. Pathol.** 165:43-51, 1991.
75. LEHNERT, T. & DESCHENER, E.E.- Cell Kinetics in gastric cancer and pre-cancer. In: FILIPE, M.I.; JASS, J.R. eds. Gastric Carcinoma. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1986; p. 45-67. apud FILIPE et al, 1993.
76. LEMOINE, N.R.; JAIN, S.; SILVESTRE, F.; LOPES, C.; HUGHES, C.M.; McLELLAND, E.; GULLICK, W.J.; FILIPE, M.I.- Amplification and overexpression of EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer. **Br. J. Cancer** 64:79-83, 1991.

77. LEONARDI, E.; GIRLANDO, S.; SERIO, G.; MAURI, F.A.; PERRONI, G.; SCAMPINI, S.; DALLA PALMA, P.; BARBARESCHI, M.- PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma:Correlations with clinical and biological variables. **J. Clin. Pathol.** 45:416-19, 1992.
78. LINDEN, M.D.; TORRES, F.X.; KUBUS, J.; ZARBO, R.J.- Clinical applications of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. **Am. J. Clin. Pathol.** 97:S4-13, 1992 (suplemento 1).
79. LISCHWE, M.A.; SMETANA, K.; OLSON, O.J.; BUSCH, H.- Proteins C23 and B23 are the major núcleolar silver staining proteins. **Life Sci.**25: 701-8, 1979.
80. MALAISE, E.P.; CHAVAUDRA, N.; TUBIANA, M. - The relationship between growth rate,labelling index and biological type of human solid tumors. **Eur. J. Câncer** 9:305-12, 1973.
81. MALMSTRON, P.U.; WESTER, K.; VASKO, J.; BUSH, C. - Expression of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in urinary bladder carcinoma. Evaluation of antigen retrieval methods. **APMIS** 100:988-992, 1992.
82. McCORMICK, D. & HALL, P.A. - The complexities of proliferating cell nuclear antigen. **Histopatology** 21:591-594, 1992.
83. McCORMICK, D.; YU, C.; HOBBS, C.; HALL, P.A. - The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation associated antigens. **Histopathology** 22:543-547, 1993.
84. MERCER, W.E.; SHIELDS, M.T.; LIN, D.; APPELLA, E.; ULLRICA, S. - Growth supression induces by wild-type p53 protein is accompanied by selective down-regulation of proliferating-cell nuclear antigen expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88: 62, 1991.

85. MELLIN, W. - Cytophometry in tumor pathology a critical review of methods and applications, and some results of DNA analysis. **Pathol. Res. Pract.** **186**: 37-62, 1990.
86. MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAHU, R.; MILLER, O.J. - Supression of human núcleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. **Exp. Cell. Res.** **101**:235-243, 1976.
87. MIYACHI, K.; FRITZLER, M.J.; TAM, E.M.- Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. **J. Immunol.** **121**:2228-34, 1978.
88. MONTORINI, R.; GALLUZZI, C.M.; DIAMANTI, L.; GIANNULLIS, I.; PISANI, E.; SCARPELLI, M. - Prostatic intra-epithelial neoplasia: expression and location of proliferating cell nuclear antigen in epithelial, endothelial and stromal nuclei. **Virch. Arch. (A)**, **422**:185-192, 1993.
89. MORRIS, G.F. & MATHEWS, M.B. - Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. **J. Biol. Chem.** **264**:13856-64, 1989.
90. MOTOKURA, T.; BLOON, T.; KIM, H.G.; JUPPNER, H.; RUDERMAN, J.V.; KRONENBERG, H.M.; ARNOLD, A.- A novel cyclin encoded by a bcl-1-linked candidate oncogene. **Nature** **350**:512-15, 1991.
91. NAIRN, E.R.; CROCKER, J.; McGOVERN, J. - Limited value of AgNORs ennumerations in assessment of thyroid neoplasms. **J. Clin. Pathol.** **41**:1136, 1988.
92. NASIN, M.M.; THOMAS, D.M.; ALISON, M.R.; FILIPE, M.I. - Transforming growth factor alfa expression in normal gastric mucosa, intestinal metaplasia, dysplasia and gastric carcinoma: an immunohistochemical study. **Histopathology** **20**:339-433, 1992.

