

## ERRATA

- 2ª pág. do resumo, 8ª linha  
1,07% ao invés de 1.70%

- pág. 4, 19ª linha  
(MELLO, 1987) ao invés de (VIDAL & MELLO, 1987)

- pág. 8, última linha  
nucleolares, ao invés de nuleolares

- pág. 16, 17ª linha  
álcool 70% o invés de etanol absoluto

- acrescentar na pág. 17, 5ª linha  
...guardadas em geladeira (GROTTO, 1990). Na hora ...

- Pág. 21, 22ª linha  
1,07% ao invés de 1,70%

- Pág. 33, 19ª linha  
sd = 0,46 ao invés de sd = 0,45

- Pág. 34, item 3  
(1,07%) ao invés de (1.70%).

- acrescentar nas referências bibliográficas, pág. 43.

SCHWARZACHER, H.G.; MIKESAAR, A.V.; SCHNEDL, W. The nature of the  
Ag-staining of nucleolus organizer regions. Cytogenet Cell  
Genet. 20: 24-39, 1978

MARIA INÊS DE SOUZA

REGIÕES ORGANIZADORAS DO NUCLEÓLO (NORs)  
EM CÉLULAS MESOTELIAIS E CARCINOMATOSAS DE  
LÍQUIDOS CAVITÁRIOS: AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO  
DIFERENCIAL DE EXAMES CITOLÓGICOS

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE  
EM ANATOMIA PATOLÓGICA

CAMPINAS

1993

So89r

20579/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

MARIA INÊS DE SOUZA

REGIÕES ORGANIZADORAS DO NUCLÉOLO (NORs) EM CÉLULAS  
MESOTELIAIS E CARCINOMATOSAS DE LÍQUIDOS CAVITÁRIOS:  
AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE EXAMES CITOLÓGICOS *Da*

TESE DE Mestrado APRESENTADA À FACULDADE  
DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO  
TÍTULO DE MESTRE EM ANATOMIA PATOLÓGICA

ORIENTADORA:

PROFA. DRA. MIRIAM APARECIDA DA SILVA, TREVISAN

CAMPINAS

1993

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	20891
V.	Ex.
1.º ABO DO/	20579
PREÇO.	286,194
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	CR\$ 800,00
DATA	19/04/94
N.º CPD	

CM-00052577-2

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

Souza, Maria Ines de  
So89r Regioes organizadoras do nucleolo (NORs) em celulas mesoteli-  
ais e carcinomatosas de liquidos cavitarios : auxilio no diagnos-  
ticos diferencial de exames citologicos / Maria Ines de Souza. --  
Campinas, SP : [s.n.], 1993.

Orientador : Miriam Aparecida da Silva Trevisan.  
Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciencias Medicas.

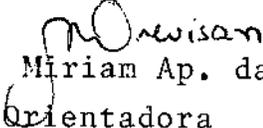
1. Regiao Organizadora do Nucleolo. 2. Diagnostico diferencial.  
3. Tecnicas citologicas. I. Trevisan, Miriam Aparecida da Silva.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciencias  
Medicas. III. Titulo. 20. CDD -616.994 075 82  
-616.075 -611.01

Indices para Catalogo Sistemático:

1. Regiao Organizadora do Nucleolo 616.994 075 82
2. Diagnostico diferencial 616. 075
3. Tecnicas citologicas 611.01

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Anatomia Patológica da aluna Maria Inês de Souza.

Campinas, 25 de Novembro de 1993

  
Profa. Dra. Miriam Ap. da S. Trevisan  
Orientadora

À MINHA IRMÃ

ANA LUIZA

## AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Miriam Aparecida da Silva Trevisan, pela orientação, apoio e estímulo. A minha gratidão por ter demonstrado confiança desde o início do nosso trabalho.

Ao Professor Doutor Luis Alberto Magna pela acessoria estatística.

À Maria Aparecida Francisco I, secretária do Departamento de Anatomia Patológica, pela valiosa colaboração na utilização do microcomputador.

As amigas Mônica e Cristiane, cujo apoio e auxílio muito contribuíram para a realização desse trabalho.

