

Análise quantitativa das AgNORs no carcinoma adenóide cístico intra-oral através da técnica de dupla marcação PCNA/AgNOR

PCNA/AgNOR double staining technique in adenoid cystic carcinoma

Elena Riet-Correa Rivero¹
Maria Cássia Ferreira de Aguiar²

unitermos	resumo
Carcinoma adenóide cístico	<p>A análise quantitativa das AgNORs e a imunomarcagem para o PCNA têm sido empregadas de forma independente na avaliação da proliferação celular de vários tumores, e, em muitos casos, têm mostrado correlação positiva. Entretanto poucos trabalhos têm avaliado, em um mesmo corte histológico, a relação entre PCNA e AgNOR. O objetivo deste trabalho foi otimizar a técnica de dupla marcação com a finalidade de se estudar simultaneamente a correlação entre PCNA e AgNOR no carcinoma adenóide cístico (CAC) de glândulas salivares menores. Foram selecionados 16 casos de CAC classificados de acordo com o subtipo histológico. A análise quantitativa das AgNORs foi feita por meio de análise de imagens. As AgNORs foram contadas em cem núcleos PCNA positivos e em cem núcleos PCNA negativos. O número médio de AgNOR nos núcleos PCNA positivos foi $2,14 \pm 0,77$, e, nos núcleos PCNA negativos, $1,97 \pm 0,79$, entretanto esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa ($p = 0,2537$). Nosso trabalho não mostrou correlação entre o número de AgNOR e a imunomarcagem para o PCNA em CAC quando estes marcadores foram demonstrados simultaneamente através da dupla marcação. Quanto à técnica, o uso do microondas melhorou a coloração da AgNOR, permitindo uma redução no tempo de incubação com a solução de prata e uma melhor individualização das AgNORs, o que facilitou os procedimentos de contagem.</p>
AgNOR	
PCNA	
Dupla marcação	
Quantificação	

Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 39-44, 2002

39

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

abstract

key words

No previous studies have simultaneously assessed the relationship between AgNORs and PCNA expression in salivary gland tumors. We describe a method to demonstrate both PCNA and AgNORs in the same slice of routinely processed tissue. We also evaluated the effect of microwaving on the AgNORs reaction. Sixteen cases of adenoid cystic carcinoma (ACC) were selected and the double staining technique was performed in order to quantify the number of AgNORs in PCNA-positive and negative cells. The best results were obtained when AgNOR was performed after the immunostaining. The microwave oven heating improved the AgNORs staining. Our results did not show a statistical difference between the mean number of AgNORs in PCNA-negative and positive cells. There is no association between PCNA and AgNOR in ACC when they are assessed by double-staining.

Adenoid cystic carcinoma

AgNOR

PCNA

Double staining

Quantification

1. Mestranda em Patologia Odontológica pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Campus da Saúde – Belo Horizonte-MG.
2. Doutora em Patologia Bucal; professora da disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais – Campus da Pampulha. Processo CNPq 300410/98. Trabalho realizado na Faculdade de Odontologia da UFMG. Parte do trabalho de dissertação de mestrado de Elena Riet-Correa Rivero, do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina/UFMG, área de concentração: Patologia Odontológica – Dupla marcação PCNA/AgNOR em adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico. Trabalho apresentado no VIII Congresso e na XXVI Jornada Brasileira de Estomatologia, realizados em Brasília, no período de 19 a 22 de julho de 2000.

Introdução

As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são segmentos de DNA que transcrevem o RNA ribossômico e estão localizadas nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21, 22. As NORs estão diretamente relacionadas com a síntese protéica e, por esse motivo, se encontram aumentadas em número de acordo com o aumento da atividade celular (7). A técnica de AgNOR (argyrophilic proteins related to nucleolar organizer regions) se baseia na ligação da prata coloidal às proteínas ácidas, não-histônicas, associadas às NORs (18).

O antígeno de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear de 36kd, co-fator da polimerase delta, com importante papel na replicação do DNA. Durante o ciclo celular, esta proteína aparece em altas concentrações nas fases G1 tardia e S precoce (2, 3, 28). A imunomarcação para o PCNA tem sido muito utilizada na avaliação da proliferação celular de diversos tumores.

