

Marcadores Biológicos: PCNA e Ki-67

Breve Revisão

EMILIA ANGELA LOSCHIAVO ARISAWA*, ELISABETE MORAES**, ROSILENE FERNANDES DA ROCHA**, JANETE DIAS ALMEIDA**

RESUMO

A utilização de técnicas imuno-histoquímicas, usando marcadores biológicos de proliferação celular, aplicados a análise histopatológica, permite a compreensão das alterações morfo-funcionais que ocorrem no processo de transformação neoplásica. Estas técnicas aliadas aos dados clínicos e histopatológicos fornecem informações úteis sobre o comportamento biológico e possível prognóstico das neoplasias, além de auxiliar no estabelecimento de terapias a serem aplicadas. Neste estudo analisamos, numa breve revisão, os resultados obtidos em alguns trabalhos realizados utilizando os marcadores PCNA e Ki-67 em diferentes tipos de neoplasias, indicando quais as vantagens que podem ser obtidas com sua utilização.

UNITERMOS

Anticorpos monoclonais; marcadores biológicos; proliferação celular.

ARISAWA, E. A. L., MORAES, E. PCNA and Ki-67 cell-cycle makers: A brief review. *Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos*, v.2, n.1, p. 54-60, jan./jun., 1999.

ABSTRACT

The use of cell-cycle makers is an easy way of accurately assessing the growth fraction of human neoplasm. Thus, the detection and counting of these cells would allow the evaluation of either the tumor-growth rate or the therapeutic efficiency and consequently the prognostic aspects of the disease. The present paper reviewed the current knowledge about proliferative-cell detection emphasizing PCNA and Ki-67, their applicability and reliability in the diagnosis and prognosis of cancer.

UNITERMS

Cell-cycle marker; Ki-67; monoclonal antibody; PCNA.

*Aluno do Curso de Pós-graduação em Odontologia- Área de Concentração em Biopatologia Bucal e Diagnóstico (Nível Doutorado)-Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP- 12245.000 – São José dos Campos- SP

** Departamento de Biopatologia Bucal e Diagnóstico - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- UNESP- 12245.000 – São José dos Campos- SP

INTRODUÇÃO

O estudo da cinética celular, de seus mecanismos reguladores e de sua inter-relação com fatores de crescimento, oncogenes e anti-oncogenes tem estado em evidência, ultimamente, devido às informações que podem fornecer com relação a diagnóstico e prognóstico das mais variadas neoplasias (Warnakulasuriya & Johnson³⁵, 1994).

O emprego de marcadores biológicos na avaliação do comportamento clínico das neoplasias constitui importante instrumento auxiliar, posto que as alterações determinantes da progressão de qualquer carcinogênese são resultado de numerosos eventos celulares que ocorrem a nível genético e bioquímico.

A utilização de técnicas imuno-histoquímicas, aliando simplicidade, facilidade de manuseio pelos patologistas e amplo uso para diagnóstico, favoreceram inúmeros estudos correlacionando os resultados obtidos à gradação e ao prognóstico das neoplasias.

A aplicação de marcadores de proliferação celular, destacando-se neste artigo o uso do PCNA (antígeno nuclear de células proliferativas) e do Ki-67 (antígeno nuclear associado ao ciclo celular), asseguram, não só uma medida mais acurada da quantidade de células em proliferação, por estarem expressas nos vários estágios do ciclo celular, como a possibilidade de investigação das neoplasias humanas de maneira simplificada, rápida e pouco dispendiosa (Hall & Levinson¹⁵, 1990; Rabenhorst et al.²⁷⁻⁸ 1993 e 1994).

CICLO CELULAR E MECANISMOS REGULADORES

A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da complementação do ciclo celular. Este engloba uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma seqüência lógica e a divisão destes componentes em duas células filhas (Levine et al.¹⁹, 1994).

Existem pelo menos quatro fases distintas no ciclo celular: o período antes da síntese de DNA (G1), a fase de síntese de DNA (S), o período após a replicação do DNA (G2) e a fase mitótica (M)

que culmina na divisão celular (Levine et al.¹⁹, 1994; Rabenhorst et al.²⁸, 1994). As células fora do ciclo celular estão na chamada fase G0 e podem permanecer nesta fase por tempo indeterminado (Hall & Levinson¹⁵, 1990; Alberts et al.², 1994; Rabernhost et al.²⁷⁻⁸, 1993 e 1994).