À Doutora Paula Virgínia Bottini pela preciosa colaboração e apoio.

## SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

1 - Introdução.....	01
2 - Objetivo.....	14
3 - Casuística e Métodos.....	16
4 - Resultados.....	21
5 - Discussão.....	33
6 - Conclusões.....	36
7 - Referências Bibliográficas.....	37

Abstrat.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Células mesoteliais normais.....	26
Figura 2 - Células mesoteliais reacionais.....	27
Figura 3 - Células mesoteliais reacionais.....	28
Figura 4 - Células carcinomatosas metastáticas.....	29
Figura 5 - Células carcinomatosas metastáticas.....	30
Figura 6 - Média dos pontos Ag-NOR nos grupos negativo e positivo.....	31
Figura 7 - Gráfico da distribuição dos pontos Ag-NOR nos grupos negativo e positivo.....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupo de pacientes com efusões pleurais/peritoneais e lavados peritoneais negativos para neoplasias.....	18
Tabela 2 - Grupo de pacientes com efusões pleurais/peritoneais e lavados peritoneais positivos para neoplasias.....	20
Tabela 3 - Média Ag-NOR por núcleo em células mesoteliais normais e reacionais.....	23
Tabela 4 - Média Ag-NOR por núcleo em células carcinomatosas metastáticas.....	25

## RESUMO

A técnica AgNOR pode prestar auxílio nos casos considerados duvidosos na diferenciação entre célula mesotelial reacional e célula carcinomatosa. A discriminação dos NORs, evidenciados pela reação com prata, torna possível a identificação da célula neoplásica.

Estudamos líquidos de derrames em cavidades serosas e lavados peritoniais dos quais 49 casos eram negativos e 25 casos eram positivos para células epiteliais neoplásicas.

A contagem dos NORs foi realizada com objetiva de imersão (100X). Em cada núcleo foram contados o nº de pontos independentes da forma e tamanho. A média dos pontos para o grupo negativo para neoplasia foi de 1,71 com desvio padrão de 0,46 e a média dos pontos para o grupo positivo para neoplasia foi de 3,98 com desvio padrão de 1,38. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p < 0,05$ ).

Foi observado que células mesoteliais normais tem usualmente um ou dois pontos pequenos e redondos por núcleo. Nas células mesoteliais reacionais, a morfologia

dos pontos não é uniforme e algumas vezes eles podem ser numerosos, mas a média dos pontos na amostra foi também baixa. As células epiteliais neoplásicas mostram os pontos de forma e tamanho muito variados com média geralmente elevada.

Foi verificado que a contagem de NORs igual a 2,66 marca a intersecção entre os dois grupos estudados tendo uma chance de 1,70% de darmos um diagnóstico falso positivo e 17,02% de darmos um diagnóstico falso negativo.

Os resultados desse trabalho permitiram concluir com o auxílio da técnica AgNOR, que temos cerca de 80% de chance de interpretarmos corretamente os líquidos de cavidades serosas duvidosos quando corados pela hematoxilina-eosina.

# 1 - INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

O nucléolo é uma estrutura celular identificada há mais de 200 anos. Atualmente o seu estudo tem mostrado aspectos muito interessantes do ponto de vista morfológico e funcional.

GHOSH (1976) e GOESSENS (1984) fizeram uma excelente revisão bibliográfica sobre o nucléolo que merece ser mencionado antes da discussão sobre a utilidade de sua interpretação na prática diagnóstica em anatomia patológica. As seguintes informações foram retiradas dessas revisões:

O primeiro autor a descrever a estrutura conhecida hoje como nucléolo foi FONTANA em 1781, embora a sua denominação tenha sido dada por VALENTIN em 1839. Durante muito tempo cientistas estudaram principalmente o número e o volume do nucléolo em diferentes plantas e espécie animais e poucos trabalhos foram feitos considerando a sua estrutura e composição.

Em 1898 MONTGOMERY fez uma ampla revisão dos estudos de Fontana e concluiu que o nucléolo era uma estrutura homogênea que poderia ser corada por corantes ácidos e básicos. No começo deste século, diversos pesquisadores continuaram com o estudo da composição

nucleolar.