Muitos trabalhos avaliam a relação entre estes dois marcadores, AgNOR e PCNA, em tumores benignos e malignos, de forma independente (10, 14, 17, 38), ou simultaneamente, através da técnica de dupla marcação (6, 19, 23, 24, 30). De acordo com Munakata e Hendricks (23), a principal vantagem da técnica da dupla marcação é a possibilidade de análise direta entre os marcadores devido à co-localização dos mesmos. Desta forma, o problema da heterogeneidade das neoplasias é superado, pois a dupla marcação assegura que as AgNORs sejam analisadas em um mesmo tipo celular desejado (24, 30).

Por outro lado, apesar de a quantificação das AgNORs estar fortemente relacionada à proliferação celular e ao prognóstico em vários tumores (4, 5, 7, 21), os poucos estudos em tumores malignos de glândula salivar, em especial no carcinoma adenóide cístico (CAC), apresentam resultados que deixam ainda dúvidas quanto ao papel das NORs nestas lesões (12, 13, 36).

A coloração de AgNOR pode ser influenciada pelo processamento e pela fixação tecidual (8). O Comitê de Quantificação de AgNOR da Sociedade Européia de Patologia recomenda o uso do autoclave como forma de pré-tratamento na coloração por AgNOR, para se obter uma melhor qualidade de marcação, independente do tempo de fixação e estocagem do material em arquivo (34). O microondas, apesar de amplamente utilizado em imunoistoquímica, não é utilizado rotineiramente na técnica de AgNOR.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi padronizar a técnica de dupla marcação, utilizando-se o microondas como forma de pré-tratamento para a coloração pela AgNOR, com a finalidade de se estudar simultaneamente a correlação entre AgNOR e PCNA em carcinoma adenóide cístico de glândulas salivares menores, realizando a análise quantitativa das AgNORs nestas lesões.

Material e métodos

Foram utilizados 16 casos de CAC emblocados em parafina, provenientes dos arquivos do Serviço de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, da Universidade Federal de Uberlândia e da Universidade Federal de Pelotas. As lesões estavam localizadas em glândulas salivares menores. De acordo com o arranjo arquitetural predominante, os casos de CAC foram classificados como cribiformes, tubulares ou sólidos. Seis casos foram classificados como cribiformes, cinco como tubulares e cinco como sólidos.

Foram obtidos cortes de 3mm em lâminas previamente silanizadas para a realização da dupla marcação PCNA/AgNOR. A técnica de AgNOR foi realizada antes e após a imunoistoquímica. Tratamento dos cortes em forno de microondas, previamente à coloração pela prata, só foi realizado quando a técnica de AgNOR sucedeu a imunoistoquímica.

Os cortes passaram pelos processos de desparafinização e hidratação. Para a recuperação antigênica, os cortes foram levados ao forno de microondas (três ciclos de cinco minutos), mergulhados em ácido cítrico 10Mm, pH 6,0. O anticorpo primário utilizado foi o PC10 (Dako Corporation, Glostrup, Denmark), anti-PCNA, diluído em 1:100 e incubado por 18 horas a 4°C. Os anticorpos secundário e terciário (Biogenex, San Ramon, CA, EUA) foram diluídos em 1:20 e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Para revelação da reação utilizaram-se os cromógenos *new fuchsin* e *fast red* (Biogenex, San Ramon, CA, EUA).

Em seguida os cortes foram submetidos à técnica de AgNOR, de acordo com Ploton *et al.* (27), com algumas modificações, que incluíram lavagem abundante dos cortes com água corrente deionizada, previamente à incubação, com a solução de prata, e posteriormente com água deionizada aquecida. O tratamento dos cortes com cluidina também foi omitido.

Os cortes passaram previamente em solução de ácido acético/etanol (1:3) durante cinco minutos, foram lavados com etanol absoluto (três vezes) e deixados em água deionizada corrente por 15 minutos. Então foram secos com papel-filtro e receberam a solução aquosa de nitrato de prata (a 50%) misturada com solução de gelatina (a 2% em 1% de ácido fórmico) na proporção de 2:1. A solução de prata foi incubada em diferentes tempos (20', 25', 27', 30'), em temperatura ambiente e em estufa a 45°C, esta última sendo empregada apenas quando a técnica de AgNOR precedeu a imunoistoquímica, com um tempo de incubação de 25 minutos. A reação foi interrompida com a lavagem dos cortes em água deionizada.

Quando o cromógeno utilizado para a revelação foi o *new fuchsin*, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, clareados com xilol e montados em Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, EUA). Utilizando-se o cromógeno *fast red* após a revelação, os cortes foram lavados em água amoniacal a 10%, e as lâminas, montadas em meio aquoso. A técnica de AgNOR nestes casos sempre precedeu a imunoistoquímica.