Estudos sobre os mecanismos envolvidos nesse processo, iniciados nos anos setenta, evidenciaram que estes são dirigidos por um grande número de macromoléculas controladoras, descritas por Hartwell e Weinert, ativadas em seqüências altamente organizadas e que funcionam como verdadeiros *check points* (Hartwell & Weinert¹⁷, 1989).

Estas moléculas atuam como um sistema de controle do ciclo celular, sendo capazes de checar no final de cada fase, por exemplo, se as condições são favoráveis à mitose, se há dano ao DNA, ou se a replicação cromossômica está exata, permitindo, então, o início da fase subsequente.

A existência de falhas neste sistema permite que células geneticamente anormais dividam-se, acumulando danos genéticos ocasionando, em conseqüência, o início da progressão das neoplasias.

Um ponto essencial na regulação do ciclo celular é dado pelas proteínas CDK (ciclins dependentes of kinases), cuja regulação por fosforilação é feita pelas ciclinas. Estas são proteínas que ocorrem ciclicamente sendo ativadas e degradadas durante o ciclo celular. As ciclinas podem ser classificadas em pelo menos dois tipos: as mitóticas, que em conjunto com as CDKs formam o fator promotor de maturação (MPF), e as ciclinas G1, necessárias para a entrada da célula na fase S (Alberts et al.², 1994; Hall & Coates¹⁴, 1995)

O início ou start do ciclo celular é controlado por hormônios, fatores nutricionais e de crescimento, sendo que estes últimos estimulam a proliferação celular, através da ligação com receptores específicos, os quais, quando ativados, emitem um sinal de transdução do citoplasma ao núcleo celular (Rabernhost et al.²⁸, 1994).

Algumas técnicas consagradas utilizadas para medida acurada da cinética celular tais como: timidina tritiada, citometria de fluxo e incorporação da bromodeoxiuridina, além de difíceis e dispendiosas, consomem muito tempo e muitas vezes necessitam de equipamentos sofisticados, limitan-

do seu uso rotineiro pelos patologistas (Brown & Gatter⁴, 1990). A utilização de anticorpos dirigidos contra antígenos específicos, expressos nas células proliferantes das neoplasias, permite a análise simultânea da proliferação celular e de sua histologia (Hall & Levinson¹⁵, 1990; Tsuji et al.³², 1992; Ogawa et al.²⁵, 1993).

A atividade proliferativa de qualquer tecido, ou neoplasia, pode ser determinada pela taxa de crescimento isto é, o número de células ciclizantes e o tempo que estas levam para completar este ciclo (Brown & Gatter⁴, 1990).

A descoberta de inúmeras proteínas que desempenham papel fundamental na fase replicativa do DNA permite, através de sua detecção e contagem, tanto a identificação objetiva das células ciclizantes como uma estimativa da taxa de crescimento do tecido ou neoplasia.

PCNA- ANTÍGENO NUCLEAR DE CÉLULAS PROLIFERATIVAS

Inúmeros trabalhos relatam a aplicação de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), por ser este marcador, um indicador útil do comportamento biológico de alguns tumores.

Myiachi et al.²³(1978) descreveram, a partir do soro de pacientes com lupus eritematoso sistêmico, um antígeno nuclear presente em células proliferantes que inicialmente foi considerado como uma ciclina, em virtude de seu aparecimento cíclico. Posteriormente, Bravo et al.³ relataram que se tratava de uma proteína nuclear ácida de 36kDa, que funcionava como proteína auxiliar da DNA polimerase delta, associada tanto a replicação do DNA como ao reparo do mesmo (McCormick & Hall²¹, 1992; Queiroz²⁶, 1997).

Os anticorpos monoclonais anti-PCNA/ciclina reagem como epítomos antigênicos resistentes à fixação em Carnoy e formalina, o que facilita grandemente o seu uso em materiais colhidos rotineiramente ou mesmo de arquivo (Garcia et al.¹⁰, 1989; Rabenhorst et al.²⁸, 1994).

A avaliação do índice de proliferação celular usando-se PCNA é comparável ao obtido pelos métodos tradicionais e por vezes até mesmo supe-

rior a métodos como citometria de fluxo.

A ausência de PCNA nas reações de duplicação de DNA resulta no acúmulo de fitas sequenciais nascentes e até mesmo na quiescência das células.

O gene que codifica o PCNA tem sido clonado em diversas espécies e, embora ocorram pequenas diferenças ao nível de DNA, existe considerável semelhança entre o PCNA humano e de outras espécies (McCormick & Hall²¹, 1992).

