

PAULO DE TARSO COELHO JARDIM

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O TUMOR ODONTOGÊNICO
ADENOMATÓIDE E TUMOR ODONTOGÊNICO EPITELIAL
CALCIFICANTE A PARTIR DA TÉCNICA HISTOQUÍMICA DO
AGNOR E DA IMUNOHISTOQUÍMICA DO PCNA, p 53 E Ki-67

ARAÇATUBA – SP

2007

PAULO DE TARSO COELHO JARDIM

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O TUMOR ODONTOGÊNICO
ADENOMATÓIDE E TUMOR ODONTOGÊNICO EPITELIAL
CALCIFICANTE A PARTIR DA TÉCNICA HISTOQUÍMICA DO
AGNOR E DA IMUNOHISTOQUÍMICA DO PCNA, p 53 E Ki-67

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – UNESP para a obtenção
do Grau de Doutor em Odontologia – Área de
Concentração em Estomatologia.

Orientador: Prof. Adjunto Marcelo Macedo
Crivelini.

Co- Orientadora: Profa. Adjunto Ana Maria Pires
Soubhia

ARAÇATUBA – SP

2007

Dedicatória

Ao meu aluno, desafio constante, motivação maior da busca pelo
aprimoramento, dedico este trabalho.

Agradecimentos especiais

Aline e Maria Clara, por todas as vezes que posso enxergar através de seus olhos um mundo melhor, mais colorido e cheio de sorrisos.

Martha, Newton, Ana e Adhemar, pelos valores que nos transmitiram e por cada semente plantada pelo caminho que fortalecem nossa intenção de sermos cada dia melhores.

A Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal – UNIDERP, pela oportunidade de exercer a melhor das profissões e pelo apoio para o desenvolvimento deste Doutorado.

A Professora Ana Maria Pires Soubhia, pela co-orientação deste trabalho e principalmente, por sua presença marcante em todos os momentos importantes de minha vida acadêmica.

Ao Professor Alvimar Lima de Castro, pelo companheirismo, ensinamentos e incentivo.

Ao Professor Marcelo Macedo Crivelini, pela orientação deste trabalho.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por todas as oportunidades de aprendizado oferecidas desde a graduação.

Agradecimentos

Aos professores e equipe da Disciplina de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas durante todos esses anos.

Aos técnicos Elaine Cristina Francischini Ferreira, Luzia Maria Francischini, Maria Aparecida Martins da Silva e Marcelo Tramarim, exemplos de profissionais, obrigado pelo grande apoio no desenvolvimento dos experimentos, pelo acolhimento e boa vontade constantes.

A Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto e Marina Midori Sakamoto Kawagoe pela boa vontade e competência sempre presentes na Seção de Pós-graduação.

A Bibliotecária responsável da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, através de quem agradeço a atenção de toda a equipe da Biblioteca.

Epígrafe

“Há os que olham e os que enxergam”

Jardim PTC. Estudo proliferativo dos tumores odontogênicos adenomatóide e epitelial calcificante a partir da técnica histoquímica do AgNOR e da imunohistoquímica do PCNA, P 53 e Ki-67. [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2007.

Resumo

O tumor odontogênico adenomatóide (TOA) é um tumor benigno composto de epitélio odontogênico com uma variedade de padrões arquiteturais histológicos, embebido em um estroma de tecido conjuntivo maduro e caracterizado por um crescimento lento, porém progressivo. O tumor odontogênico epitelial calcificante (TOEC) é definido como uma neoplasia odontogênica epitelial localmente invasiva, caracterizada pela presença de material amilóide que pode se tornar calcificado. Ambos recentemente reclassificados pela Organização Mundial da Saúde como tumores de epitélio odontogênico, com estroma fibroso maduro e sem ectomesênquima odontogênico. Com o objetivo de contribuir para o estabelecimento de tratamentos e prognósticos mais precisos, através de um melhor entendimento do comportamento biológico destes tumores, este estudo se propôs a avaliar o potencial proliferativo dos dois tumores que por vezes apresentam aspectos histológicos coincidentes, utilizando a técnica histoquímica do AgNOR e a imunohistoquímica de evidênciação de PCNA, P53 e Ki-67. Foram utilizados 5 espécimes de cada tumor. A análise comparativa dos resultados quantitativos/qualitativos da histoquímica de evidênciação das NORs e dos resultados imunohistoquímicos para os três anticorpos estudados confirmam o comportamento patológico neoplásico benigno do tumor odontogênico adenomatóide e do tumor odontogênico epitelial calcificante. Foi observada distribuição positiva do PCNA nas células epiteliais das áreas sólidas e adenomatóides do TOA e nas áreas sólidas de células epiteliais poliédricas do TOEC, o que permite sugerir estes sítios como os responsáveis pelo crescimento dos respectivos tumores.

Palavras- chave: tumor odontogênico adenomatóide, tumor odontogênico epitelial calcificante, imunohistoquímica, AgNOR, histoquímica.

Jardim PTC. Proliferative study of the adenomatoid and calcifying epithelial odontogenic tumors by AgNOR histochemistry and immunohistochemistry of PCNA, P 53 and Ki- 67. [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2007.

Abstract

The adenomatoid odontogenic tumor (OAT) is a benign tumor composed of odontogenic epithelium in a variety of histoarquitectural patterns, embedded in a mature connective tissue stroma and characterized by slow but progressive growth. The calcifying epithelial odontogenic tumor (CEOT) is defined as an epithelial odontogenic neoplasia locally invasive, characterized by the presence of amiloyd material that may become calcified. Both were recently reclassified by World Health Organization as tumors of odontogenic epithelium, with mature fibrous stroma without odontogenic ectomesenchyme. With the aim of contributing to the achievement of more precise treatments and prognosis, based on a better understanding of the biological behavior of these tumors, this study proposed evaluation of the proliferative potential of both tumors that sometimes present similar histological patterns, using AgNOR histochemistry and imunohistochemical expression of PCNA, P 53 and Ki- 67. There were analyzed 5 specimens of each tumor. Comparative analysis of quantitative/qualitative results of the NORs staining and the histochemical expression results of the antibodies studied confirm the benign neoplastic pathological behavior of the AOT and CEOT and the positive expression of PCNA distributed among epithelial cells of solid nodules and adenomatoid structures of AOT and among the polyhedral epithelial CEOT cells allowed suggest these sites as the responsible ones for respective tumoral growth.

Key words: adenomatoid odontogenic tumor, calcifying epithelial odontogenico tumor, imunohistochemistry, AgNOR, histochemistry.