A análise quantitativa das AgNORs foi feita por meio de imagens microscópicas captadas por uma câmara JVC TK-1270/RGB, digitalizadas no aumento de 1.000x, através do *software* KS300, contido no analisador de imagens Kontron Elektronik/Carl Zeiss. Para cada caso foram analisadas cem células PCNA positivas e cem células PCNA negativas. Foi realizada a contagem das AgNORs para cada núcleo em áreas representativas do tumor.

Resultados

A visualização da dupla marcação foi possível com a realização da técnica de AgNOR antes ou após a imunoistoquímica. Entretanto, quando a técnica de AgNOR foi realizada após a imunoistoquímica, obtivemos uma excelente visualização das NORs e melhor definição das células PCNA positivas, devido à menor coloração de fundo.

Neste trabalho definimos, então, como melhor protocolo para realização da dupla marcação PCNA/AgNOR, a técnica de AgNOR sempre sucedendo a imunoistoquímica. Neste caso, apesar dos bons resultados obtidos tanto quando da utilização da *new fuchsin* quanto do *fast red*, a opção pela primeira tornou-se obrigatória. O tempo ideal encontrado para incubação com a solução de prata, e que permitiu a melhor visualização das AgNORs, foi de 25 minutos em temperatura ambiente.

O padrão de expressão do PCNA caracterizou-se por forte marcação com padrão granular, com coloração vermelha intensa do núcleo. As AgNORs foram observadas como pontos acastanhados a negros no interior das células positivas e negativas para o PCNA (**Figura**).

No CAC, em geral, o número de AgNOR/núcleo variou de um a seis nas células PCNA negativas, com 74,6% dos núcleos analisados contendo de uma a duas AgNORs. Nas células PCNA positivas, o número de AgNOR variou de um a sete, com 68,8% dos núcleos contendo uma a duas AgNORs. Os números médios de AgNOR nas células PCNA positivas e PCNA negativas foram, respectivamente, 2,14 e 1,97. Esta diferença, entretanto, não se mostrou estatisticamente significativa ($p = 0,2537$ – teste *t* de Student).

Quando a análise quantitativa das AgNORs foi realizada separadamente nos diferentes tipos histológicos de CAC, independentemente da imunorreatividade para o PCNA, também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

A **Tabela** mostra os números médios das AgNORs encontrados para cada caso, de acordo com o subtipo histológico do tumor.

Discussão

A técnica de AgNOR tem sido amplamente utilizada como marcador de proliferação celular (4, 32) e na diferenciação entre tumores benignos e malignos do epitélio bucal (4) e de glândulas salivares (9, 22). Existem, entretanto, controvérsias quanto ao papel das AgNORs como marcadores de proliferação celular. Para alguns autores, o número de NOR pode estar associado com variações no

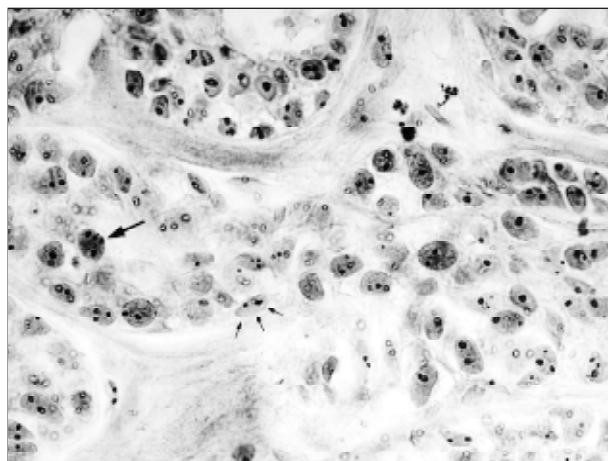


Figura – Dupla marcação PCNA/AgNOR em CAC. Observar a individualização das AgNORs nos núcleos PCNA positivos (seta maior) e PCNA negativos (setas menores) – imunoistoquímica – streptavidina + fosfatase alcalina/histoquímica – AgNOR (imersão, 1.000x)

Tabela

Valores percentuais referentes ao número das AgNORs dos núcleos PCNA positivos e PCNA negativos nos casos de CAC