Comercialmente existem vários anticorpos que reconhecem o PCNA como o 19A2, 19F4 e PC10. Existem diferenças nos resultados obtidos com diferentes anticorpos anti-PCNA, pois fatores técnicos como processamento, tempo de fixação e tipo de fixador podem influenciar a expressão do PCNA, que é dramaticamente reduzida após um período de 48 horas de fixação (Hall et al.¹⁵, 1990; McCormick & Hall²¹, 1992). Considerando o fato de que estes anticorpos reagem com epítomos antigênicos resistentes à fixação em formol, o seu uso em material de arquivo e de rotina é aplicável (Rabenhorst et al.²⁸, 1994).

A concentração do PCNA é variável durante as etapas do ciclo celular, sendo maior na fase G1 tardia, com pico na fase G1/S, estando praticamente ausente nas fases G2 e M (Hall et al.¹⁶, 1990; Kurki et al.¹⁸, 1986; Tsuji et al.³³, 1992). De acordo com McCormick & Hall²¹ (1992), o PCNA pode não ser específico da fase S ou, necessariamente, estar relacionado com o ciclo celular, podendo estar associado ao reparo do DNA ou ser expresso por influência de fatores de crescimento em células que não estejam no ciclo celular.

Ainda, a expressão do PCNA pode estar desregulada próximo a tumores, em decorrência de fatores de crescimento autócrinos, que regulam a estabilidade e a expressão do RNAm da proteína (Hall et al.¹⁴, 1990; Queiroz²⁶, 1997).

Na opinião de Mighell²²(1995), o PCNA não pode ser considerado um bom marcador de proliferação celular, visto que os níveis de PCNA podem manter-se elevados quando induzidos por fatores de crescimento, como resultado de danos ao DNA. Além deste, outros fatores podem influenciar, como o tipo de fixador, tempo de fixação, estado do espécime, e o inconveniente de o PCNA ter uma meia

vida bastante longa, aproximadamente 20 horas, indicando que o núcleo celular pode permanecer PCNA positivo mesmo após o estímulo. Segundo o autor, várias considerações devem ser feitas quando do estudo com PCNA, entre eles o padrão de marcação, escolha correta do caso, número de áreas quantificadas e a análise estatística.

Tsuji et al.³² (1992) avaliaram uma série de lesões epiteliais malignas e pré-malignas, originadas na cavidade oral e pele, através da expressão do PCNA e verificaram que na mucosa normal a expressão do PCNA estava restrita à camada basal do epitélio, ao passo que, nas lesões pré-malignas as células proliferantes apresentavam localização dispersa e numerosa ao longo de todas as camadas epiteliais, sugerindo uma desorganização na proliferação celular.

El Mutardi et al.⁸ (1996) estudaram 41 queratocistos odontogênicos, dos quais 21 associados à síndrome do carcinoma nevíde de células basais, e os resultados demonstraram que tanto os queratocistos ligados quanto os não associados à síndrome apresentavam células PCNA positivas no revestimento epitelial, mas os primeiros exibiram uma quantidade maior de células marcadas, o que poderia sugerir uma maior capacidade proliferativa e, conseqüentemente, maior agressividade.

Tsuji et al.³³ (1995) relatam a correlação entre os índices de PCNA e p53 como indicadores do potencial maligno de neoplasias na mucosa oral, sendo a ocorrência da expressão dos mesmos um fator importante num prognóstico desfavorável.

Cox & Walker⁷ (1996) também encontraram indicações de que a elevação nos índices do PCNA, Ki-67 e p53 em pacientes portadores de fibrose submucosa bucal (FSO) estavam relacionados à alta incidência de carcinoma espinocelular (SCC) nestes.

Os resultados obtidos indicaram uma porcentagem significativamente aumentada de PCNA no SCC, sendo que as alterações estavam visíveis em todas as camadas epiteliais.

Tipoe et al.³¹ (1996) concluíram que altos índices de PCNA estão relacionados a menor sobrevivência em pacientes portadores de astrocitomas, linfomas não-Hodgkin e displasias brônquicas. A associação entre um alto índice de PCNA e au-

mento da angiogênese foi também relatada neste estudo, podendo auxiliar no diagnóstico e prognóstico de neoplasias que podem malignizar (Lorz et al.²⁰, 1994).