Lista de Figuras

Figura 1-	AgNORS em corte histológico de TOA (A) e de TOEC (B), apresentados como estruturas de forma arredondada ou ovalada, coloração castanha- escura, localizadas no interior dos nucléolos, visíveis como estruturas de coloração amarelada.(400X)	25
Figura 2-	Corte histológico do TOA de número 2, onde é possível verificar a expressão positiva do PCNA nas células epiteliais das áreas sólidas e nas estruturas adenomatóides. (400X)	27
Figura 3-	Corte histológico do TOA de número 2 com expressão positiva para P53 nas células epiteliais de áreas sólidas e nas células epiteliais das estruturas adenomatóides. (400X)	27
Figura 4-	Corte histológico do TOA de número 2, A (400X), evidenciando as escassas marcações obtidas para a expressão do Ki-67 e corte do TOA número 3, B(200X), onde foi possível observar positividade das células epiteliais de áreas sólidas.	28
Figura 5-	Corte histológico do TOEC de número 4, com expressão positiva, bem marcada, para o PCNA nas células epiteliais poliédricas de massa tumoral sólida. (400X)	28
Figura 6-	TOEC de número 2, A (40X), área de epitélio de revestimento com expressão positiva para P53 e área tumoral do mesmo espécime, B(200X), demonstrando ausência de expressão do anticorpo nas células tumorais.	29

Lista de Tabelas

Tabela 1-	Anticorpos monoclonais utilizados	23
Tabela 2-	Resultados quantitativo e qualitativo das AgNORs por tumor	26
Tabela 3-	Resultados imunohistoquímicos por tumor	29

Lista de abreviaturas

TOA=	Tumor Odontogênico Adenomatóide
OMS=	Organização Mundial da Saúde
TOEC=	Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante
AGNOR=	Regiões Organizadoras Nucleolares coradas por Prata
PCNA=	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
P 53=	Gene supressor tumoral associado ao bloqueio da divisão celular
P 53=	Produto protéico do P 53 responsável pelo bloqueio da divisão celular
Ki-67=	Antígeno monoclonal associado a proliferação celular

Sumário

1	Introdução	12
2	Proposição	18
3	Material e Método	20
4	Resultado	24
5	Discussão	30
6	Conclusão	34
	Referências	36
	Anexos	42

1 Introdução

O Tumor Odontogênico Adenomatóide (TOA) era classificado até pouco tempo como um tumor de epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, podendo ou não apresentar a formação de tecido dentário mineralizado.¹ Estudos envolvendo melhor conhecimento da genética desses tumores permitiram que em 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentasse uma atualização dessa classificação onde o TOA está compreendido entre os tumores de epitélio odontogênico com estroma fibroso maduro e sem ectomesênquima odontogênico, sendo definido como um tumor odontogênico benigno composto de epitélio odontogênico com uma variedade de padrões arquiteturais histológicos embebido em um estroma de tecido conjuntivo maduro e caracterizado por um crescimento lento, porém progressivo.²

Quanto aos aspectos epidemiológicos, o TOA representa uma pequena parcela dos tumores odontogênicos. De uma forma geral, representa porcentagens que variam de 2 até 7% de todos os casos,^{2,3,4} com predileção por jovens e pelo sexo feminino.^{5,6,7,8} A escassez de trabalhos nacionais que estabeleçam a incidência dessas patologias motivou o estudo retrospectivo de Santos et al.⁹ que realizaram um levantamento e reclassificação das lesões encontradas em seu Serviço de Diagnóstico, entre os anos de 1970 e 1999. De 5289 patologias bucais registradas, 127 eram casos diagnosticados como tumores odontogênicos. Foi observado que mais de 60% das lesões ocorreram no sexo feminino e a lesão mais comumente encontrada foi o odontoma (complexo ou composto), seguido do ameloblastoma, tumor odontogênico adenomatóide e mixoma. O diagnóstico de TOA ocorreu em 11 casos, 8,67% de todos os tumores, ocorrendo em sete pacientes do sexo feminino e em 4 do sexo masculino. A segunda década de vida foi a mais afetada, com idade média de 16,27 anos. A área mais afetada foi a região anterior da maxila.

Estudos que se restringem a uma faixa etária específica podem apontar uma incidência relativa maior desta lesão. Jones e Franklin¹⁰ realizaram um levantamento de todos os casos histopatológicos que foram analisados entre 1973 e 2002 no Departamento de Patologia Oral de uma Universidade do Reino Unido e que pertencessem a indivíduos de 0 a 16 anos de idade. Os autores puderam observar que os casos de TOA foram os

segundos mais prevalentes nessa faixa etária, logo após os odontomas, predominando entre os 9 e 16 anos de idade. Ajayi et al.⁵ estudaram 92 casos de lesões ósseas em pacientes de até 19 anos, ocorridos entre 1980 e 2003 na Nigéria. Também neste estudo, o TOA foi o segundo tumor odontogênico mais comum, compreendendo 19,6% dos casos. Os autores ainda observaram que são raros os casos em pacientes menores de 5 anos, com um predomínio entre os 15 e 19 anos, permitindo a conclusão dos autores de que os tumores odontogênicos são relativamente mais comuns em jovens nigerianos.

A maioria dos tumores ocorre no terço anterior da maxila, sem tendência a atingir grandes proporções e, quando presente, a sintomatologia mais relatada é de abaulamento da cortical vestibular, sem sintomatologia dolorosa e com evolução de alguns meses até dois anos.^{6,11} Embora raro, o aparecimento de lesões periféricas é observado.³ É comum serem descobertas em exames radiográficos devido à tendência de permanecerem como lesões encapsuladas e de pequenas proporções. Casos que apresentam aumentos volumétricos perceptíveis, como o relatado por Nigan et al.¹² onde uma jovem de 15 anos apresentou abaulamento da região vestibular da maxila, estendendo-se por 4cm e ocasionando impacção e reabsorção de vários elementos dentários, são raros.

O aspecto radiográfico dos tumores odontogênicos adenomatóides pode variar considerando o envolvimento ou não de um elemento dentário. O tipo folicular apresenta-se na forma de imagem unilocular radiolúcida, bem definida, envolvendo a coroa e parte radicular de um elemento dentário permanente. Na grande maioria das vezes, os caninos são os mais afetados, os quais podem estar deslocados pela lesão e com um aspecto semelhante ao de um cisto dentígero.^{2,13,14} Quando não associado a um dente impactado, é denominado de tipo extrafolicular e apresenta-se na forma de lesão radiolúcida unilocular. Em ambos os casos, a presença de material radiopaco no interior da lesão sugerindo a presença de tecido mineralizado, é freqüentemente relatado.

O padrão histológico descrito por Philipsen e Nikai² é o de nódulos sólidos de células de epitélio odontogênico, cuboidais ou colunares, formando ninhos ou estruturas semelhantes a rosetas com escasso estroma de tecido conjuntivo. Entre as células epiteliais e no centro das rosetas é observado material amorfo eosinofílico. Nas áreas celularizadas podem estar presentes estruturas de aparência tubular ou de ductos. Essas

estruturas podem não estar presentes em todos os tumores. Além da formação de ductos, essas células epiteliais colunares e cuboidais formam cordões em arranjos complicados que freqüentemente exibem invaginações. Outro padrão celular descrito é o de nódulos de células epiteliais eosinofílicas, poliédricas e de aparência escamosa com uma distinta adesão celular e pontes intercelulares proeminentes. Os núcleos podem ocasionalmente apresentar pleomorfismo moderado. Esses nódulos podem conter material amorfo semelhante a amilóide e massas globulares de material calcificado.

