

Quantificação de AgNORs e expressão do PCNA em ceratocisto odontogênico

Quantification of AgNORs and expression of PCNA in odontogenic keratocyst

Márcia Gaiger de Oliveira*
 Manoel Sant'Ana Filho**
 Pantelis Varvaki Rados**
 Isabel da Silva Lauxen***

RESUMO

Para realização deste estudo foram selecionados quinze casos de Ceratocisto Odontogênico e submetidos à técnica histoquímica de AgNOR e à técnica imunohistoquímica do PCNA. Observou-se que o Ceratocisto Odontogênico possui uma média de 1,84 AgNORs por núcleo e que 74,98% das células são positivas ao PCNA. Uma característica constante foi que tanto para o AgNOR quanto para o PCNA a camada suprabasal apresentou médias estatisticamente superiores à camada basal. Conclui-se, portanto, que o Ceratocisto Odontogênico é uma lesão benigna com proliferação do epitélio, principalmente na camada suprabasal.

UNITERMOS

Ceratocisto Odontogênico, AgNOR e PCNA.

SUMMARY

Fifteen cases of Odontogenic Keratocyst were selected and submitted to AgNOR technique and to PCNA immunohistochemical technique. It was observed that the Odontogenic Keratocyst has an average of 1,84 AgNORs per nucleus and that 74,98% of the cells are positive for PCNA. The fact that the suprabasal layer presented averages statistically higher than the basal layer for AgNOR as well as for PCNA was a constant characteristic. We can conclude that the Odontogenic Keratocyst is an a benign lesion with proliferation of the epithelium, mainly on the suprabasal layer.

KEYWORDS

Odontogenic Keratocyst, AgNOR e PCNA

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O Ceratocisto Odontogênico é uma lesão originada provavelmente de remanescentes da lâmina dentária, podendo chegar a grandes dimensões antes de se manifestar clinicamente, e que, ao contrário de outros cistos, tem uma tendência particular de recidivar após o tratamento cirúrgico (EBLING, 1977; TOMMASI, 1989; SHEAR, 1989; REGEZZI E SCIUBBA, 1991; NEVILLE, 1998).

Histopatologicamente apresentam-se com uma ou mais cavidades císticas, com parede fibrosa bastante fina, epitélio de revesti-

mento composto de uma superfície geralmente paracertinizada, usualmente corrugada, ondulada ou pregueada, com poucas camadas de células e a interface entre epitélio e o tecido conjuntivo é tipicamente achatada sem a formação de papilas. As células da camada basal apresentam-se polarizadas e dispostas em paliçada. O tecido conjuntivo geralmente é pobre em células inflamatórias (BRANNON, 1977; SHAFER et al, 1985; SHEAR, 1979; TOMMASI, 1989; REGEZZI e SCIUBBA 1991).

A atividade proliferativa do revestimento epitelial é um dos fatores que se imagina ter papel significativo no crescimento do cisto e na sua possível recidiva (MAIN, 1985; MATTHEWS et al 1988).

A técnica de impregnação pela Prata (AgNOR) é específica para detecção de NORs (Regiões Organizadoras Nucleolares), as quais são demonstradas pela ligação da Prata às proteínas ácidas não histônicas associadas a estas regiões. Estas proteínas são chamadas de proteínas associadas às Regiões Organizadoras Nucleolares (NORAPs) e incluem a RNA polimerase I, proteína C23 (nucleolina) e a fosfoproteína B23. Suas funções são ainda um pouco obscuras, mas, provavelmente, elas atuam como reguladoras durante a transcrição de DNAr (DNA ribossômico) para RNAr (RNA ribossômico) e mantêm a conformação do DNA nas NORs (PLOTON et al, 1986; CROCKER et al,

1989; GIRI et al, 1989; LANDINI, 1990; ORREL et al, 1991).

O estudo das NORs é, portanto, uma via para o entendimento do comportamento das lesões tumorais, uma vez que a contagem de AgNORs, nas células, tem sido mostrada como discriminadora entre certas lesões benignas e malignas, informadora sobre atividade proliferativa, ploidia celular e conteúdo de DNA (HERNANDEZ-VERDUN, 1983; PLOTON et al, 1986; CROCKER et al, 1988 A; CROCKER et al, 1989; GIRI et al, 1989; CROCKER, 1990; ORREL et al, 1991; COLEMAN et al, 1996).