Número do caso/ classificação histológica	Número médio de AgNORs/ núcleos PCNA positivos	Número médio de AgNORs/ núcleos PCNA negativos
1/cribiforme	1,95	1,42
2/cribiforme	2,08	1,87
3/cribiforme	2,36	2,22
4/cribiforme	1,98	1,95
5/cribiforme	2,47	2,56
6/cribiforme	2,39	2,30
7/tubular	1,35	1,29
8/tubular	1,54	1,69
9/tubular	1,79	1,92
10/tubular	1,95	2,08
11/tubular	2,27	1,93
12/sólido	2,65	1,82
13/sólido	2,56	1,91
14/sólido	2,03	1,76
15/sólido	2,32	2,01
16/sólido	2,55	2,79
Média geral	2,14	1,97

Valor de $p = 0,2537$ – teste t de Student.

metabolismo ou na atividade transcricional da célula (5), ou ainda pode ser influenciado pela produção de citocinas (21). No carcinoma adenóide cístico, a análise simultânea de AgNOR e PCNA pode vir a esclarecer o papel da AgNOR nesta neoplasia como marcador de proliferação ou, simplesmente, da atividade metabólica das células tumorais.

Neste trabalho, não encontramos diferença estatisticamente significativa no número de AgNOR entre os núcleos PCNA positivos e negativos no CAC.

Nós não estabelecemos um índice de PCNA para os tumores estudados, uma vez que nosso objetivo era apenas correlacionar o número de AgNOR com a imunoreatividade para o PCNA. No entanto o PCNA tem sido utilizado na avaliação do índice proliferativo de neoplasias de glândula salivar, mostrando-se útil na discriminação entre neoplasias benignas e malignas (33, 40) e na correlação com o grau de malignidade (11, 37). Além disso, apesar das suas limitações como marcador de proliferação celular (16), o PCNA mostra boa correlação com outros marcadores, como o Ki-67.

Embora alguns trabalhos tenham mostrado correlação entre PCNA e número de AgNOR através da técnica de dupla marcação (6, 19, 30), vários relatos apontam a falta de correlação entre PCNA e AgNOR quando os mesmos são analisados separadamente nas mais diversas lesões (10, 12, 17, 38).

De acordo com a literatura, o número de AgNOR está relacionado não apenas com proliferação celular, mas também com variações na atividade metabólica e transcricional (5, 21), com a ploidia celular (15, 29) e com a síntese protéica (4). Em nossa opinião, todos estes fatores podem estar relacionados à falta de correlação com o PCNA encontrada em nossos resultados.

O CAC tem sido classificado, de acordo com o seu padrão histológico predominante, como tubular, cribiforme ou sólido, e ao tipo sólido tem sido atribuído um pior prognóstico. Neste trabalho, nós não encontramos diferença estatisticamente significativa no número de AgNOR entre os diferentes tipos histológicos. Através da análise quantitativa das AgNORs, Freitas *et al.* (13) conseguiram distinguir os subtipos cribiforme e sólido do CAC do subtipo tubular, com números médios de AgNOR muito semelhantes nas duas primeiras variantes. Por outro lado, Fonseca e Soares (12) e Van Heerden e Raubenheimer (35) encontraram as mais altas contagens de AgNOR nas formas glandulares do CAC.

Em seu estudo, Vuhahula *et al.* (36) encontraram uma correlação positiva do número de AgNOR com a classificação clínica dos tumores, a despeito do subtipo histológico, com todos os casos de prognóstico clínico desfavorável apresentando altas contagens de AgNOR. Os

autores sugeriram que, no CAC, o número médio de AgNOR pode ser mais indicativo do potencial de malignidade da lesão do que de sua atividade proliferativa.

Ao nosso ver, a ausência de relação da AgNOR com os subtipos histológicos do CAC não descarta o seu uso como marcador de agressividade da lesão, pelo contrário. Concordamos com Vuhahula *et al.* (36) em que o método de AgNOR pode demonstrar alterações metabólicas que independem da histologia, servindo desta forma para identificar lesões agressivas em pequenas biópsias, o que costuma ser o caso das lesões biopsiadas na cavidade bucal.

Por outro lado, o estudo de grandes séries de casos (25, 31) tem mostrado que o prognóstico do CAC deve ser estabelecido com base não apenas nos dados histológicos, mas também em relação ao estadiamento clínico da lesão na época do diagnóstico. Assim, a utilização da análise das AgNORs como ajuda para estabelecimento do prognóstico em CAC merece ser mais bem analisada.