Estudo sobre a indução da carcinogênese em glândulas submandibulares, em animais experimentais, utilizando PCNA como marcador nuclear, realizado por Sumitomo et al.³⁰ (1996), concluíram que o aumento na proliferação celular estava limitada às células basais dos segmentos ductais, indicando que estas células podem ser as precursoras na carcinogênese oral.

Em contraste com estes achados, Nylander et al.²⁴ (1995) relatam não ter encontrado correlação entre os índices de PCNA e a superexpressão da proteína p53, indicando que mais estudos são necessários para elucidar estes resultados conflitantes.

Ki-67

O anticorpo Ki-67 reconhece um antígeno que está associado ao núcleo celular e que, em células continuamente ciclizantes, é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (Gerdes et al.¹², 1984). Trata-se de uma IgG1 de camundongo produzida contra uma fração nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin (Brown & Gatter⁴, 1990).

Sasaki et al.²⁹ (1987) relataram que a expressão antigênica aumenta com a progressão do ciclo celular, alcançando um pico nas fases G2 e M. Guillaud et al.¹³ (1989) também obtiveram o mesmo resultado tanto em linhagem de células normais como neoplásicas.

O Ki-67 apresenta uma vida média de menos de uma hora (Bruno & Darzynkiewicz⁵, 1992) e sua natureza e peso molecular são ainda controversos.

Vários fatores de ordem prática podem limitar a efetividade do Ki-67 como indicador de prognóstico, particularmente em pequenas biópsias, tais como:

- a) a expressão do Ki-67 parece ser influenciada pelo suprimento nutricional, portanto uma amostra retirada próxima à área central da neoplasia poderia fornecer um valor, para o fator de crescimento, inferior incorreto.

b) a maior parte das neoplasias apresenta linhagens de células heterogêneas e com diferentes taxas de proliferação. Nesta circunstância, o índice do Ki-67 não refletiria a taxa predominante de proliferação da neoplasia.

Além disso, como já mencionado, a taxa de proliferação compreende dois parâmetros: a fração de crescimento e o tempo necessário para que a célula complete seu ciclo celular. Se considerarmos uma neoplasia na qual praticamente todas as células estejam em ciclo, e na qual o tempo gasto para completá-lo seja muito longo, esta apresentaria uma positividade para o Ki-67 muita extensa, ainda que a taxa proliferativa não fosse muito alta. Portanto devemos ter em mente que a expressão do Ki-67 nos fornece, somente, a informação de estar ou não, a célula ciclizante, mas nada sobre a duração de seu ciclo celular.

A necessidade de tecidos frescos ou de congelamento rápido para o emprego do Ki-67 monoclonal, de acordo com Gerdes et al.¹¹ (1992), limita seu uso na rotina laboratorial, já que o epítipo reconhecido por ele é destruído pela fixação, impossibilitando, assim, a sua utilização em material parafinizado (Brown & Gatter⁴, 1990).

Brown & Gatter⁴ (1990) revisando inúmeras pesquisas realizadas com este marcador relatam que existe forte correlação entre o nível de expressão do Ki-67 e a sobrevida, indicando que quanto maior o seu nível menor a sobrevida do paciente nas neoplasias linfoproliferativas, de sistema nervoso central, de tecido conjuntivo e mama.

Poucos estudos relatam a possibilidade de uso do Ki-67 com a finalidade de acessar o potencial terapêutico benéfico da utilização de drogas anti-proliferativas.

Waelti & Markwalder³⁴ (1989) utilizando o Ki-67 como marcador, verificaram que o acetato de medroxiprogesterona reduzia a proliferação celular em cultura de células do meningioma primário.

Gallee et al.⁹ (1987) estudaram linhagens celulares de neoplasias da próstata e concluíram que o Ki-67 pode ser útil na avaliação da terapia hormonal em pacientes portadores desta neoplasia.

DISCUSSÃO

Algumas colocações devem ser feitas com relação ao estudo da fração proliferativa das neoplasias através do emprego do PCNA e Ki-67. Ambos avaliam o número de células presentes no ciclo celular, mas não fornecem informações sobre o tempo em que cada célula completa o seu ciclo celular, sendo assim, é perfeitamente possível que um grande número de células positivas em uma dada neoplasia não indique uma alta atividade proliferativa, e sim um maior tempo de permanência no ciclo.

Como os marcadores refletem apenas momentos da vida da célula é possível que determinada neoplasia apresente uma alta taxa de proliferação e um baixo percentual de células positivas (Brown & Gatter⁴, 1990).