RUZICKA (1899) e SIMARO (1900) mencionaram a impregnação de prata no nucléolo e CAJAL (1903) escreveu sobre a presença de grânulos argentófilos no nucléolo. JORGENSEN (1913) usou uma técnica de digestão por pepsina acidificada para identificação do nucléolo. Para ele o nucléolo poderia ser basófilo ou acifófilo dependendo do crescimento celular e da produção de proteínas. HETZ (1931) estudou o nucléolo através do ciclo mitótico e o associou com a região de constrição secundária dos cromossomas. MACLENTOK (1934) demonstrou que o nucléolo é organizado em regiões específicas do cromossoma 6 do milho. GOTES (1942) e seus associados estudaram extensivamente a constrição secundária dos cromossomas e o nucléolo de um grande número de espécies de plantas. Eles estabeleceram que o número máximo de nucléolo nas espécies era constante e que havia uma relação entre o número de nucléolos e o número de constrições secundárias presente nos cromossomas.

BRACHET (1942, 1947), CAPERSON e SANTESSON (1942) deram contribuição importante para a interpretação do metabolismo do nucléolo. Brachet usando o corante verde metil-pironina demonstrou que o nucléolo era rico em RNA e Caspersson desenvolveu um método citofotométrico para análise do ácido nucleico na célula. Juntos demonstraram a presença do ácido ribonucleico no nucléolo.

A investigação da ultra estrutura nucleolar começou no início 1950. GODWARD (1950) relatou pela primeira vez a presença de estruturas filamentosas dentro do nucléolo. ESTABLE e SOTELO (1951) descreveram a presença de componentes estruturais, filamentos, nucleolonema e parte amorfa dentro do nucléolo. O nucleolonema foi considerado como sendo composto por ribonucleoproteínas (RNPs).

À microscopia eletrônica pode-se observar que o nucléolo consiste de no mínimo cinco componentes estruturais: o centro fibrilar, o componente fibrilar denso, o componente granular, o interstício nucleolar e a cromatina associada condensada. RECHER et al. (1969) propuseram o termo centro fibrilar para designar o material fibrilar livre associado com o componente fibrilar denso e devido a sua localização central dentro deste. Fazem parte da composição do centro fibrilar: DNA, RNA, proteínas, em especial proteínas argirófilas, enzimas, metais e cátions inorgânicos. O componente fibrilar denso é composto por fibrilas de aproximadamente 4 nm de diâmetro. Essas são associadas com o centro fibrilar sugerindo uma relação funcional entre os dois componentes. Segundo FAKAN (1978) o componente fibrilar é o local da síntese do RNA pré-ribossômico.

O componente granular é formado por partículas de aproximadamente 15 nm de diâmetro e situadas ao redor do

componente fibrilar. Os grânulos são compostos por RNP (MARINOZZI, 1964). Estudos bioquímicos dos componentes granular e fibrilar nucleolar isolados indicaram que o componente fibrilar é precursor do componente granular (DASKAL et al., 1974) e que os grânulos nucleolares são liberados como partículas pre-ribossomais e transportados para o citoplasma.

O interstício nucleolar consiste de áreas esféricas de pouca densidade circundando a massa nucleolar. A morfologia, tamanho e o número dos interstícios nucleolares são variáveis dependendo do tipo do nucléolo. A cromatina nucleolar associada separa o corpo nucleolar mantendo uma ligação com os centros fibrilares.

Sabe-se atualmente que o nucléolo está implicado na biogênese de ribossomas não só com respeito à síntese dos rRNA pesados, mas também quanto aos seu metabolismo de pós-transcrição e sua reunião seja com RNAs leves, seja com proteínas (VIDAL & MELLO, 1987).

Os NORs correspondem a regiões de constricção secundária dos braços curtos dos cromossomas acrocêntricos de números 13, 14, 15, 21 e 22 (BEIGUELMAN, 1982). O nucléolo pode ser considerado um produto da atividade de um ou mais cromossoma contendo segmentos condensados ou descondensados de DNA ribossômico (rDNA) dependendo da demanda celular de RNA ribossomal (MIRRE e STAHL, 1981).