93. NEWBOLD, K.M.; ROLLASON, T.P.; LUESLEY, D.M.; WARD, K.-
Núcleolar organizer regions and proliferative index in glandular and
squamous carcinoma of the cervix. **J. Clin. Pathol.** 42:441-42, 1989.
94. OCHS, R.L. & BUSH, H.- Further evidence that phosphoprotein C23(110kDa/
p15,1) is the núcleolar silver staining protein. **Exp. Cell. Res.** 152:260-
65, 1984.
95. ODA, Y.; HASHIMOTO, H.; TAKISHITA, S.; TSUNEYOSHI, M.- The
prognostic value of immunohistochemical staining for proliferating cell
nuclear antigen in synovial sarcoma. **Câncer** 72:478-85, 1993.
96. O'REILLY, S.M.; CAMPLEJOHN, R.S.; BARNES, D.M.; MILLES, R.R.;
RICHARDS, M.A.- DNA index, S-phase fraction and prognosis in breast
câncer. **Br. J. Câncer** 59:825A, 1989 (resumo).
97. PANDLETON, N.; DIXON, G.R.; BURNETT, H.E.; OCCLESTON, N.L.;
MYSKOW, M.W.; GREEN, J.A.- Expression of proliferating cell
nuclear antigen (PCNA) in dysplasia of the bronchial epithelium. **J.**
Pathol. 170:169-72, 1993.
98. PARDEE, A.B.- G1 events and regulation of cell proliferation. **Science**
246:603-8, 1989.
99. PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON,
F.; ADNET, J.J.- Improvement in the staining and the visualization of the
argyrophilic proteins of the núcleolar organizer regions at the optical
level. **Histochem. J.** 18:5-14, 1986.
100. PRASAD, C.A. & RAY, J.A.- Significance of núcleolar organizing reg ions
in ovarian epithelial tumors. **Surg. Pathol.** 5:151-60, 1993.

101. QUINN, C.M. & WRIGHT, N.A.- The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors evaluation of methods and applications as prognostic variables. **J. Pathol.** **160**:93-102,1990.
102. RABERNHORST, S.H.; BURINI, R.C.; SCHMITT, F.C.L. - Marcadores de proliferação celular. **Rev. Bras. Pat. Clin.** **29**:24-9, 1993.
103. RIGAUD, C. & BOGOMOLETZ, W.V.- Apparent lack of usefulness of monoclonal antibody Ki-67 in thyroid tumor pathology: Relation to histologic typing and classification. **Pathol. Res. Pract.** **187**:198-200, 1991.
104. ROOS, G.; LANDBERG, G.; HUFF, J.P.; HOUGHTEN, R.; TAKASAKI, Y.; TAN, E.M. - Analysis of the epitopes of proliferating cell nuclear antigen recognized by monoclonal antibodies. **Lab. Invest.** **68**: 204-10, 1993.
105. ROSA, J.; MEHTA, A.; FILIPE, M.I. - Núcleolar organizer regions, proliferative activity and DNA index in gastric carcinoma. **Histopathology** **16**:614-16, 1990a.
106. ROSA, J.; MEHTA, A.; FILIPE, M.I. - Núcleolar organizer regions in gastric carcinoma and its precursor estages. **Histopathology** **16**:265-69, 1990b.
107. ROSA, J.C.; MENDES, R.; FILIPE, M.I.; MORRIS, R.W.- Measurement of cell proliferation in gastric carcinoma: comparative analysis of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Histochem. J.** **24**:93-101, 1992.
108. ROWLANDS, D.C.- Núcleolar organizing regions in cervical intraepithelial neoplasia. **J. Clin. Pathol.** **41**:1200-2, 1988.