Áreas semelhantes ao Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante (TOEC) podem ser observadas e consideradas como uma variante do TOA. Crivelini¹⁵ apresenta em sua revisão de literatura relatos de coexistência de TOA e TOEC em uma mesma lesão. O autor observou trabalhos relatando áreas histopatológicas de TOEC em lesões diagnosticadas como TOA, o que levantou possibilidades como a de serem lesões com a mesma origem,¹⁶ ou ainda, lesões combinadas, onde primariamente existiria um TOA com focos de TOEC.¹⁷ Mosqueda – Taylor et al.¹⁸ discutem o aspecto denominado de “tumor odontogênico epitelial combinado” devido a diversos trabalhos que defenderam a teoria de uma composição entre o TOA e o TOEC em muitos casos.^{16,19,20} Os autores realizaram um estudo multicêntrico envolvendo 44 casos de TOA diagnosticados em 6 serviços de diagnóstico de patologia oral do México, Brasil e Guatemala e observaram que 93% dos casos avaliados apresentavam quantidades variáveis de células epiteliais poliédricas, com bordas bem definidas, pontes intercelulares facilmente reconhecíveis, substância intracitoplasmática homogênea e com tendência à calcificação. Apesar da semelhança com o padrão esperado para um TOEC, puderam ser observadas ainda neste estudo que também existem algumas diferenças dessas áreas semelhantes a TOEC, quando comparadas com o que é visto no TOEC verdadeiro. Essa discussão já havia sido desenvolvida por Montes Ledesma et al.²¹ que concluíram que áreas semelhantes a TOEC são aspectos normais dentro do amplo espectro histomorfológico dos TOAs e que não há diferença clínica ou de prognóstico entre esses casos e os de TOA padrão.

O Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante (TOEC) é definido como uma neoplasia odontogênica epitelial localmente invasiva, caracterizada pela presença de material amilóide que pode se tornar calcificado. Assim como o TOA, sua origem se dá a

partir do epitélio odontogênico, com estroma fibroso maduro e sem ectomesênquima odontogênico.²²

A denominação de “Tumor de Pindborg” foi amplamente utilizada, graças ao patologista Dinamarquês Jens Pindborg, responsável pela primeira descrição desta como uma patologia distinta.²³ Trata-se de tumor raro, contribuindo para aproximadamente 1% de todos os tumores que ocorrem em pacientes entre os 20 e 60 anos de idade. A literatura aponta pacientes entre 30 e 50 de idade como os mais acometidos,^{3,22,24} sendo incomuns em crianças e adolescentes.²⁵ O TOEC é um tumor que surge sem predileção por sexo e geralmente é encontrado duas vezes mais na mandíbula do que na maxila. Casos extra-ósseos, embora menos comuns, já foram relatados.^{26,27,28,29,30} Em uma análise retrospectiva de 67 casos de TOEC foi observado que a mandíbula foi acometida em 74% dos casos, com predomínio na região posterior. Radiograficamente, o aspecto predominante foi o de combinação entre áreas radiolúcidas e áreas radiopacas, seguido pelo aspecto radiolúcido e uma pequena porcentagem de lesões unicamente radiopacas. As lesões uniloculares associadas a dentes impactados ocorreram em mais de 60% dos casos.³¹ Esse aspecto radiográfico variável é esperado e portanto, de pouca contribuição para o diagnóstico definitivo das lesões.²²

Macroscopicamente, as lesões excisionadas apresentam o aspecto de tumores sólidos, com quantidade variável de material calcificado. O exame histológico revela estroma fibroso com ilhas e massas de células epiteliais poliédricas com citoplasma eosinofílico abundante, limites celulares bem definidos e pontes intercelulares bem desenvolvidas. Os núcleos geralmente são pleomórficos, sendo comum encontrar núcleos gigantes. Figuras mitóticas são raras, mas mitoses podem se tornar evidentes nos casos de transformação maligna. Material hialino eosinofílico homogêneo comumente calcificado e na forma de anéis concêntricos estão presentes e identificados como material amilóide. A quantidade de material amilóide e de celularização são variáveis, podendo ocorrer variações sem material mineralizado, principalmente nas lesões periféricas. Células claras ricas em glicogênio podem estar presentes dentro dos ninhos epiteliais e em quantidades variadas.^{22,28}

Apesar de sua invasividade local e comportamento clínico por vezes relacionado ao do ameloblastoma, lesões menores são enucleadas com bom prognóstico,

sendo indicada a ressecção total para as lesões maiores. Mesmo essas lesões apresentam baixo índice de recidiva.^{3,22,32}

De acordo com estudo realizado por Jardim³³, a evidenciação das regiões organizadoras nucleolares pela Prata (AgNOR) tem levado a importantes discussões a respeito do ciclo celular, refletindo o potencial proliferativo dos tecidos, o que pode ter consequências prognósticas.^{34,35,36,37} Estudos recentes têm aumentado a compreensão do surgimento de lesões malignas, possibilitando também evoluções no diagnóstico das mesmas e a distinção entre o comportamento biológico compatível ou não com a transformação maligna e os graus de malignidade.^{38,39,40} Estudos buscando correlacionar o comportamento clínico dos tumores odontogênicos e a atividade proliferativa de suas células têm sido propostos com o objetivo de melhorar a compreensão sobre os mesmos e contribuir para o estabelecimento de tratamentos prognósticos mais precisos.^{41,42}

Nessa linha, estudos com a evidenciação imunohistoquímica do p 53, PCNA e Ki-67 têm possibilitado interessantes discussões. O P53 é um gene associado à proliferação celular. Seu produto protéico é responsável pelo bloqueio da divisão celular na fase G1 do ciclo celular. Esse bloqueio temporário permite uma averiguação da fidelidade do material genético duplicado e seu reparo. Caso essa averiguação seja inibida, as células mutantes persistem e podem dar origem a tumores malignos. Em condições normais essa proteína não é detectável, pois sua meia vida é muito curta. No entanto, altas quantidades de p53 podem ser observadas no câncer bucal, assim como em lesões cancerizáveis em transição para malignas.^{43,44} O PCNA é um antígeno nuclear anti-células proliferativas que funciona como um co-fator para a DNA polimerase δ na fase S da divisão celular e na síntese de DNA durante seu processo de reparo. Esse antígeno é observado em células proliferativas de tecidos normais a neoplásicos, sendo relacionado ao ciclo celular.^{45,46} O valor prognóstico de sua expressão é estudado comparativamente com a expressão do Ki-67, cuja expressividade é relacionada ao potencial agressivo e ao prognóstico, tanto de lesões malignas como dos tumores odontogênicos.^{47,48}

2 Proposição

Diante da preocupação de se conhecer e buscar justificativas para o comportamento patológico dos tumores odontogênicos e visando verificar paralelos entre o comportamento de dois tumores com aspectos histológicos por vezes coincidentes, é objetivo deste trabalho realizar estudo do potencial proliferativo do tumor odontogênico adenomatóide e do tumor odontogênico epitelial calcificante, utilizando a técnica histoquímica da evidênciação das AgNORs e da imunohistoquímica de evidênciação da presença de PCNA, p 53 e Ki-67.