Apesar de ser barata e fácil de ser empregada em material rotineiramente processado, a técnica de AgNOR é bastante sensível a vários fatores, tais como fixação dos tecidos, espessura dos cortes, tempo de incubação da prata, preparação das soluções empregadas, precipitação da prata (39). Para a técnica de dupla marcação, a perfeita marcação das AgNORs, sem a coloração escura de fundo, é indispensável para possibilitar a visualização das células marcadas pela imunistoquímica. No presente trabalho, quando a técnica de AgNOR sucedeu a imunistoquímica, tempos de incubação da prata superiores a 25 minutos em temperatura ambiente resultaram em uma coloração escura dos núcleos das células, possibilitando ainda a observação das AgNORs, mas não a coloração avermelhada dos núcleos marcados positivamente para o PCNA pela imunistoquímica.

Apesar dos bons resultados obtidos, tanto quando da utilização da *new fuchsin* quanto do *fast red* como cromógenos, quando se utiliza o *fast red* a técnica de AgNOR

deve sempre preceder a imunistoquímica, já que o *fast red* é solúvel em solventes orgânicos, impossibilitando a pós-fixação em ácido acético/etanol, etapa importante da técnica de AgNOR. Além disso, este último requer um meio de montagem aquoso, o que compromete o armazenamento dos casos para posterior avaliação.

Alguns autores defendem o uso da autoclave como forma de pré-tratamento dos espécimens a serem tratados pela técnica de AgNOR, tornando, desta forma, as subestruturas nucleolares mais visíveis e distintas (1, 26). De acordo com Li *et al.* (20), o uso do microondas para a incubação da prata diminui o tempo necessário para a marcação e melhora os resultados, pois diminui o precipitado de prata.

Foi observada neste trabalho uma perfeita visualização da dupla marcação quando a técnica de AgNOR sucedeu a imunistoquímica, utilizando-se um tempo de incubação da prata de 25 minutos em temperatura ambiente. Acreditamos que o tratamento prévio em forno de microondas melhora a marcação da AgNOR, diminuindo a coloração de fundo e tornando mais nítida a diferença entre as células PCNA positivas (núcleos corados em vermelho) e as PCNA negativas, com visualização das NORs como pontos escuros bem definidos no interior dos núcleos.

Conclusões

Utilizando-se a técnica de dupla marcação, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o número médio de AgNOR nos núcleos PCNA positivos e negativos. Os melhores resultados para realização da técnica de dupla marcação foram obtidos quando a técnica de AgNOR foi realizada após a imunistoquímica, em temperatura ambiente por 25 minutos, utilizando-se o cromógeno *new fuchsin* para revelação do PCNA. O microondas como pré-tratamento mostrou-se útil na otimização da técnica de AgNOR.

Referências

1. Bãnkfalvi, A. *et al.* Standardized *in situ* AgNOR analysis in breast pathology: diagnostic and cell kinetic implications. *Pathol. Res. Pract.*, 195: 219-29, 1999.
2. Bravo, R. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp. Cell. Res.*, 163: 287-93, 1986.
3. Bravo, R. & Macdonald-Bravo, H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J. Cell. Biol.*, 105(4): 1549-54, 1987.
4. Cabrini, R.L. *et al.* Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, 21: 275-9, 1992.
5. Coleman, H.G. *et al.* Nucleolar organizer regions (AgNOR) in odontogenic cysts and ameloblastomas. *J. Oral Pathol. Med.*, 25: 436-40, 1996.
6. Costa, A.L.L. *et al.* PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, 28: 438-41, 1999.