109. RUSCHOFF, J.; BITTINGER, A.; NEWMAN, K.; SCHMITZ-MOORMANN, P. - Prognostic significance of nucleolar organizing regions (NORs) in carcinomas of the sigmoid colon and rectum. **Pathol. Res. Pract.** **186**:85-91, 1990.
110. SASAKI, K.; MURAKAMI, T.; KAWASAKI, M.; TAKAHASHI, M. - The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. **J. Cell. Physiol.** **133**:579-84, 1987.
111. SCHIMID, C.; SWEENEY, E.; ISAACSON, P.G. - Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in Hodgkin's disease. **J. Pathol.** **168**:1-6, 1992.
112. SCHENED, A.R.- Nucleolar organizer regions as discriminators for the diagnosis of well differentiated adenocarcinoma of the prostate. **Arch. Pathol. Lab. Med.** **117**: 1000-4, 1993.
113. SCHRAPE, S.; JONES, D.B.; WRIGHT, D.H.- A comparison of the three methods for the determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphoma. **Br. J. Cancer** **55**:283-86, 1987.
114. SCHWARTING, R.; GERDES, J.; NIEHUS, J.; JAESCHKE, L.; STEIN, H.- Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. **J. Immunol. Meth.** **90**:65-70, 1986.
115. SCOTT, R.J.; HALL, P.A.; HALDANE, J.; Van NOORDEN, S.; PRICE, Y.; LANE, D.P.; WRIGHT, N.A.- A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. **J. Pathol.** **165**:173-78, 1991.

116. SHEPHERD, N.A.; RICHMAN, P.I.; ENGLAND, J. - Ki-67 derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlation. **J. Pathol.** **155**:213-19, 1988.
117. SHIVJI, M.K.K.; KENNY, R.D.; WOOD, R.D. - Proliferating nuclear antigen is required for DNA excision and repair. **Cell** **69**:367-74, 1992.
118. SHURBAJI, M.S.; BROOKS, S.K.; THURMOND, T.S. - Proliferating cell nuclear antigen immunoreactivity in cervical intraepithelial neoplasia and benign cervical epithelium. **Am. J. Clin. Pathol.** **100**:22-6, 1993.
119. SIITONEN, N.M.; ISOLA, J.J.; RANTALA, I.S.; HELIN, H.J.- Intratumor variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody and automated image analysis. **Am. J. Clin. Pathol.** **99**:226-31, 1993.
120. SIVRIDIS, E.; ANASTASIADIS, P.; DIAMANTOPOULOS, P.; AGNANTIS, J.N. - The prognostic significance of AgNOR counts in lymph node deposits of breast carcinomas. **Pathol. Res. Pract.** **189**:877-81, 1993.
121. SMITH, F.G.; MURRAY, P.G.; CROCKER, J.- Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique. **J. Clin. Pathol.** **46**:28-31, 1993.
122. SMITH, P.J.; SKILBECK, N.; HARRISSON, A.; CROCKER, J. - The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. **J. Pathol.** **155**:109-12, 1988.
123. SMITH, R. & CROCKER, J.- Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. **Histopathology** **12**:113-25, 1988.