3 Material e Método

Foram utilizados neste estudo 05 espécimes do tumor odontogênico adenomatóide e 05 do tumor odontogênico epitelial calcificante, dos arquivos do Serviço de histopatologia da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP. As características microscópicas foram descritas em cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina (HE), utilizando-se microscopia óptica.

A histoquímica do AgNOR foi realizada de acordo com a técnica descrita por Ploton et al.⁴⁹ e otimizada por Cabrini, et al.⁵⁰. Foram obtidos cortes de 3 μ m de cada espécime, os quais passaram pela desparafinização em xilol por 30 minutos, em estufa a 57°C, seguido por segundo banho de 20 minutos em temperatura ambiente. Foi realizada hidratação crescente, a partir de etanol absoluto, imersão em ácido acético/etanol (30ml de ácido acético/ 70ml de etanol), por 5 minutos; imersão em celoidina a 1% em éter/etanol (1/1), durante 1 minuto. Imersão em etanol a 70% por 5 minutos, seguida de lavagem com água destilada. Preparo da solução “A” de AgNOR, a partir de 50 ml de água destilada, 0,5 ml de ácido fórmico e 1g de gelatina. Essa solução foi mantida a 45°C por uma hora, antes da incubação. A solução “B” foi obtida a partir de 10ml de água destilada e 5g de Nitrato de Prata. As soluções foram misturadas no momento da incubação, gotejadas sobre lâminas que permaneceram em estufa por 30 minutos, a 45°C. Os cortes foram então lavados e desidratados em concentração crescente de etanol, até o absoluto, clareados em banhos de xilol e montados em permount para análise em microscopia ótica.

A análise quantitativa/qualitativa das NORs envolveu o estudo de 100 núcleos por espécime. A análise quantitativa das NORs e da área média de cada NOR foram realizadas com objetiva de imersão (100X) e com o auxílio do programa Leica QWin (Image Processing and Analysis System), obtendo-se uma contagem de 100 núcleos celulares por espécime tumoral. A média dos números de NORs por célula (N), assim como a área média por NOR em micrômetro quadrado (μm^2) foram calculadas utilizando as seguinte equações:

N= Número de NORs

Número de células

A= Área total das NORs

Número de NORs

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística, utilizando-se o teste T pareado, ao nível de significância de 5%.

As reações imunohistoquímicas foram realizadas pelo método streptavidina-biotina amplificado(B-AS) na coloração dos complexos antígeno-anticorpo por imunoperoxidase. Os materiais foram submetidos aos anticorpos primários PCNA, p53 e Ki- 67. Cortes de 3µm de espessura incluídos em parafina foram desparafinados em banhos de xilol, o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em série decrescente de etanóis e imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% para retirada do pigmento formólico. As lâminas com cortes destinados às reações com PCNA e P53 foram tratadas com ácido cítrico monoidratado (10mM –p PH 6.0), utilizando-se forno de microondas por 12 minutos, verificando o nível da solução a cada 4 minutos, garantindo a imersão total do material. Nas lâminas destinadas à reação com Ki-67 foi realizado o tratamento com ácido cítrico em panela de pressão por 4 minutos. Esses recursos visaram a recuperação dos sítios antigênicos. Após lavagem, os cortes foram incubados em solução composta de água oxigenada a 6% e metanol (1:1), em duas trocas de 5 minutos cada, visando bloquear a peroxidase endógena tecidual. A lavagem com água corrente e destilada foi repetida e os cortes incubados duas vezes em solução de TRIS – PH 7,4, durante 5 minutos cada. Em seguida, foram incubados com o soro primário diluído (tabela – 1) preparado conjuntamente com o soro de albumina bovina (BSA) a 1%. O anticorpo de ligação foi então incubado durante 30 minutos e, em seguida, o complexo streptavidina-biotina por 30 minutos, ambos em temperatura ambiente. A reação de revelação foi realizada com cromógeno diaminobenzidina (DAB) 30 mg por 5 minutos, diluído em TRIS – PH 7,4 (100ml) e ativado por água oxigenada (1,2ml). Logo em seguida, os cortes foram lavados em água corrente e destilada e contracorados com hematoxilina de Meyer por 1 minuto. Foi realizada desidratação crescente, em cadeia ascendente de etanóis, diafanização em 3 banhos de xilol e montagem em resina permount para exame de microscopia ótica.

Tabela 1 – Anticorpos monoclonais utilizados

Anticorpo	Clone	Fração de Diluição	Tempo de incubação	Temperatura
PCNA*	PC 10	1:600	overnight	4 °C
Ki-67**	MM1	1:200	overnight	4 °C
P 53*		1:200	overnight	4 °C

*Dako Corporation

**Novocasta Laboratories Ltda

Considerações éticas:

Este trabalho foi apresentado para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba –UNESP, Processo FOA 2005-01729, recebendo o parecer favorável à sua execução em 27 de outubro de 2005, conforme atestado pelo documento em anexo (Anexo I).

4 Resultado

Resultados histoquímicos com o AgNOR:

As NORs foram visualizadas à microscopia como pontos escuros, variando em tonalidades de castanho, distribuídas aleatoriamente pelo núcleo que pode ser visualizado como uma estrutura amarelada. Nas NORs predominaram as formas arredondada e ovalada, de fácil individualização e variando em número/núcleo e diâmetro (Figura 3).

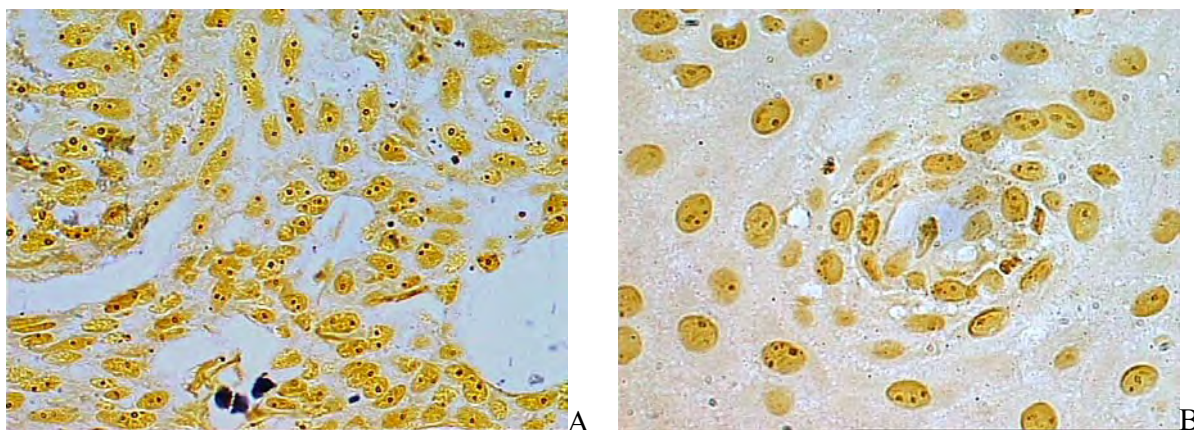


Figura 1 – AgNORs em corte histológico de TOA (A) e de TOEC (B), apresentados como estruturas de forma arredondada ou ovalada, coloração castanha-escura, localizadas no interior dos nucléolos, visíveis como estruturas de coloração amarela. (400X)

A análise quantitativa de AgNOR por tumor, assim como a área média das NORs por tumor, estão dispostas na tabela 2 para facilitar a visualização.