SIRRI et al (1997) estudaram a quantidade de proteínas AgNORs com citometria de fluxo e descobriram que a proteína B23 e a Nucleolina são as que existem em maior quantidade. Para estes autores, a quantidade de proteínas pode ser um marcador de proliferação, porque esta quantidade é relacionada com as fases do ciclo celular, baixa para G1, e alta para G2 e S. Valores altos indicam mais células em S e G2 e menos em G1 e isto é uma das características de um ciclo celular rápido.

É certo que o número de NORs ativas está relacionado com a fase do ciclo celular *in vitro* e que este número se altera em certas linhagens de células com um estímulo hormonal. Também tem sido mostrado que, em cromossomos, a quantidade de impregnação pela Prata está relacionada com o ní-

*Mestre de Patologia Bucal

**Professor do Programa de Pós Graduação da FO/UFRGS (Patologia Bucal)

***Bióloga - Técnica do laboratório de patologia bucal da FO/UFRGS

vel de transcrição do DNAr (CROCKER *et al.*, 1988B).

Há um consenso entre os pesquisadores de que o número de sítios de AgNORs cresce com a diminuição da diferenciação e o aumento da malignidade. Este fenômeno tem sido observado em Linfomas Não-Hodgkin, lesões melanocíticas de pele, tumores de mama, tumores cutâneos, neoplasias ósseas dos maxilares e tumores de glândulas salivares, entre outras (CROCKER *et al.*, 1988A; CROCKER *et al.*, 1988B; EGAN e CROCKER, 1988; SMITH *et al.*, 1988; MATSAMURA *et al.*, 1989; LANDINI, 1990; MAGALHÃES e ARAÚJO, 1996; DERENZINI *et al.*, 1998).

COLEMAN *et al.* (1996) analisaram o número de AgNORs/núcleo em Cistos Odontogênicos e Ameloblastomas e encontraram uma média de 2,07 para o Ceratocisto, contando somente as células da camada basal do revestimento epitelial. Estes autores acreditam que a área exata escolhida para contagem de AgNORs pode influenciar e modificar os resultados.

ALLISON e SPENCER (1993) realizaram a contagem de AgNORs em Ameloblastoma e Cistos Odontogênicos. A média da contagem de AgNORs para todos os cistos odontogênicos variou entre 2,02 e 2,65, e para os Ameloblastomas foi de 2,24, indicando que este método não tem valor como diagnóstico nem como prognóstico. Sobre os Ceratocistos Odontogênicos eles concluíram que o potencial proliferativo, provavelmente grande desta lesão, não é refletido na contagem de AgNORs e sugere que marcadores de proliferação celular como o Ki-67 e o PCNA podem ser uma linha de investigação melhor para o estudo da histogênese dessas lesões.

O PCNA é uma proteína nuclear de 36kD associada com o ciclo celular. Esta se distribui no ciclo celular, aumentando na fase G atingindo seu pico na interface das fases G₂/S, diminuindo na fase G e alcançando níveis baixos na fase M e em células quiescentes onde é virtualmente indetectável pelos métodos imunohistoquímicos. Isto faz com que o PCNA seja um marcador útil de proliferação celular (MC CORMICK e HALL, 1992; TSAI e JIN, 1995).

EL MURTADI *et al.* (1996) estudaram a taxa de proliferação celular em 41 casos de Ceratocistos Odontogênicos pela expressão do PCNA e descreveram que a marcação por PCNA estava presente em todos os casos e que a marcação era mais predominante na camada suprabasal do que na camada basal e superficial do epitélio.

LI *et al.* (1994) realizaram uma análise quantitativa de células PCNA positivas no epitélio de Cistos Odontogênicos, Restos Epiteliais de Malassez em Granulomas Periapicais e mucosa bucal normal. A mar-

cação por PCNA estava presente em todos os epitélios, variando apenas em número e distribuição de acordo com cada caso. O Ceratocisto Odontogênico mostrou o maior número de células PCNA positivas. A maioria delas localizadas na camada suprabasal e, menos de 5%, na camada basal; enquanto que o epitélio da mucosa bucal contém um número significativamente alto de células positivas na camada basal.