124. SKOPELITOU, A.; KORKOLOPOULOU, P.; PAPANIKOLAO, A.; CHRISTODOULOU, P.; THOMAS-TSAGLI, E.; PAVLAKIS, K. - Comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder: correlation with other conventional prognostic pathologic parameters. *Eur. Urol.* **22**:235-40, 1992.
125. SPATZ, A.; KHATTECH, A.; PRADE, M.; ADNET, J.J.; DUVILLARD, P.; BOGNEL, C.; CHARPENTIER, P.; BELLEFGIH, S.; ROUGIER, P. - AgNORs in evaluation of neo-adjuvant chemotherapy for gastric adenocarcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* **16**:468-69, 1990.
126. START, R.D.; CROSS, S.S.; CLELLAND, C.; SILCOCKS, P.B.; ROGERS, K.; SMITH, J.H. - Delay in fixation does not affect the immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J. Pathol.* **168**:197-99, 1992.
127. SUAREZ, V.; NEWMAN, J.; HILEY, C.; CROCKER, J.; COLLINS, M. - The value of NOR numbers in neoplastic and non-neoplastic epithelium of the stomach. *Histopathology* **14**:61-6, 1989.
128. SUSUKI, T. & TAKANO, Y.- Comparative immunohistochemical studies of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression and argyrophilic nucleolar organizer regions in pancreatic duct cell carcinomas. *Jpn. J. Câncer Res.* **84**:1072-77, 1993.
129. TAKASAKI, Y.; OHGAKI, M.; KODAMA, A.; OGATA, K.; HASHIMOTO, H.; SHIRAI, T.; HIROSE, S-I.- A sandwich type enzyme-linked immunosorbent assay for proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin using monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* **132**:227-37, 1990.

130. TATAYAMA, H.; MIZUNO, T.; TADA, T.; EIMOTO, T.; HASHIMOTO, T.; MASÅOKA, A. - Thymic epithelial tumors: evaluation of malignant grade by quantification of proliferating cell nuclear antigen and núcleolar organizer regions. *Virchow's Arch.(A)* 422:265-69, 1993.
131. THEUNISSEN, P.H.M.H. & BLAAUW, G.- Proliferating cell nuclear antigen immunostaining and survival in cerebral astrocytoma. *Histopathology* 23:75-9, 1993.
132. THEUNISSEN, P.H.M.H.; LEERS, M.P.G.; BOLLEN, E.C.M.- Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) expression in formalin-fixed tissue of non-small cell lung carcinoma. *Histopathology* 20:251-55, 1992.
133. THOMAS, M.; NOGUCHI, M.; KITAGAWA, H.; KINOSHITA, K.; MIYAZAKI, I.- Poor value of proliferating cell nuclear antigen labelling index in breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 46:525-28, 1993.
134. TOIKKANEN, S. & JOENSUU, H.- AgNOR counts have no prognostic value in breast câncer. *J. Pathol.* 169:251-54, 1993.
135. TRERÉ, D.; PESSION, A.; DERENZINI, M. - The silver-stained proteins of interphase núcleolar organizer region as a parameter of cell duplication rate. *Exp. Cell. Res.* 184:131-37, 1989.
136. TSUJI, T.; SRESTHA, P.; YAMADA, K.; TAGAGI, H.; SHINOZAKI, F.; SASAKI, K.; MAEDA, K.; MORI, M.- Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre-malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and the skin:an immunohistochemical study. *Virchow's Arch.(A)* 420: 377-83, 1992.
137. UNDERWOOD, J.C.E. & GIRI, D.D.- Núcleolar organizer regions as diagnostics discriminants for malignancy. *J. Pathol.* 155:95-6, 1988.

138. VISAKORPI, T. - Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. **J. Pathol.** 168:7-13, 1992.
139. WASEEN, N.H. & LANE, D.P. - Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) structural conservation and detection of a nucleolar form. **J. Cell. Sci.** 96: 121-29, 1990.
140. WILKINSON, N.; BUCKLEY, C.H.; CHAWNER, L.; FOX, H. - Nucleolar organizer regions in normal, hyperplastic and neoplastic endometria. **Int. J. Gynecol. Pathol.** 9:55-9, 1990.
141. WILLIAMS, M.A.; KLEINSCHMIDT, J.A.; KROHNE, G.; FRANKE, W.W. - Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of Xenopus laevis oocytes identified by gel electrophoresis. **Exp. Cell. Res.** 137:341-51, 1982.
142. WILSON, G.D.; McNALLY, N.J.; DISCHE, S.; SAUNDERS, M.I.; Des ROCHERS, C.; LEWIS, A.A.; BENNETT, M.H.- Measurement of cell kinetics in human tumors "in vivo" using bromodeoxyuridine incorporation and flow cytometry. **Br. J. Cancer** 58:423-31, 1988.
143. WITHERS, D.A.; HARVEY, R.C.; FAUST, J.B.; MELNYK, O.; CAREY, K.; MEEKER, T.C.- Characterization of a candidate bcl-1 gene. **Mol. Cell Biol.** 11:4846-53, 1991.
144. WOLF, H.K. & DITTRICH, K.L. - Detection of proliferating cell nuclear antigen in diagnostic histopathology. **J. Histochem. Cytochem.** 40:1269-73, 1992.