A descoberta de provas diretas da existência dos genes codificadores para rRNA 18S e 28S nos NORs trouxe um avanço para o conhecimento da fisiologia nucleolar. O organizador nucleolar contém um motivo genético repetitivo, do qual uma parte é a unidade de transcrição e o restante constitui um segmento geralmente não transcrito, que se alterna com os segmentos com capacidade de transcrição. A unidade de transcrição dá origem ao transcrito primário, ou seja, RNA pré-ribossomal 45S que contém os três genes nucleolares 18S, 5,8S e 28S. Ocorrem clivagens de cada molécula de RNA 45S segundo diversas etapas que envolvem perdas de porções não metiladas dando uma molécula de 32S e uma de 18S. A molécula de RNA 18S transfere-se rapidamente do nucléolo para a sub-unidade ribossômica menor, no citoplasma. A molécula 32S é clivada, formando a molécula RNA 28S que permanece com o RNA 5,8S. Essas passam curto espaço de tempo no nucléolo antes de se transferir para a sub unidade ribossômica maior, no citoplasma (ALBERTS, 1989; VIDAL & MELLO, 1987).

A associação de RNA com proteínas começa já antes do precursor 45S ter sido totalmente transcrito. As moléculas de RNA 45S associadas com proteínas constituem as fibrilas de RNP do nucléolo que se sedimentam em 80S (GHOSH, 1976).

Os NORs são também locais onde um grupo peculiar

de proteínas ácidas estão localizadas e que se coram intensamente pela prata (HOWELL & BLACK, 1980) sendo identificadas na literatura como "Ag-NORs".

A caracterização bioquímica dessas proteínas não está ainda bem esclarecida, mas há consideráveis evidências indicando que a nucleolina, também chamada proteína C23 ou 100 KDA, é a principal proteína nucleolar corada pela prata (JORDAN, 1987).

JORDAN (1987), HOWELL (1982) relataram que a nucleolina estava envolvida na transcrição.

As proteínas AgNOR estão localizadas no centro fibrilar e em menor quantidade no componente fibrilar denso (HERNANDES VERDUM, 1980), e isto às vezes é relacionado ao grau de atividade nucleolar (SCHWARZACHER, 1978).

Há evidências que as proteínas AgNOR estão envolvidas na síntese do RNA pré-ribossômico ou participam no complexo de transcrição do rDNA (DIMDUA et al., 1982; FERNANDES GOMES et al., 1983; MEDINA et al., 1983).

De acordo com diversas pesquisas com inibição da síntese de RNA foi verificado que a reação com a prata continuava positiva nas estruturas fibrilares (HERNANDES VERDUM et al., 1980). Esses achados indicam que algumas proteínas AgNOR não estão ligadas diretamente à síntese de rRNA, mas deve ter ligação na estrutura dos genes

ribossomais (HERNANDES VERDUM et al. , 1984).

ERARD et al. (1988) demonstraram que a nucleolina tem uma importante função estrutural. Esses autores entendem que aquela proteína se liga à histona H1 e induz à descondensação da cromatina. Isto ocorre portanto antes da transcrição do rDNA.

O possível aumento na quantidade de nucleolina demonstrada pela prata através de grânulos mais volumosos ou mais numerosos nas células dos tecidos em proliferação que nas células em repouso, poderia ser uma evidência de proliferação celular aumentada (DERENZINI et al., 1988 )

A coloração pela prata é uma boa técnica para se estudar os componentes nucleolares durante a mitose.

PLOTON et al. (1987) estudaram diversas linhas de células cancerosas humanas e de rato e puderam observar que durante a prófase, os vários componentes nucleolares desagregam no início da mitose: os centros fibrilares e os componentes fibrilares densos ficam situados na periferia do nucléolo em contato com os cromossomas. Neste estágio os depósitos de prata estão exclusivamente localizados sobre os centros fibrilares e o componente fibrilar denso. No final da prófase as proteínas AgNOR apresentam-se com estruturas esféricas, uniformes e os dois componentes fibrilares não podem ser distinguidos. Na metáfase a quantidade de proteínas AgNOR é extremamente baixa. Os NORs sempre aparecem como estruturas alongadas ou

esféricas parcialmente integradas na constrição cromossomal. Nesta fase os NORs representam estruturas mínimas correspondendo ao rDNA inativado.