PIATELLI *et al.* (1998) também estudaram a expressão do PCNA em Ameloblastomas e Cistos Odontogênicos e encontraram uma média de 23,5% de células PCNA positivas nos Ceratocistos Odontogênicos com uma expressão predominantemente na camada suprabasal. Para estes autores, a expressão predominante na camada suprabasal mostra que o Ceratocisto odontogênico tem um compartimento proliferativo suprabasal, podendo explicar seu comportamento clínico mais agressivo e sua tendência a recidivar.

A partir desses conhecimentos, o objetivo deste trabalho foi de quantificar o número de AgNORs por núcleo e a expressão do PCNA em Ceratocisto Odontogênico para avaliar a proliferação celular.

METODOLOGIA

Foram selecionados quinze casos de Ceratocisto Odontogênico paraceratinizado, obtidos dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A seleção foi feita a partir da análise ao microscópio óptico de uma lâmina de cada caso, corada pela Hematoxilina de Harris e Eosina (H&E).

Após a escolha dos casos de Ceratocisto Odontogênico, foram feitos dois cortes de 3µm de espessura de cada bloco de material incluído em parafina. Uma lâmina submetida à técnica de impregnação pela Prata das Regiões Organizadoras Nucleolares (AgNOR) e outra à marcação pelo PCNA (clone PC10, DAKO A/S, Denmark).

A técnica de AgNOR foi desenvolvida baseada na técnica descrita por PLOTON *et al.* em 1986.

A técnica imunohistoquímica do PCNA foi desenvolvida conforme instruções do fabricante. A diluição do anticorpo utilizada foi de 1:100.

Análise das lâminas:

Para análise quantitativa de AgNORs e células PCNA +, as lâminas foram observadas em microscópio óptico ZEISS, modelo Standard 20, com aumento de 400X.

Os campos escolhidos para análise eram aleatórios, seguindo o revestimento epitelial do cisto, sendo suprimidas as áreas que apresentaram dobras ou ausência de epitélio.

De cada área escolhida, a imagem, sob um foco fixo, e com clareza de campo, era capturada por uma câmera de vídeo JVC, modelo TK-C620, acoplada ao microscópio e transmitida para um computador Pentium MMX, onde a imagem era digitalizada e analisada pelo Sistema de processamento e análise de imagem - IMAGELAB (Softium Sistemas, São Paulo).

Neste programa foi usado o recurso que permite a contagem manual, realizada através do apontamento pela seta do "mouse" das estruturas a serem contadas na imagem exibida no monitor. Em cada camada analisada foi feita uma contagem total do número de células do campo e depois a contagem do número de AgNORs. Este procedimento foi realizado tanto para as células da camada basal quanto para as células da camada suprabasal. As células superficiais não foram contadas.

O critério utilizado para identificar as células da camada suprabasal foi a morfologia nuclear. As células acima da camada basal com núcleo esférico foram consideradas como células suprabasais e as células que apresentaram forma nuclear pavimentosa foram consideradas como superficiais e não foram contadas.

Após a técnica de impregnação pela Prata, as NORs ativas aparecem no núcleo como pontos com coloração de castanho escuro a preto, arredondados e bem definidos sobre um fundo amarelado ou castanho. (Figura 1)

Durante a contagem das AgNORs, nas células epiteliais dos campos selecionados, cada ponto foi contado como uma unidade dentro do núcleo, sempre que podiam ser perfeitamente individualizados. Nos casos em que os pontos apareciam unidos, eram contados como uma única unidade. (ORREL *et al.*, 1991; CROCKER, 1995).

A marcação por PCNA é quase que completamente confinada ao núcleo e pode mostrar um padrão difuso ou granular, ou uma mistura dos dois (Figura 2). Raramente, foi observada marcação citoplasmática. Neste estudo, toda marcação nuclear foi considerada positiva, indiferentemente de seu padrão ou intensidade de cor.