Portanto, sem conhecer o exato momento do ciclo celular não é possível determinar se o elevado número de células PCNA positivas em uma neoplasia é fruto do alto *turnover* ou se indica uma grande proporção de células dividindo-se em prolongado ciclo celular.

A longa meia vida do PCNA, aproximadamente 20 horas, poderia justificar que células fora do ciclo celular permaneçam positivas durante um certo período de tempo. Níveis nucleares elevados do PCNA podem, também, refletir o processo de reparo do DNA.

A variação na intensidade de coloração das células PCNA positivas pode, também, ser atribuída a longa meia-vida. Devido a impossibilidade de se saber se uma célula com coloração menos intensa está ciclando ou não, vários autores sugerem que a contagem considere as células marcadas, independentemente da intensidade da coloração (Aguiar¹, 1996).

O uso do Ki-67 era muito limitado devido a necessidade de tecidos frescos, mas, recentemente novos anticorpos que reconhecem esse antígeno em espécimes fixados em formol e processados rotineiramente possibilitou o seu emprego em grande número de estudos (Gerdes et al¹¹, 1992).

Alguns trabalhos têm mostrado a superioridade do Ki-67 como marcador de proliferação celular, por não sofrer tantas influências de fatores internos e externos como o PCNA.

Além disso, sua expressão nuclear num período definido do ciclo celular, em contraste com o PCNA, pode representar uma vantagem em relação ao seu emprego como marcador biológico.

Aguiar¹ (1996) e Costa⁶ (1997) observaram a marcação de células no ciclo celular pelo Ki-67 no epitélio adjacente ao carcinoma epidermóide de boca e no epitélio do carcinoma epidermóide de boca respectivamente, provavelmente pelos níveis elevados deste no final da fase G2 e M.

Os níveis expressos de PCNA e do Ki-67 associados a outros indicadores, tais como, a angiogênese, a p53, a análise histopatológica e os aspectos clínicos, fornecem informações sobre a provável progressão, levando a um diagnóstico mais seguro

da neoplasia, orientando a adoção de uma terapia mais direcionada e possibilitando um prognóstico favorável com relação à sobrevida do paciente portador de neoplasia.

CONCLUSÃO

A utilização dos marcadores biológicos PCNA e Ki-67 no auxílio de diagnóstico e prognóstico de neoplasias malignas constitui um método simples, rápido e eficaz, devendo ser utilizado em conjunto com outros indicadores com a finalidade de se obter a maior precisão possível. Além disto, podem constituir-se em um instrumento útil de assessoramento nas terapias utilizadas em neoplasias malignas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AGUIAR, M.C.F. *Estudo comparativo das proteínas p53, PCNA, Ki-67 e das regiões organizadoras nucleares (NORs) no epitélio de revestimento da mucosa próximo ao carcinoma epidermóide de boca*. São Paulo, 1996. 110p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 2 ALBERTS, B. et al. *Molecular biology of the cell*. 3 ed. New York: Garland, 1994. 1294p.
- 3 BRAVO, R. et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary proteín of polymerase- δ *Nature*, v. 326, n. 6112, p. 515-7, 1987
- 4 BROWN, D. C., GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, v. 17, p. 489-03, 1990
- 5 BRUNO, S., DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cell. *Cell Prolif*, v. 25, n. 1, p. 31-40, 1992.
- 6 COSTA, A. L. L. *Dupla marcação PCNA/AgNOR e Ki-67/AgNOR em carcinoma epidermóide de boca*. São Paulo, 1997. 84p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal)- Faculdade de Odontologia -Universidade de São Paulo.
- 7 COX, S. C., WALKER, D. M. Epithelial growth fraction and expression of p53 tumor suppressor gene in oral submucous fibrosis. *Aust. Dent. J.*, v. 41, n. 2, p. 91-6, 1996.
- 8 EL MUTARDI, A. et al. Proliferating cell nuclear antigen staining in syndrome and nonsyndrome odontogenic keratocysts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v. 81, n. 2, p. 217-20, 1996.
- 9 GALLE, M.P.W. et al. Determination of the proliferative fraction of a transplantable, hormone - dependent, human prostatic carcinoma (PC-82) by monoclonal antibody Ki-67: potential application for hormone therapy monitoring. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 79, p. 1333-40, 1987.
- 10 GARCIA, R.L., COLTRERA, M.D., GOWL, A.M. Analysis of proliferative grade using PCNA / cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues- comparison with flow - cytometric analysis. *Am. J. Pathol.*, v. 134, p. 733-9, 1989.
- 11 GERDES, J., BECKER, M. H. G., KEY, G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin fixed and routinely tissues. *J Pathol.*, v. 168, n. 1, p. 85-7, 1992.
- 12 GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.*, v. 133, p. 1710-5, 1984.
- 13 GUILLAUD, P. et al. Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labeling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mammary tumor cell lines (MCF-7). *Anal. Cell. Pathol.*, v. 1, p. 25-39, 1989.
- 14 HALL, P.A., COATES, P.J. Assessment of cell proliferation in pathology-what next? *Histopathology*, v. 26, n. .2, p. 105-12, 1995.
- 15 HALL, P. A., LEVINSON, D. A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J. Clin. Pathol.*, v. 43, n. 2, p. 184-2, 1990.
- 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.*, v. 162, p.285-94, 1990
- 17 HARTWELL, L.H., WEINERT, T. A., Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, v. 246, p. 629-33, 1989.
- 18 KURKI, P. et al. Expression of proliferating cell nuclear (PCNA)/cyclin during cell cycle. *Exp. Cell. Res.*, v. 166, n. 10, p. 209-19, 1986.
- 19 LEVINE, A.J. et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. *Br. J. Cancer*, v. 29, n. 3, p. 409-6, 1994.
- 20 LORZ, M., MEYER- BREITING, E., BETTINGER, R. Proliferating cell nuclear antigen counts as markers of cell proliferation in head and neck cancer. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, v. 251, p. 91-4, 1994.
- 21 McMORMICK, D., HALL, P.A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, v. 21, n. 6, p. 591-4, 1992.