145. WOODS, A.L.; HALL, P.A.; SHEPHERD, N.A.; HANBY, A.M.; WASEEN, N.H.; LANE, D.P.; LEVINSON, D.A.- The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. **Histopathology** 19:21-7, 1991.
146. XIONG, Y.; ZHANG, H.; BEACH, D. - D type cyclin associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. **Cell** 71:505-14, 1992.
147. YANG, L.; HASHIMURA, K.; QUIN, C.; SHRESTHA, P.; SUMITOMO, S.; MORI, M.- Immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen in salivary gland tumors:an assessment of growth potential. **Virchow's Arch.(A)** 422:481-86, 1993.
148. YANG, A.H.; WANG, T.Y.; LIU, H.C.- Comparative study of the prognostic value of nuclear grade and silver-binding nucleolar organizer region in renal cell carcinomas. **J. Pathol.** 166:157-61, 1992.
149. YONEMURA, Y.; KIMURA, H.; OOHAYAMA, S.; KAMATA, T.; YAMAGUCHI, A.; MATSUMOTO, H.; NINOMIYA, I.; MIYASAKI, I.- Immunocytochemical staining of proliferating cells in endoscopically tissues of gastric carcinomas with monoclonal antibody Ki-67. **Oncology** 48:162-65, 1991a.
150. YONEMURA, Y.; OHYAMA, S.; KIMURA, H.; KAMATA, T.; MATSUMOTO, H.; YAMAGUCHI, A.; KOSAKA, T.; MIWA, K.; MIYAZAKI, I. - The expression of proliferative-associated nuclear antigen p105 in gastric carcinoma. **Câncer** 67:2523-28, 1991b.

151. YONEMURA, Y.; SUGIYAMA, K.; FUGIMURA, T.; De ARETXABALA, X.; KAMATA, T.; KOSAKA, T.; YAMAGUCHI, A.; MIWA, K.; MIYAZAKI, I.- Correlation of DNA ploidy and proliferative activity in human gastric cancer. *Câncer* 62:1497-502, 1988.
152. YONEMURA, Y.; KIMURA, H.; FUSHIDA, S.; TAGAWA, K.; NAKAI, Y.; KAJI, M.; FONSECA, L.; YAMAGUCHI, A.; MIYASAKI, I.- Analysis of proliferative activity using anti- proliferating cell nuclear antigen antibody in gastric cancer tissue specimens obtained by endoscopic biopsy. *Câncer* 71:2448-53, 1993.
153. YU, C.C-W.; FLETCHER, C.D.M.; NEWMAN, P.L.; GOODDLAD, J.R.; BURTON, J.C.; LEVINSON, D.A. - A comparison of proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunostaining, nucléolar organizer region (AgNOR) staining and histological grade in gastrointestinal stromal tumors. *J. Pathol.* 166:147-52, 1992.
154. YU, C.C-W.; HALL, P.A.; FLETCHER, C.D.M.; CAMPLEJOHN, R.S.; WASEEN, N.H.; LANE, D.P.; LEVINSON, D.A.- Hemangiopericytomas: the prognostic value of immunohistochemical staining with monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Histopathology* 19:29-33, 1991.
155. ZALATNAI, A.; LAPIS, K.; FEHER, I.- The nucléolar organizer regions in hyperplastic and tumorous lesions of the human liver. *Pathol. Res. Pract.* 189:536-41, 1993.