Foram considerados como PCNA positivos os núcleos de células que se apresentaram com coloração castanha, não importando a intensidade ou o tipo de granulação. Cada núcleo, com marcação imunohistoquímica, foi contado como uma unidade.

Os dados de todos os campos analisados em cada lâmina eram anotados em uma planilha. O total de células contadas, em cada lâmina, foi de 1000 células, incluindo as células da camada basal e suprabasal. O número médio de NORs/núcleo para cada caso foi obtido pela média aritmética.

Análise Estatística:

Os resultados da técnica do AgNOR e da técnica do PCNA foram submetidos ao teste de correlação através do Coeficiente de Correlação de Pearson (r).

Para comparar as médias obtidas na camada basal e suprabasal pelo AgNOR e comparar as médias obtidas pelo PCNA, foi utilizado o Teste t-student para amostras emparelhadas com nível de significância de 0,001%.

Folha de Legendas:

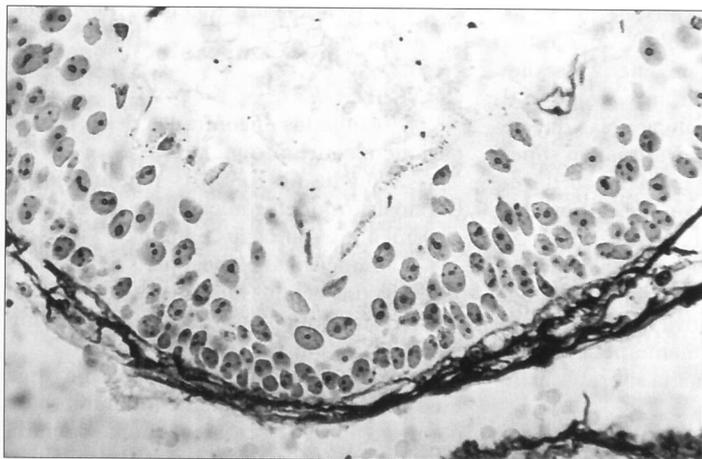


Figura 2
Campo microscópico mostrando expressão do PCNA predominante na camada suprabasal. 400X

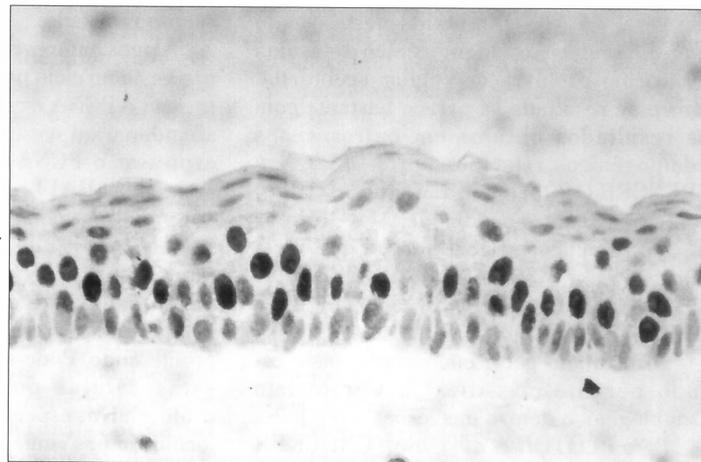


Figura 1 - Campo microscópico mostrando impregnação das NORs pela Prata. AgNORs aparecem como pontos de coloração castanho escuro 400X

RESULTADOS:

Quantificação de AgNORs:

A média geral de AgNORs em 1000 células contadas foi de 1841. A camada basal apresentou uma média de 730,80 AgNORs e a camada suprabasal 1110,60.

Analisando os resultados obtidos na técnica do AgNOR observamos que o número médio de AgNORs/núcleo na camada basal eram menores que na camada suprabasal. Verificamos através do teste t-student que existe uma diferença estatisticamente significativa entre esses dados para uma probabilidade de erro de 1% (Tabela 1).

Expressão do PCNA:

A média geral de células PCNA + foi de 749,8 em 1000 células contadas. A camada basal apresentou uma média de 293,73 células PCNA + e a camada suprabasal 455,46.