Tabela 2 – Resultados quantitativo e qualitativo das AgNORs por tumor

Tumor	Média de NORs/ Núcleo	Média de Área/Núcleo (μm^2)
TOA* 1	1,52	8,04
TOA 2	1,49	4,86
TOA 3	1,29	10,69
TOA 4	1,96	8,24
TOA 5	1,51	11,88
Média TOAs	1,55	8,74
Desvio padrão	0,245	2,713
TOEC**1	1,42	6,51
TOEC 2	1,87	11,58
TOEC 3	1,82	11,44
TOEC 4	1,80	14,77
TOEC 5	1,50	13,21
Média TOECs	1,68	11,50
Desvio padrão	0,206	3,103

*Tumor Odontogênico Adenomatóide

**Tumor Odontogênico Epitelial Calcificante.

Os resultados das reações imunohistoquímicas foram registrados como negativos (-), quando núcleos corados estavam ausentes ou muito escassos; positividade fraca ($\pm$), quando a positividade foi apresentada de forma esporádica e positividade (+), quando a marcação estava evidente em vários núcleos por campo.

O PCNA foi expresso de maneira positiva nos 5 casos de TOA, variando de fraca a evidentemente positiva, com predomínio nas áreas sólidas, nas estruturas adenomatóides (ductais) e em cordões epiteliais (Figura 2).

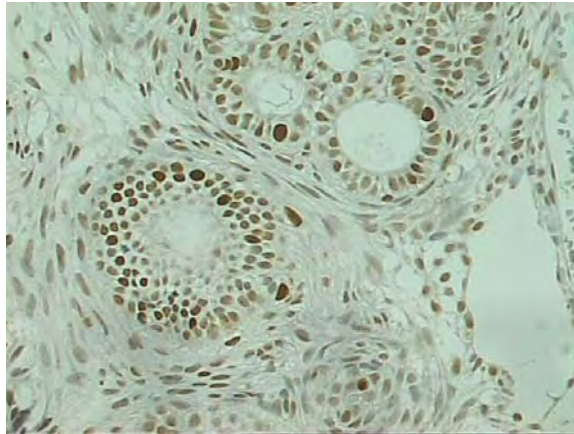


Figura 2 – Corte histológico do TOA de número 2, onde é possível verificar a expressão positiva do PCNA nas células epiteliais das áreas sólidas e nas estruturas adenomatóides. (400X)

O p53 teve reação negativa em 2 dos TOAs e positiva em três. Embora escassa e por vezes fraca, a coloração pode ser verificada em áreas adenomatóides e em alguns ninhos epiteliais (Figura 3).

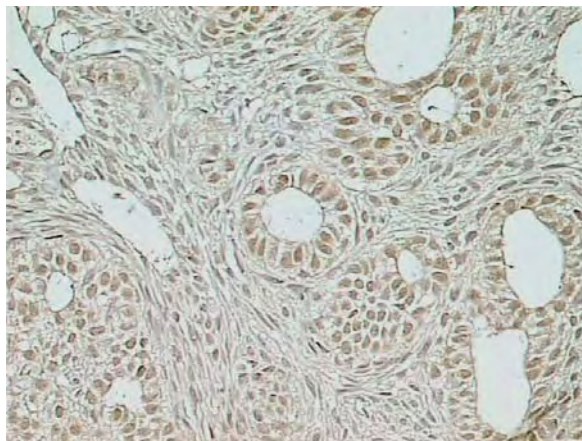


Figura 3 – Corte histológico do TOA de número 2 com expressão positiva para P53 nas células epiteliais de áreas sólidas e nas células epiteliais das estruturas adenomatóides.(400X)

O Ki-67 não foi evidenciado em dois casos de TOA, raras marcações em um caso e positividade em dois tumores nas áreas sólidas de ninhos epiteliais e, por vezes, nas áreas adenomatóides (Figura 4).

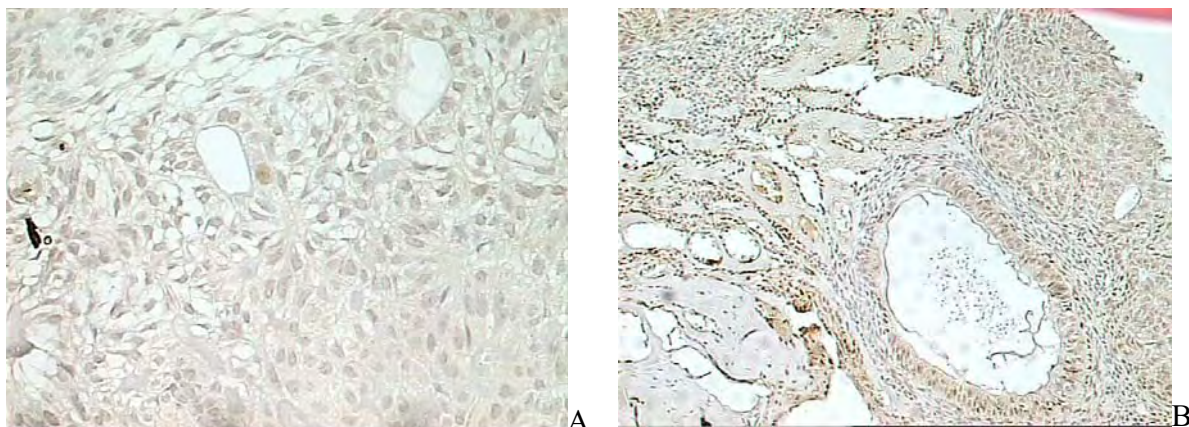


Figura 4 – Corte histológico do TOA de número 2, A (400X), evidenciando as escassas marcações obtidas para a expressão do Ki-67 e corte do TOA número 3, B(200X), onde foi possível observar positividade das células epiteliais de áreas sólidas.

O PCNA foi positivo e bem marcado em 4 dos Tumores Odontogênicos Epiteliais Calcificantes (Figura 5) e a marcação foi considerada fraca em apenas um tumor, podendo ser observada nas áreas sólidas de células epiteliais poliédricas.