Durante a anáfase, as estruturas coradas pela prata ainda possuem forma esférica. Essas estruturas estão localizadas em depressões na periferia dos cromossomas, que muitas vezes são ocupadas por RNP. Em células de tumor de Erlich, grande número de pontos corados pela prata aparecem nos locais com RNP situados entre e ao redor dos cromossomas.

Na telófase dois tipos estruturais corados pela prata podem ser observados. O primeiro tipo consiste de pontos grandes e homogêneos situados na periferia dos cromossomas. O segundo tipo consiste de pequenos agrupamentos de pontos situados ao redor e entre os cromossomas. Em uma fase mais tardia da telófase, os pontos corados pela prata diminuem em quantidade e aumentam de tamanho. Pode-se distinguir o centro fibrilar e o componente fibrilar denso. As RNP desaparecem e o nucléolo adquire progressivamente sua estrutura vista em interfase, a qual varia de um tipo celular para outro.

BUSCH et al. (1979) e PLOTON et al. (1986) demonstraram que o número de estruturas coradas pela prata poderia ser usado para diferenciar a célula normal da cancerosa. As proteínas AgNOR poderiam ser marcadoras dos componentes nucleolares e ajudar na interpretação da

fisiologia das células cancerosas.

A aplicação da técnica AgNOR em líquidos cavitários com o intuito de auxiliar na distinção de casos de difícil diagnóstico diferencial entre neoplasia e alteração reacional tem interessado alguns autores (AYRES et al. , 1988; COLECCHIA et al. , 1991; COLECCHIA & LEOPARDI , 1992 ). é difícil a interpretação de células presentes em líquidos ascíticos de pacientes portadores de pancreatite crônica ou de , cirrose hepática, lavados peritoneais de pacientes com cirurgia e ou radioterapia prévias, líquidos pleurais de mulheres com carcinoma de mama operado, etc. Vários métodos podem ser aplicados para se fazer o diagnóstico diferencial entre célula mesotelial reacional e células carcinomatosas (CHIN-YANG LI et al. , 1988 ; HERRERA & WILKERSON , 1985 ; KWEE et al. , 1982 ; LINARI et al. , 1989; NANCE & SILVERMAN , 1991 )mas é preciso salientar que a microscopia eletrônica é de aplicação restrita e pouco prática; as técnicas imunoquímicas são caras sendo que e as mais eficazes utilizam anticorpos monoclonais e as técnicas histoquímicas tem baixa especificidade. Nenhuma destas técnicas tem 100% de sensibilidade.

A coloração dos NORs pela prata se coloca como método simples de custo médio, facilmente reprodutível em qualquer laboratório por não necessitar de equipamento sofisticado para sua interpretação. Existe escasso número

de trabalhos na literatura aplicando a técnica AgNOR em exames citológicos de líquidos cavitários e em biópsias de pleura, a maioria tentando distinguir a célula mesotelial reacional da neoplásica (mesotelioma).

DERENZINI et al. (1988) utilizaram a coloração pela prata e um método quantitativo morfo-densitométrico para investigar a distribuição dos NORs interfásicos em células epiteliais neoplásicas, mesoteliais neoplásicas, células mesoteliais reacionais e macrófagos de líquidos pleural e peritoneal. Seu estudo mostrou diferença entre os diversos grupos: as células mesoteliais reacionais tem pequenos e numerosos NORs, com agrupamentos regularmente distribuídos e de tamanho uniforme; as células mesoteliais neoplásicas e as células carcinomatosas têm os NORs numerosos, irregularmente distribuídos no núcleo e de tamanho heterogêneo. O exame morfo-densitométrico mostrou que adenocarcinoma metastático apresenta grande quantidade de pontos corados pela prata, diferente do observado em Mesotelioma.