Analisando a expressão do PCNA observamos que o número de células positivas na camada basal era inferior ao número de células positivas da camada suprabasal. Verificamos através do teste t-student que existe diferença estatisticamente significativa entre esses dados (Tabela 2).

Médias de AgNORs X Médias do PCNA:

A média geral de AgNORs/núcleo foi de 1,84 e a média do número de células PCNA positivas foi de 749,80 a cada 1000 células. A análise estatística não mostrou corre-

Tabela 1 - Comparação de médias de AgNORs na camada basal e suprabasal de Ceratocisto Odontogênico. (Porto Alegre, 1999).

Camada	Média	Desvio-Padrão	P
Basal	730.8000	74.698	0.001*
Suprabasal	1110.6000	106.735	

Tabela 2 - Comparação de médias de células PCNA positivas na camada basal e suprabasal de Ceratocisto Odontogênico. (Porto Alegre, 1999)

Camada	Média	Desvio-Padrão	P
Basal	293.7333	78.868	0.001*
Suprabasal	455.4667	82.474	

lação entre esses dados. Quando comparado os resultados obtidos na camada basal entre a técnica do AgNOR e a expressão do PCNA observamos que não houve correlação estatisticamente significativa entre esses dados. O mesmo aconteceu quando analisamos os resultados obtidos entre as duas técnicas na camada suprabasal.

DISCUSSÃO

Analisando os resultados obtidos com a técnica do AgNOR encontrou-se uma média geral de 1,84 AgNORs por núcleo. Este resultado concorda e se aproxima dos resultados relatados por COLEMAN *et al* (1996) de 2,07 AgNORs/núcleo e ALLISON

e SPENCER (1993) que encontraram uma média de 2,65 em Ceratocisto Odontogênico.

De acordo com GIRI *et al* (1989), que estudaram lesões malignas e benignas de mama, uma contagem superior a 3 AgNORs por núcleo é altamente sugestiva de malignidade.

A média geral de AgNORs por núcleo encontrada no Ceratocisto Odontogênico é compatível com uma lesão benigna e concorda com GIRI *et al* (1989). Também está de acordo com outros estudos como PILLAI *et al* (1994) sobre progressão tumoral em mucosa bucal, CROCKER *et al* (1988) em linfomas, XIE *et al* (1997) em lesões epiteliais, ORREL *et al* (1989) em nevus e

melanoma e MATSAMURA *et al* (1989) em tumores de glândulas salivares.

Não se pode afirmar somente pela média geral de AgNORs obtida neste estudo que o Ceratocisto Odontogênico seja uma lesão com proliferação celular acentuada, pois esse resultado se parece bastante com os resultados obtidos em outros cistos odontogênicos relatados por ALLISON e SPENCER (1993) e COLEMAN *et al* (1996) e também com a média de AgNORs por núcleo da mucosa bucal normal que varia entre 1,51 a 1,54 segundo PILLAI *et al* (1994), 2,3 para XIE *et al* (1997) e 2,95 para CABRINI *et al* (1992).

O resultado geral encontrado neste estudo permite classificar o Ceratocisto Odontogênico dentro das lesões benignas.

Para PLOTON *et al* (1986), CROCKER *et al* (1988A) e SMITH *et al* (1988) a quantidade de impregnação pela Prata está diretamente relacionada ao nível de transcrição de DNAr e um aumento na expressão dos sítios de AgNORs será esperado em células em proliferação (CROCKER *et al*, 1988A).

Comparando-se os resultados da camada basal, em relação a suprabasal, observou-se que houve uma diferença significativa entre essas duas camadas, com uma média maior na camada suprabasal. Este dado confirma que o Ceratocisto Odontogênico é uma lesão que tem um potencial proliferativo, já que as células da camada suprabasal possuem uma atividade de síntese maior que as células da camada basal onde estão em proliferação.

Acredita-se que o número de AgNORs por núcleo reflete a atividade de transcrição das células e, que, no Ceratocisto Odontogênico, uma média maior na camada suprabasal demonstrou que, nesta camada, as células estão em maior atividade de síntese de DNA. Pode-se concluir, pois, que o epitélio desta lesão possui uma característica proliferativa.