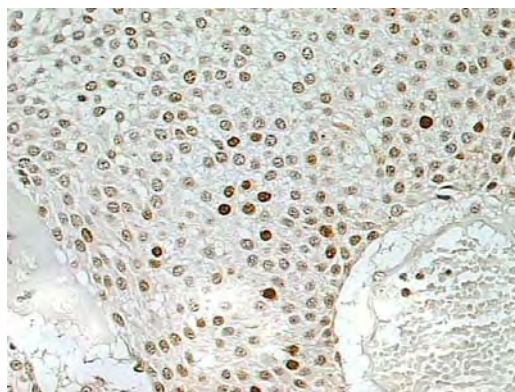


Figura 5 – Corte histológico do TOEC de número 4, com expressão positiva, bem marcada, para o PCNA nas células epiteliais poliédricas de massa tumoral sólida. (400X)

O P53 foi considerado negativo em todos os casos. Apenas dois casos apresentaram escassas células com discreta e fraca marcação. No caso de TOEC de número 2 pode ser verificada a positividade em área de acantose do epitélio de revestimento (Figura 6). A reação para Ki-67 também foi negativa para todos os casos de TOEC analisados neste estudo.

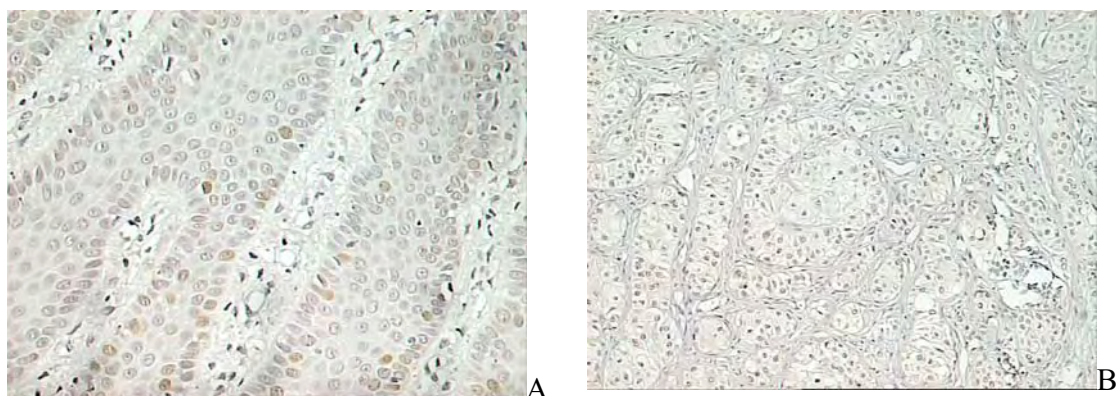


Figura 6 – TOEC de número 2, A (400X), área de epitélio de revestimento com expressão positiva para P53 e área tumoral do mesmo espécime, B(200X), demonstrando ausência de expressão do anticorpo nas células tumorais.

Na Tabela 3 estão resumidos os resultados imunohistoquímicos de cada tumor para melhor visualização.

Tabela 3 – Resultados imunohistoquímicos por tumor.

Tumor	PCNA	P53	Ki67
TOA 1	±	–	±
TOA 2	+	+	+
TOA 3	+	+	+
TOA 4	±	–	–
TOA 5	+	±	–
TOEC 1	+	–	–
TOEC 2	+	–	–
TOEC 3	+	–	–
TOEC 4	+	–	–
TOEC 5	+	–	–
TOA: tumor odontogênico adenomatóide			
TOEC: tumor odontogênico epitelial calcificante			
±: fraca positividade			
-: negativo			
+: positivo			

5. Discussão

O estudo das Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) parte do princípio de que a condensação das cromátides em cromossomos está entre as mudanças que marcam o início da divisão celular. As constrições secundárias que surgem nesses cromossomos dão origem a porções menores denominadas de satélites e estes são associados à formação de nucléolos. Os nucléolos por sua vez, surgem apenas em locais especiais de cromossomos específicos. Em um organismo diplóide, é de esperar que os dois cromossomos estejam presentes na célula em divisão. Esses locais especiais são as regiões organizadoras nucleolares. A síntese protéica depende diretamente da presença do nucléolo, parte crítica e essencial à translação da informação armazenada nos genes. Essa estrutura não é visível nos exames histopatológicos de rotina. A presença abundante de uma proteína denominada nucleolin no interior dos nucléolos é que possibilita a visualização das NORs no exame em questão, pois essa proteína cora com a Prata.³⁴

O tamanho dos nucléolos reflete a taxa de produção ribossomal, ou seja, a taxa total de síntese protéica envolvida, quer no processo de crescimento celular, quer no processo de secreção de proteínas. Esse fato explica a importância dessa estrutura nas células de crescimento rápido e/ou com grande produção de proteínas.³⁵ O número de AgNORs não só estaria relacionado à atividade do gene cromossomal, mas por consequência estaria também relacionado à proliferação celular, com possíveis implicações prognósticas. O número de AgNORs em qualquer estágio do ciclo celular parece ser inversamente proporcional ao tempo desse ciclo, ou seja, quanto maior a quantidade de NORs, menor o tempo para o ciclo celular, o que reflete aumento na taxa de proliferação celular.^{34,37} Os estudos de Costa³⁸ e Hanemann³⁹ sobre carcinomas epidermóides evidenciaram relação positiva entre o número de NORs e o aspecto das mesmas com o índice proliferativo e a diferenciação dos tumores, onde os mais indiferenciados apresentaram NORs menores, mais intensamente coradas e numerosas, atingindo a média de 10,08 NORs/núcleo. Costa³⁸ observou ainda, haver correlação entre a positividade celular para os marcadores Ki-67 e PCNA e o número de NORs.³⁹ Em nosso estudo, a média de 1,55 NORs por núcleo para TOA e de 1,68 para o TOEC, as quais, em conjunto com as respectivas médias de áreas nucleares ocupadas pelas NORs,

indicam baixo índice proliferativo. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Medeiros et al.⁴¹ que estudaram o índice proliferativo de sete TOAs a partir da técnica do AgNOR, com médias variando de 1,45 até 2,64, indicando um baixo índice proliferativo, dentro do comportamento esperado para lesões neoplásicas benignas. Do Carmo e Silva⁴², ao estudarem o ameloblastoma e o TOA, verificaram que não há diferença significativa entre o número de NORs dos dois tumores, apesar do comportamento infiltrativo distinto e localmente invasivo do ameloblastoma. Estando o número de NORs associado ao potencial proliferativo dos tumores, outros fatores estariam contribuindo para a diferença de comportamento patológico.⁴²

Todos os tumores odontogênicos adenomatóides apresentaram positividade para o PCNA, predominando uma forte marcação nas células epiteliais das áreas sólidas e nas células colunares das estruturas adenomatóides. Mesmo nos dois tumores que apresentaram fraca positividade, foi possível identificar células epiteliais positivas nas áreas sólidas e em cordões epiteliais. Esses resultados se aproximam dos obtidos por Crivelini et al.⁴³ que ao estudarem 8 casos de TOA puderam observar expressão do PCNA de fraca a forte em todos os casos estudados, com predomínio nas células epiteliais das áreas sólidas, estruturas adenomatóides e nas células cúbicas e poliédricas dos cordões e ausentes nas células fusiformes e estreladas dispersas nas áreas sólidas. A positividade das células epiteliais do TOA para o PCNA também foi registrada por Barboza et al.⁴⁴ No entanto, os autores alertam para a possibilidade da expressão estar relacionada não só à maior proliferação celular, mas também estar relacionada aos mecanismos de reparo de DNA e também ao tempo de vida média do antígeno, maior do que o tempo do ciclo celular. Foi encontrado apenas um trabalho na literatura em que é relatada negatividade para a expressão de PCNA em TOA. Yamamoto⁴⁶ realizou um estudo comparativo entre o fibroma ameloblástico, o fibro-odontoma ameloblástico, odontoameloblastoma e TOA. Os autores relataram positividade para o PCNA apenas no odontoameloblastoma e no fibroma ameloblástico. Vale ressaltar que o estudo envolveu apenas um caso de TOA.