AYRES et al. (1988) aplicaram a técnica AgNOR para biópsias de pleura normal, reacional e com mesotelioma. Acharam os seguintes valores estatisticamente diferentes entre si: nas células mesoteliais normais a média dos pontos foi de 1,04 ( $\pm 0,11$ ); nas reacionais a média foi de 1,75 ( $\pm 0,55$ ) e em pacientes com mesotelioma a média variou de 4,95 a 5,43, de acordo com o tipo histológico.

BARSOTTI et al. (1989) aplicaram a coloração AgNOR em 11 líquidos de cavidades pleural ou peritoneal, 5 com hiperplasia mesotelial reacional e 6 com adenocarcinoma metastático. A média de pontos AgNOR no grupo de casos positivos foi três vezes maior que a média obtida nas células mesoteliais reacionais, diferença essa estatisticamente significativa.

COLECCHIA et al. (1991) utilizaram a morfometria e a contagem AgNOR para diferenciar células mesoteliais reativas e malignas de líquidos pleurais. O número de pontos por células mesoteliais benígnas foi significativamente mais baixo do que em mesoteliomas. O diâmetro médio nuclear e a área média nuclear foram analisados e os resultados mais baixos se relacionaram ao mesotélio reativo que tem a média de NORs de 1,56 ( $\pm 0,77$ ) e os mais altos aos mesoteliomas que tem a média de NORs de 2,81 ( $\pm 1,44$ ).

MEGAN LIM et al. (1992) fizeram uma análise morfométrica nos NORs de líquidos peritoniais negativos e positivos para células neoplásicas incluídos em parafina (cell-block ou citoinclusão) usando microscópio eletrônico de varredura. A morfologia dos AgNORs em células malignas mostra uma distribuição irregular e uma grande variabilidade de tamanho. Quanto ao número de NORs, os autores obtiveram: 1,59 ( $\pm 0,35$ ) para células mesoteliais normais e 3,22 ( $\pm 0,75$ ) para células carcinomatosas.

Dentre os poucos trabalhos existentes sobre o assunto, observa-se uma preocupação comum a quase todos os autores em conseguir distinguir, através da técnica AgNOR, a célula mesotelial reacional da célula mesotelial neoplásica . Em nosso meio o mesotelioma é um tumor pouco frequente e não costuma entrar no diagnóstico diferencial das efusões. Em nossos casos que apresentam células atípicas de difícil interpretação , sempre precisamos considerar em primeiro lugar a possibilidade delas serem provenientes de uma infiltração carcinomatosa da membrana serosa (metástase).

## 2. OBJETIVO

## OBJETIVO

Padronizar a apresentação dos grânulos AgNOR , através do seu número e da sua morfologia, em células mesoteliais absolutamente normais, em células mesoteliais reacionais e em células epiteliais malignas encontradas em líquidos coletados espontaneamente na pleura e no peritônio e em lavados peritoniais.

### 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados 74 líquidos coletados espontaneamente em cavidade pleural ou peritoneal, e líquidos provenientes de lavados peritoniais. O material foi enviado ao laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas Unicamp com ou sem fixador (álcool). O sedimento foi obtido da forma mais conveniente ( em citocentrífuga, em centrífuga comum ou em câmara de sedimentação). As lâminas com o sedimento foram colocadas por cinco minutos em solução 3:1 de etanol absoluto mais ácido acético e corados por Hematoxilina-Eosina. Assim foi possível a identificação de 49 casos indubitavelmente negativos (tabela 1) e 25 casos francamente positivos para células neoplásicas (tabela 2). Os agrupamentos celulares importantes para o estudo foram circundados com diamante no verso da lâmina ;Posteriormente os sedimentos foram descoradas com álcool acidulado (1ml ácido clorídrico concentrado em 100ml de etanol absoluto) e corados pela "técnica AgNOR" descrita por HOWEL e BLACK (1980) e modificada por PLOTON (1986).

### Técnica Ag-NOR :

- Solução de nitrato de prata a 50% em água destilada. Deve ser preparada na hora do uso.

- Solução de gelatina e ácido fórmico: a gelatina foi dissolvida a 2% de água destilada aquecida. Após o resfriamento da solução, foi acrescentado ácido fórmico a 1%. A solução final foi dividida em alíquotas de 3 ml e guardadas em geladeira. Na hora do uso foi novamente dissolvida em estufa 80°C.