Para o PCNA, que é descrito como um marcador de proliferação celular, observou-se uma média de 749,8 células positivas a cada 1000 células contadas, ou seja, 74,98% das células são positivas ao PCNA. Este resultado mostra uma positividade alta do Ceratocisto Odontogênico.

Constatou-se, ainda, que existe uma diferença entre a camada basal e suprabasal, com uma expressão do PCNA sempre maior na camada suprabasal. Esta diferença foi estatisticamente significativa.

O resultado deste estudo difere das médias encontradas por EL MURTADI *et al* (1996), TAKAHASHI *et al* (1998) e PIATELLI *et al* (1998) em estudos sobre a expressão do PCNA em Ceratocisto Odontogênico. Nesses estudos, as médias gerais variaram de 15,8 a 29,9% de células

positivas. Já LI *et al* (1994) encontraram uma média de 94,4% de células positivas, também um resultado que difere do estudo realizado.

Alguns autores ressaltam que células que não estão no ciclo podem aparentemente expressar o PCNA e células que recentemente abandonaram o ciclo celular podem ainda expressar o PCNA em virtude de sua alta meia vida (HALL *et al*, 1990). Estes fatores poderiam contribuir para uma expressão de 74,98% de células PCNA positivas neste estudo.

Porém, outros autores dizem que se as células que expressaram o PCNA não estão proliferando. Pode-se, assim, interpretar que estas células possuem um potencial proliferativo, especialmente aquelas que se localizam nas camadas suprabasal ou superiores onde esta divisão celular não deveria estar ocorrendo em condições normais (HUANG *et al*, 1995; MICHHELL, 1995).

Acredita-se que, no estudo realizado, as células que expressaram o PCNA refletem a característica proliferativa do Ceratocisto Odontogênico, principalmente pela marcação predominante da camada suprabasal do epitélio.

Essa expressão maior do PCNA na camada suprabasal quando comparado com a camada basal do epitélio concordam com os trabalhos de LI *et al* (1994), EL MURTADI *et al* (1996), TAKAHASHI *et al* (1998) e PIATELLI *et al* (1998) em Ceratocisto Odontogênico. Em todos estes estudos os autores relataram esta característica.

Tanto pela quantificação de AgNORs, quanto pela expressão do PCNA, observou-se que a camada suprabasal é um compartimento proliferativo no Ceratocisto Odontogênico o que poderia justificar seu comportamento clínico agressivo e tendência a recidivar. Normalmente, em tecidos epiteliais, o compartimento de células proliferativas é a camada basal.

Isto pode explicar os achados no estudo e também de LI *et al* (1994) e SLOOTWEG (1995) quanto a expressão do PCNA ser sempre maior na camada suprabasal do Ceratocisto Odontogênico.

A partir dos resultados obtidos neste estudo parece claro que as duas técnicas foram capazes de avaliar a proliferação celular, em Ceratocisto Odontogênico, quando analisados os resultados nas diferentes camadas. Observando os dados podemos ver que no Ceratocisto Odontogênico a expressão geral do PCNA nos reflete uma lesão proliferativa já no resultado geral enquanto que a quantificação de AgNORs precisa de uma cuidadosa análise e interpretação dos dados.

Nesta lesão estudada, uma contagem geral, sem análise detalhada da localização

das células, poderia induzir a pensar que a quantificação de AgNORs não reflete seu potencial proliferativo, enquanto que a análise imunohistoquímica pelo PCNA é uma linha de investigação mais confiável, conforme sugeriram ALLISON e SPENCER (1993).

Através da técnica do AgNOR e do PCNA aplicadas no Ceratocisto Odontogênico conclui-se que o epitélio desta lesão possui uma característica proliferativa e é possível afirmar que apesar da característica cística predominante esta lesão possui um potencial de crescimento tumoral.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste estudo permitem concluir que:

- A média de AgNORs por núcleo no Ceratocisto Odontogênico foi de 1,84; o que classifica a lesão como benigna.