A positividade para o P53, mesmo que fraca, observada na maioria dos TOAs avaliados neste estudo difere dos resultados encontrados por Crivelini et al.⁴³, mas é compatível com os achados de Barboza et al.⁴⁴ em que todos os oito tumores apresentaram

positividade, com fraca marcação. Além da escassez de trabalhos, os autores acreditam que comparações entre os resultados com P53 tornam-se difíceis devido a variações na técnica, pois a não recuperação antigênica em microondas pode afetar o índice de marcação.

O Ki-67 não foi detectado em dois casos de TOA, raras marcações foram observadas em um espécime e positividade foi observada em algumas áreas sólidas e estruturas adenomatóides de dois tumores. Leon et al.⁶ avaliaram 39 casos de TOA e também puderam observar baixa positividade para o Ki-67 nos casos estudados, o que reflete uma baixa atividade proliferativa para os tumores. Conforme pode ser visualizado na Tabela 3, os dois tumores que apresentaram fraca positividade para o PCNA também foram aqueles que apresentaram negatividade, ou fraca positividade para o p53 e para o Ki-67, sendo que o inverso também foi verdadeiro. Os tumores que apresentaram marcação expressiva para o PCNA foram aqueles que apresentaram maior positividade para os dois outros anticorpos estudados. Esse fato pode sugerir uma diferença de comportamento proliferativo entre as lesões, ainda dentro dos limites esperados para tumores desta natureza. Futuros trabalhos correlacionando o comportamento clínico das lesões, a longo prazo, com a evidenciação imunohistoquímica de marcadores de proliferação poderão confirmar se essa diferença se reflete no comportamento das lesões e no prognóstico dos pacientes.

Todos os casos de TOEC apresentaram positividade para o PCNA, sendo expressiva em quatro dos tumores estudados e fraca em apenas um dos casos. Já o p53 não foi detectado nas áreas tumorais. No entanto, a marcação positiva no epitélio de revestimento fornece um controle positivo para a reação. O mesmo resultado ocorreu com o Ki-67, indicando um baixo potencial proliferativo para as lesões, o que reafirma o comportamento patológico benigno e pouco agressivo esperado para esses tumores. A literatura mundial deixa clara a raridade dos Tumores Odontogênicos Epiteliais Calcificantes, o que se reflete também nos raros trabalhos disponíveis envolvendo estudos proliferativos desta patologia.

6 Conclusão

A análise comparativa dos resultados quantitativos/qualitativos da histoquímica de evidenciação das NORs e dos resultados imunohistoquímicos para os três anticorpos estudados confirmam o comportamento patológico neoplásico benigno do tumor odontogênico adenomatóide e do tumor odontogênico epitelial calcificante e a distribuição positiva do PCNA nas células epiteliais das áreas sólidas e adenomatóides do TOA e nas áreas sólidas de células epiteliais poliédricas do TOEC permitem sugerir estes sítios como os responsáveis pelo crescimento dos respectivos tumores.

Referências

1. Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. Histological typing of odontogenic tumours. Berlin: Springer Verlag; 1992.
2. Philipsen HP, Nikai H. Adenomatoid odontogenic tumour. In: Barnes L, Everson J W, Reichart O P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: Iarc; 2005. p 304-5.
3. Neville BW, Damm DD, Bouquot JE. Patologia oral e maxilofacial. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
4. Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. J Oral Maxillofac Surg 2006; 64(9): 1343-52.
5. Ajayi OF, Ladeinde AL, Adeyemo WL, Ogunlewe MO. Odontogenic tumors in Nigerian children and adolescents – a retrospective study of 92 cases. World J Surg Oncol 2004; 2(1): 39-44.
6. Leon J E, Mata G M, Fregnani E R, Carlos- Bregni R, Almeida O P, Mosqueda- Taylor A, et al. Clinicopathological and immunohistochemical study of 39 cases of Adenomatoid Odontogenic Tumour: a multicentric study. Oral Oncol 2005; 41(8): 835 – 42.
7. Marcucci G. Estomatologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
8. Effion OA, Odukoya O. Adenomatoid odontogenic tumour: a clinico- pathological analysis and melanin pigmentation study of 31 Nigerian cases. Niger Postgrad Med J 2005; 12(2): 131-5
9. Santos JN, Pinto PL, Figueiredo CRLV , Souza LB . Odontogenic tumors: analisys of 127 cases. Pesqui Odontol Bras 2001; 15(4): 308-13
10. Jones AV, Franklin CD. An analysis of oral and maxillofacial pathology found in children over a 30-year period. Int Paediatr Dent 2006; 16(1): 19-30
11. Adebayo ET, Ajike EO, Adekeye EO. Odontogenic tumours in children and adolescents: a study of 78 Nigerian cases. J Craniomaxillofac Surg 2002; 30(5): 267-72

* Normalização Segundo a Norma Vancouver.