A solução de nitrato de prata 50% e a solução de gelatina com ácido fórmico foram misturadas na proporção de 2 para 1 respectivamente. A solução é colocada diretamente sobre a lâmina, que é recoberta com lamínula. A reação se processa no escuro, e à temperatura ambiente, durante 30 minutos. A seguir a lâmina é generosamente lavada com água destilada e submetida ao procedimento habitual para montagem com resina sintética e lamínula.

A contagem AgNOR foi realizada utilizando objetiva de imersão(100X) . Em cada núcleo foram contados o número total de pontos independentemente da sua forma e tamanho . Quando os pontos apareciam como "clusters" , ou seja , vários pontinhos agregados e era impossível a sua individualização, foram considerados por nós como um único ponto.

Em cada caso foi referido o número de células contadas, a média dos pontos AgNOR e sua variação.

Foram calculados a média e o desvio padrão dos casos positivos e negativos e comparados através do teste t de student.

Tabela 1. Grupo de pacientes com efusões pleurais/peritoneais e lavados peritoneais negativos para neoplasias

Casos	Material	Sexo	Idade	Diag. Clínico
22638	L. Peritoneal	M	43	Oclusão Intestinal
27749	Lav. Peritoneal	F	34	Carc. Cérvix
28810	Lav. Peritoneal	F	30	Carc. Cérvix
28952	L. Ascítico	M	64	Ascíte a esclarecer
29714	L. Peritoneal	F	40	Pancreatite aguda
29866	L. Peritoneal	F	45	Carc. Endométrio
29924	L. Peritoneal	F	33	Adenomiose Uterina
29968	L. Peritoneal	F	65	Carc. Endométrio
30410	Lav. Peritoneal	F	25	Carc. Ovário
31034	L. Peritoneal	F	69	Cirrose Hepática
31175	Lav. Peritoneal	F	40	Carc. Colo
31400	L. Peritoneal	F	60	Neoplasia Ovário?
31442	L. Peritoneal	F	33	Ascíte a esclarecer
31621	L. Ascítico	F	26	Insuficiência Hepática
31678	Lav. Peritoneal	F	35	Cisto Folicular Ovário
31679	Lav. Peritoneal	F	44	Tumor de Mesentério
31711	Lav. Peritoneal	F	-	Sarcoma
31794	L. Pleural	F	50	Hipoproteinemia
31909	Lav. Peritoneal	F	-	Leioma Uterino
32046	Lav. Peritoneal	F	-	Carc. Endométrio
32084	L. Peritoneal	M	50	Hepatite Viral
32142	Lav. Peritoneal	F	64	Carc. Cérvix
32147	Lav. Peritoneal	M	60	Cirrose Hepática
32424	L. Ascítico	M	55	Insuficiência Hepática
32471	L. Pleural	M	69	Neoplasia
32638	L. Ascítico	M	43	Intussuscepção íleo-Cecal
33066	Lav. Peritoneal	F	86	Carc. Endométrio
33068	L. Ascítico	F	40	Pancreatite Crônica
33208	L. Ascítico	M	70	Insuficiência Cardíaca
33289	Lav. Peritoneal	F	-	Carc. Mama

Continuação

**Tabela 1:** Grupo de pacientes com efusões pleurais/peritoneais e lavados peritoneais negativos para neoplasias

Casos	Material	Sexo	Idade	Diag. Clínico
33588	L. Peritoneal	F	67	Carc. Cólon Sigmóide
33879	L. Pleural	M	86	Derrame Pleural
33967	L. Pleural	M	62	Neoplasia Pulmonar?
35305	Lav. Peritoneal	F	55	Tumor Anexial Gigante
36648	L. Ascítico	F	65	Provável Tumor de Ovário
36688	Lav. Peritoneal	F	86	Adenocarc. Endométrio
36693	Lav. Peritoneal	F	85	Tumor de Ovário D.
36694	L. Peritoneal	F	81	Carc. de Esôfago
36713	L. Ascítico	F	68	Adenocarc. Papila Duodenal?
36729	Lav. Peritoneal	M	68	Adenocarc. Papila Duodenal?
36773	Lav. Peritoneal	F	62	Carc. Endométrio
40167	Lav. Peritoneal	F	-	Tumor de Ovário
40181	L. Ascítico	M	49	Cirroze Hepática
40182	L. Pleural	M	-	A esclarecer
40189	L. Pleural	M	42	A esclarecer
40975	L. Ascítico	M	-	Tumor Gástrico
41061	Lav. Peritoneal	F	50	Miomatose Ext. TU Axial
41151	L. Peritoneal	F	38	Dor Pélvica Crônica
41351	L. Ascítico	M	35	Broncopneumonia