- Ceratocisto Odontogênico apresentou 74,98% das células analisadas positivas ao PCNA; o que classifica a lesão como proliferativa.

- A camada suprabasal mostrou uma média de AgNORs/núcleo e um número de células PCNA + maior que a camada basal. Esta diferença foi estatisticamente significativa.

- As duas técnicas marcaram proliferação celular. Estatisticamente, porém, não houve correlação entre os resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ALLISON, RT.; SPENCER, S. Nucleolar organiser regions in odontogenic cysts and ameloblastomas. **British Journal of Biomedical Science**, London, v.50, p.309-312. 1993.
2. BRANNON, R.B. The Odontogenic Keratocyst. A clinicopathologic study of 312 cases. Part II. Histologic features. **Oral Pathology**, Saint Louis, v.43, p.233-55. 1977.
3. CABRINI, R.L.; SCHWINT, A.E.; MENDEZ, A. *et al*. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v.21, p.275-279. 1992.
4. CROCKER, J.; EGAN, M.J. Correlation between NOR sizes and numbers in Non-Hodgking's lymphomas. **Journal of Pathology**, Chichester, v.156, p. 223-239. 1988. (A)

5. CROCKER, J.; MACARTNEY, J.C.; SMITH, P.J. Correlation between flow cytometric and nucleolar organizer region data in Non-Hodgkin's lymphomas. **Journal of Pathology**, Chichester, v.154, p.151-156. 1988. (B)
6. CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, M.J. How we should count AgNORs? Proposals for a standardized approach. **Journal of Pathology**, Chichester, v. 158, p. 185-188. 1989.
7. CROCKER, J. Nucleolar organizer regions. **Currents Topics in Pathology**, [s.l.], v..82, p.91-149. 1990.
8. CROCKER, J. The trials and tribulations of interphase AgNORs. (Editorial). **Journal of Pathology**, Chichester, v.175, p.367-368. 1995.
9. COLEMAN, H.G.; ALTINI, M.; GROENEVELD, H.T. Nucleolar organizer regions (AgNORs) in odontogenic cysts and ameloblastomas. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 25, p.436-40. 1996.
10. DERENZINI, M.; TRERÈ, D; PESSION, A. *et al.* Nuclear function and size in cancer cells. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v.152, n.5, p.1291-1297. 1998.
11. EBLING, H. **Cistos e Tumores Odontogênicos**. 3^oed. Porto Alegre: URGs: Mac Graw-Hill, 1977. 183p.
12. EGAN, M.J.; CROCKER, J. Nucleolar organizer regions in cutaneous tumors. **Journal of pathology**, Chichester, v.154, p.247-253. 1988.
13. EL MURTARDI, A.; GREHAN, D.; TONER, M. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen staining in syndrome and non syndrome odontogenic keratocysts. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, Saint Louis, v.81, p.217-20. 1996.
14. GIRI, D.D.; NOTTINGHAM, J.F.; LAWRY, J. *et al.* Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. **Journal of Pathology**. Chichester, v.157, p.307-313. 1989.
15. HALL, P.A.; LEVISON, D.A.; WOODS, AL. *et al.* Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. **Journal of Pathology**, Chichester, v.162, p.285-94. 1990.
16. HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolar organizer regions. **Biology of the Cell**, [s.l.], v.49, p.191-202. 1983.
17. HUANG, W.Y.F.; COLTRERA, M.; SCHUBERT, M. *et al.* Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, Saint Louis, v.78, p.748-54. 1994.
18. LANDINI, G. Nucleolar Organizer regions (NORs) in pleomorphic adenomas of the salivary glands. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v.19, p.257-60. 1990.
19. LI, T.J.; BROWNE, R.M.; MATTHEWS J.B. Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaw cyst epithelium. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v.23: 184-189. 1994.
20. MAGALHÃES, M.G.; ARAÚJO, N.S. Utilização da técnica do AgNOR em neoplasias ósseas dos maxilares. **Revista de Pós-Graduação Faculdade de Odontologia de São Paulo**, São Paulo, v.3, n. 1, p.53-58. 1996.
21. MATTHEWS, J.B.; MASON, G.I.; BROWNE, R.M. Epithelial cell markers and proliferating cells in Odontogenic Jaw Cysts. **Journal of Pathology**, Chichester, v.156, p.283-290. 1988.
22. MAIN, D.M.G. Epithelial jaw cysts: 10 years of the WHO classification. **Journal of Oral Pathology**, v.14, p.1-7. 1985.
23. MATSAMURA, K.; SASAKI, K. TSUJI, T. *et al.* The nucleolar organizer regions associated proteins (Ag-NORs) in salivary gland tumors. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, Copenhagen. v.18. p.76-78. 1989.
24. MC CORMICK, D.; HALL, P.A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. **Histopathology**, Oxford, v.21, p.591-594. 1992.
25. MIGHEL, A. Proliferating cell nuclear antigen. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, Saint Louis, v.80, p.3-4. 1995.
26. NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M. *et al.* **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.485-490.
27. ORREL, J.M.; EVANS, A.T.; GRANT, A. A critical evaluation of AgNOR counting in benign Naevi and malignant Melanoma. **Journal of Pathology**, Chichester, v.163, p.239-244. 1991.
28. PIATELLI, A.; FIORINI, M.; SANTINELLI, A. *et al.* Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastomas and odontogenic cysts. **Oral Oncology**, Oxford, v.34, p.408-412. 1998.
29. PILLAI, K.R.; SUJATHAN, K.; KANNAN, S. *et al.* Argyrophilic nucleolar organizer regions in the evaluation of tumour progression in the oral mucosa: correlation with tissue pathology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, Berlin, v.120, p.723-726. 1994.
30. PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P. *et al.* Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region of the optical level. **Histochemistry Journal**, London, v.18, p.5-14. 1986.
31. REGEZZI, J.A.; SCIUBBA, J.J. **Patologia bucal - correlações clínico-patológicas**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p.229-32.
32. SHAFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M. **Tratado de patologia bucal**. 4^oed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985, cap.4, p.239-94: Cistos e Tumores Odontogênicos.
33. SHEAR, M. Cysts of the Jaws: Recent Advances. **Journal of Oral Pathology**, Copenhagen, v.14, p.43-59. 1985.
34. SIRRI, V.; ROUSSEL, P.; GENDRON, M-C. *et al.* Amount of the two major AgNOR proteins, Nucleolin, and Protein B23 is cell-cycle dependent.