12. Nigam S, Gupta S K, Chaturverdi KU. Adenomatoid odontogenic tumor – a rare case of jaw swelling. *Braz Dent J* 2005; 16(3): 251-3
13. Handschel JGK, Depprich RA, Zimmermann AC, Braunstein S, Kübler NR. Adenomatoid odontogenic tumor of the mandible: review of the literature and report of a rare case. *Head Face Med* 2005; 1(3): Available from:URL: <http://www.head-face-med/content/1/1/3>
14. Mendonça EF, Sousa HA. Tumor odontogênico adenomatóide associado a pré- molar retido. *ROBRAC*. 1991; 1(1): 16-9
15. Crivelini MM. Estudo da origem e natureza do tumor odontogênico adenomatóide pela expressão imunohistoquímica das citoqueratinas, laminina, colágeno IV, PCNA e P53 [Tese] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2003.
16. Miyake M, Nagahata S, Nishihara J, Ohbayashi Y. Combined adenomatoid odontogenic tumor and calcifying epithelial odontogenic tumor : report of case and ultrastructural study. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54(6): 788-93
17. Takeda Y, Kudo K. Adenomatoid odontogenic tumor associated with calcifying epithelial odontogenic tumor. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1986; 15(4): 469-73
18. Mosqueda- Taylor A, Carlos- Bregni R, Ledesma – Montes C, Fillipi R Z, Almeida OP, Vargas PA. Calcifying epithelial odontogenic tumor- like áreas are commom findings in adenomatoid odontogenic tumors and not a specific entity. *Oral Oncol* 2005; 41(2): 214-5
19. Damm DD, White DK, Dummond JF, Pindexter JB, Henry BB. Combined epithelial odontogenic tymor: adenomatoid odontogenic tumor and calcifying epithelial odontogenic tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55(5): 487- 96
20. Bingham RA, Adrian JC. Combined epithelial odontogenic tumor – adenomatoid odontogenic tumor and calcifying epithelial odontogenic tumor: report of a case. *J Oral Maxillofac Surg* 1986; 44(7): 574-7
21. Montes-Ledesma C, MOsqueda-Taylor A, Romero de Leon E, de la Piedra Garza M, Goldberg Jaukin P, Portilla Robertson J. Adenomatoid odontogenic tumour with features of calcifying epithelial odontogenic tumour. (The so- called combined epithelial odontogenic tumour). Clinico- pathological report of 12 cases. *Eur J Câncer Oral Oncol* 1993; 29B(3):221-4.

22. Takata T, Slootweg PJ. Calcifying epithelial odontogenic tumor. In: Barnes L, Everson J W, Reichart O P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: Iarc; 2005. p 302-3.
23. Pinborg JJ: Calcifying epithelial odontogenic tumour. Acta Pathol Microbiol Scand. 1955; 111: 71.
24. Patiño B, Fernández-Alba J, Gracia- Rozado A, Martin R, López- Cedrun JL, Sanroman B. Calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor: A series of 4 distinctive cases and a review of the literature. J Oral Maxillofac Surg 2005; 63(9): 1361-8.
25. Ungari C, Poladas G, Giovannetti F, Carnevale C, Iannetti G. Pindborg tumor in children. Craniofac Surg 2006, 17(2): 365- 368.
26. Mainwaring AR, Ahmed A, Hopkinson JM, Anderson P. A clinical and electron microscopic study of a calcifying epithelial odontogenic tumour. J Clin Pathol 1971; 24(2): 152-8
27. Ng KH, Siar CH. A clinicopathological and immunohistochemical study of the calcifying epithelial odontogenic tumour (Pindborg tumour) in Malaysians. J Laryngol Otol 1996; 110(8): 757-62.
28. Houston GD, Fowler CB. Extraosseous calcifying epithelial odontogenic tumor. Report of two cases and review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo 1997; 83(5): 577-83.
29. Philipsen HP, Reichart PA. Calcifying epithelial odontogenic tumour: biological profile based on 181 cases from the literature. Oral Oncol 2000; 36(1): 17-26.
30. Manor Y, Mardinger O, Katz J, Taicher S, Hirsberg A. Peripheral odontogenic tumours- diferencial diagnosis in gingival lesions. Int J Oral Maxillofac Surg 2004; 33(3): 268-73
31. Kaplan I, Buchner A, Calderon S, Kaffe I. Radiological and clinical features of calcifying epithelial odontogenic tumour. Dentomaxillofac Radiol 2001; 30(1): 22-8.
32. Deboni MCZ, Naclério – Homem MG, Pinto Junior DS Traina AA, Cavalcanti MGP. Clinical, radiological and histological features of calcifying epithelial odontogenic tumor: case report. Braz Dent J 2006; 17(2):171-4.

33. Jardim PTC. Estudo comparativo entre o ameloblastoma e o craniofaringioma utilizando a técnica histoquímica do AgNOR. [dissertação]. Diamantina:Faculdade Federal de Odontologia de Diamantina; 2000.
34. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. O citoesqueleto. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biologia Molecular da célula.. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas. 1997. p787-862.
35. Silva RM, Nogueira CIM, Silva PJM, Costa AS, Paz AMDC, Silva Faa et al. Contribuição ao estudo dos ameloblastomas. RGO 1990; 38(5): 395-9.
36. Thompson IOC, Van Rensburg LJ, Philips VM. Desmoplastic ameloblastoma: correlative histopathology, radiology and CI-MR imaging. J Oral Pathol Med 1996; 25(7): 405-10.
37. Warnakulasuriya KAAS, Jhonson NW. Nucleolar organiser region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 1993; 22(2): 77-81.
38. Costa ALL. Dupla marcação AgNOR/PCNA e Ki-67/AgNOR em carcinoma epidermóide de boca [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1997.
39. Hanemann JAC. Estudo comparativo entre a graduação histológica e o número de regiões organizadoras nucleolares (NORs) em carcinomas espinocelulares de boca [tese]. Diamantina: Faculdade Federal de Odontologia de Diamantina;1999.
40. Folpe AL, Tsue T, Rogerson L, Weymuller E, Oda D, True LD. Odontogenic ghost cell carcinoma: a case report with immunohistochemical and ultrastructural characterization. J Oral Pathol Med 1998; 27(4): 185-9.
41. Medeiros MCS, Freitas RA, Souza LB. Análise quantitativa das AgNORs nos tipos histológicos de ameloblastoma e no tumor odontogênico adenomatóide. RGO 1997; 45(2): 67-70.
42. do Carmo MAV, Silva EC. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumours (AOTs). J Oral Pathol Med 1998; 27(4):153-6.
43. Crivelili MM, Soubhia AMP, Felipini RC. Study on the origin and nature of the adenomatoid odontogenic tumor by immunohistochemistry. J Appl Oral Sci 2005; 13(4): 406-12.

44. Barboza CAG, Pinto LP, Feitas RA, Costa A LL, Souza LB. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and P53 protein expression in ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. *Braz Dent J* 2005; 16(1): 56-61.
45. Wascem NH, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990; 96(pt1): 121-9
46. Yamamoto K, Yoneda K, Yamamoto T, Ueta E, Osaki T. An immunohistochemical study of odontogenic mixed tumours. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B(2): 122-8.
47. Taftachi R, Ayhan A, Ekici S, Ergen A, Ozen H. Proliferating- cell nuclear antigen (PCNA) as an independent prognostic marker in patients after prostatectomy: a comparison of PCNA and Ki- 67. *BJU Int* 2005; 95(4): 650-4.
48. Bantis A, Giannopoulos A, Gonidi M, Liossi A, Aggelonidou E, Petrakakou E, et al. Expression of P120, Ki- 67 and PCNA as proliferation biomarkers in imprint smears of prostate carcinoma and their prognostic value. *Cytopathology* 2004; 15(1): 25-31.
49. Ploton D, Menager M, Jeanneson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the topical level. *Histochem J* 1986; 18(1):5-14.
50. Cabrini RL, Schwint AE, Mendez A, Femopase F, Lanfranchi H, Itoiz ME. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human normal oral mucosa, papiloma, and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1992; 21(6):275-9.