- 22 MIGHEL, A. PCNA and p53. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.*, v. 31, n. 6, p. 403-04, 1995.
- 23 MIYACHI, K., FRITZLER, M. J., TAN, E.M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.*, v. 121, n. 6, p. 2228-34, 1978.
- 24 NYLANDER, K. et al. p53 Expression and Cell Proliferation in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Cancer*, v. 75, n. 1, p. 87-93, 1995.
- 25 OGAWA, I. et al. Proliferating activity of salivary gland pleomorphic adenomas and myoepitheliomas as evaluated by the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling index (LI). *J. Oral Pathol. Med.*, v. 22, p. 447-50, 1993.
- 26 QUEIROZ, L.M.G. *Expressão do PCNA, Ki-67, c-erbB-2 e p53 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimórfico de baixo grau de malignidade de glândula salivar menor*. São Paulo, 1997. 78p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal)-Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 27 RABENHORST, S.H., BURRINI, R.C., SCHIMITT, F.C.L. Marcadores de proliferação celular. *Rev. Bras. Pathol. Clin.*, v. 29, n. 1, p. 24-8, 1993.
28. RABENHORST, S. H., BURINI, R. C., SCHIMITT, F. C. L. Ciclo celular mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. *Rev. Bras. Cancerologia*, v. 40, n. 3, p. 141-47, 1994.
- 29 SASAKI, K. et al. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J. Cell. Physiol.*, v. 33, p. 579-84, 1987.
- 30 SUMITOMO, S., HASHIMURA, K., MORI, M. Growth pattern of experimental squamous cell carcinoma in rat submandibular glands – an immunohistochemical evaluation. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, v. 32B, n. 2, p. 97-05, 1996.
- 31 TIPOE, G. L., JIN, Y., WHITE, F. H. The relationship between vascularity and cell proliferation in human normal and pathological lesions of the oral cheek epithelium. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, v. 32B, n. 1, p. 24-31, 1996.
- 32 TSUJI, T. et al. Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and the skin: an immunohistochemical study. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, v. 420, n. 5, p. 377-83, 1992.
- 33 TSUJI, T. et al. The significance of PCNA and p53 protein in some oral tumors. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 24, p. 221-5, 1995.
34. WAELTI, E. R., MARKWALDER, T. M., Endocrine manipulation of meningiomas with medroxyprogesterone acetate. Effect of MPA on growth of primary meningioma cells in monolayer tissue culture. *Surg. Neurol.*, v. 31, p. 96-100, 1989.
35. WARNAKULASURIYA, K. A. A. S., JOHNSON, N. W. Association of overexpression of p53 oncoprotein with the state of cell proliferation in oral carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 23, p. 246- 50, 1994.