Cytometry, New York, v.28, p.147-156. 1997.

35. SLOOTWEG, P.J. p53 protein and Ki-67 reactivity in epithelial odontogenic lesions. An immunohistochemical study. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v.24, p.393-7. 1995.

36. SMITH, P.J.; SKILBECK, N.; HARRISON, A. *et al.* The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. **Journal of Pathology**, Chichester, v.155, p.109-112. 1988.

37. STENMAN, G; MAGNUSSON, B; LENNARTSON, B. *et al.* In vitro growth characteristics of human odontogenic keratocysts and dentigerous cysts. **Journal of Oral Pathology**, Copenhagen, v.15, p.143-45. 1986.

38. TAKAHASHI, H.; FUJITA, S.; YAMABE, S. Comparision of proliferating cell nuclear antigen expression in odontogenic Keratocyst and ameloblastoma: na immunohistochemical study. **Analytical Cellular Pathology**, Amsterdanm, v.16, p.185-192. 1998.

39. TOMMASI, A.F. **Diagnóstico em patologia bucal**. 2^oed. São Paulo: Pancast Editorial, 1989. p. 279-87.

40. TSAI, S.T.; JIN, Y.T. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in oral cell carcinomas. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v.24, p.313-5. 1995.

41. XIE, X.; CLAUSEN, O.P.F.; SUDBÖ, J. *et al.* Diagnostic and prognostic value of nucleolar organiser regions in normal ephitelium, dysplasia and squamous cell carcimona of the oral cavity. **Cancer**, London, v.79, p.2200-8. 1997.

Endereço para correspondência:

Pantelis Varvaki Rados
Rua Benjamin Constant n°1440/302
Porto Alegre - RS- CEP 90550-002
E-mail: pantelis@ufrgs.br