7. Crocker, J. & Nar, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.*, 151: 111-8, 1987.
8. Derenzini, et al. Fixatives and silver stainability of NOR proteins at light microscopic level. *J. Histochem. Cytochem.*, 36(11): 1453-4, 1988.
9. Epitavianos, A. & Trigonidis, G. Salivary gland tumors studied by means of AgNOR technique. *Ann. Dent.*, 53(2): 21-5, 1994.
10. Evans, A.T. et al. Mitotic indices, anti-PCNA immunostaining, and AgNORs in thick cutaneous melanomas displaying paradoxical behaviour. *J. Pathol.*, 168(1): 15-22, 1992.
11. Fonseca, I. et al. Cell proliferation in salivary gland adenocarcinomas with myoepithelial participation: a study of 78 cases. *Virchows Arch.*, 430: 227-32, 1997.
12. Fonseca, I & Soares J. Adenoid cystic carcinoma: a study of nucleolar organizer regions (AgNOR) counts and their relation to prognosis. *J. Pathol.*, 169: 225-58, 1993.
13. Freitas, R.A. et al. Argyrophilia in nucleolar organizer regions (AgNOR) in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma of the salivary glands. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 250(4): 213-7, 1993.
14. Ghazizadeh, M. et al. Prognostic value of proliferative activity of ovarian carcinoma as revealed by PCNA and AgNOR analyses. *Am. J. Clin. Pathol.*, 107: 451-8, 1997.
15. Giri, D.D. et al. Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J. Pathol.*, 157: 307-13, 1989.
16. Hall, P.A. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.*, 162: 285-94, 1990.
17. Irazusta, S.P. et al. The value of PCNA and AgNORs staining in endoscopic biopsies of gastric mucosa. *Pathol. Res. Pract.*, 194: 33-9, 1998.
18. Khan, M.A. et al. Comparing flow cytometric analysis and nucleolar organizer region enumeration in archival oral premalignant lesions. *J. Oral Pathol. Med.*, 22(6): 257-62, 1993.
19. Leite, K.R.M. et al. No relationship between proliferative activity and MACIS prognostic scoring system in papillary thyroid carcinoma. *Head Neck*, 21: 602-5, 1999.
20. Li, Q. et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions: a revised version of the AgNOR staining technique. *Cell. Biol.*, 104: 145-50, 1995.
21. Mamaev, N.N. et al. Nucleoli and AgNOR in Hodgkin's disease. *Mol. Pathol.*, 50: 149-52, 1997.
22. Matsumura, K. et al. The nucleolar organizer regions associated protein (AgNOR) in salivary gland tumors. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 18: 76-8, 1989.
23. Munakata, S. & Hendricks, J.B. A Multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantification of ki-67 and nucleolar organizer regions (AgNOR) in paraffin-embedded tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 42(6): 789-93, 1994.
24. Murray, P.G. et al. Sequential demonstration of antigens and AgNORs in frozen and paraffin sections. *J. Pathol.*, 158: 169-72, 1989.
25. Nascimento, A.G. et al. Adenoid cystic carcinoma of salivary glands: a study of 61 cases with clinicopathologic correlation. *Cancer*, 57: 312-9, 1986.
26. Öfner, D. & Schmid, K.W. Standardized AgNOR quantification. *J. Pathol.*, 179: 218, 1996.
27. Ploton, D. et al. Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem. J.*, 18(1): 5-14, 1986.
28. Prelich, G. et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature*, 326(2): 517-9, 1987.
29. Rüschoff, J. et al. Assessment of nucleolar organizer regions by automatic analysis in breast cancer: correlation with DNA content, proliferation rate, receptor status and histopathological grading. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 116: 480-5, 1990.
30. Smith, F.G. et al. Correlation between PCNA and AgNOR scores in non-Hodgkin's lymphomas using sequential staining technique. *J. Clin. Pathol.*, 46(1): 28-31, 1993.
31. Szanto, P.A. et al. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer*, 54: 1062-9, 1984.
32. Theré, D. et al. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp. Cell. Res.*, 184: 131-7, 1989.
33. Trendell-Smith, N.J. et al. The evaluation of salivary gland tumors using proliferating cell nuclear antigen. *J. Laryngo Otol.*, 111: 551-5, 1997.
34. Tuccari, G. et al. Standardized use of the AgNOR method. *J. Oral Pathol. Med.*, 29(10): 526-7, 2000.
35. Van Heerden, W.F.P. & Raubenheimer, E.J. Evaluation of the nucleolar organizer region associated proteins in minor salivary gland tumors. *J. Oral Pathol. Med.*, 20: 291-5, 1991.
36. Vuhahula, E.A.M. et al. Correlation between argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) counts and histologic grades with respect to biologic behavior of salivary adenoid cystic carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, 24: 422-37, 1995.
37. Yang, L. et al. Immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen in salivary gland tumors: an assessment of growth potential. *Virchows Arch.*, 422(6): 481-6, 1993.
38. Yu, C.C.-W. et al. A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNOR) staining, and histological grading in gastrointestinal stromal tumours. *J. Pathol.*, 166: 147-52, 1992.
39. Zaczek, M. et al. Identification and assessment of nucleolar organizer regions (NORs): technical problems. *Pathol. Pol.*, 45(1): 35-8, 1994.
40. Zhu, Q. et al. The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in human benign and malignant epithelial lesions of the parotid gland. *Oral Oncol.*, 33(1): 29-35, 1999.

Endereço para correspondência

Maria Cássia Ferreira de Aguiar
 Laboratório de Patologia Experimental 01
 Sala 3.201
 Faculdade de Odontologia - Universidade
 Federal de Minas Gerais - Campus da
 Pampulha
 Av. Antônio Carlos 6.627
 CEP 31270-111 - Belo Horizonte-MG