L = líquido

LAV = lavado

Carc. = Carcinoma

Tabela 2. Grupo de pacientes com efusões pleurais/peritoneais e lavados peritoneais positivos para neoplasias

Casos	Material	Sexo	Idade	Diag. Clínico
1618/79	L. Pleural	M	73	Adenocarc. Pulmão
27713	L. Peritoniai	F	40	Cisto Adeno Ovário
29458	Lav. Peritoniai	F	54	Carc. Endométrio
30974	L. Peritoniai	F	61	Carc. Endométrio
31214	L. Peritoniai	F	-	Carc. Endométrio
31266	L. Pleural	F	63	Carc. Ovário
33297	Lav. Peritoniai	F	53	Carc. Ovário E.
33715	L. Peritoniai	F	53	Cistoadenocarc. Ovário
33720	L. Pleural	F	74	Adenocarc. Metastático
33721	L. Pleural	M	54	Adenocarc. Metastático
33862	L. Pleural	F	60	A esclarecer
34247	L. Ascítico	F	47	Carc. Cólon Ascendente
34430	L. Pleural	F	58	Metástase
34696	Lav. Peritoniai	F	37	Tumor de Ovário
35368	L. Pleural	F	60	Tuberculose? Neoplasia?
35406	L. Pleural	M	51	A esclarecer
36017	L. Pleural	M	60	Carc. Epidermóide
36174	L. Ascítico	F	60	Ascite a esclarecer
36181	L. Pleural	F	26	Carc. de Mama
36682	L. Pleural	F	91	A esclarecer
37012	L. Pleural	F	51	A esclarecer
-	L. Pleural	M	-	Carc. Epidermóide
40319	L. Pleural	M	-	A esclarecer
40472	L. Pleural	F	60	A esclarecer
41093	L. Pleural	M	61	Carc. Pulmão

L = líquido

LAV = lavado

Carc. = carcinoma

## 4. RESULTADOS

## RESULTADO

Células mesoteliais normais tem usualmente um ponto pequeno e redondo por núcleo (Fig.1, tabela 3). Nas células mesoteliais reacionais a morfologia dos pontos não é tão uniforme, em alguns núcleos eles podem ser numerosos, mas a média dos pontos na amostra é também baixa (Fig.2 e 3, Tabela 3). As células epiteliais neoplásicas mostram em sua maioria numerosos pontos de formas muito variadas, às vezes bizarras, formando grandes agrupamentos (Fig.4 e 5, Tabela 4).

A tabela 3 discrimina a média e a variação dos pontos AgNOR por núcleo e o número de células contadas por caso, nas células mesoteliais normais e reacionais. A média do grupo foi de 1,71 com desvio padrão de 0,46 (Fig.6)

A tabela 4 discrimina a média e a variação dos pontos AgNOR por núcleo, e o número de células contadas por caso nas células epiteliais neoplásicas metastáticas onde a média foi de 3,98 com desvio padrão de 1,38 (Fig. 6).

A Fig.7 mostra em gráfico a distribuição dos 2 grupos estudados. Observa-se que a contagem de NDRs igual a 2,66 marca a intersecção entre eles com uma possibilidade de 1,70% de diagnóstico falso positivo e de 17,02% de

dignóstico falso negativo.

Aplicando o test t de student houve uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados ( $t = - 10.3057$  ;  $DF=72$  ;  $p < 0,05$  )

Tabela 3 - Células mesoteliais normais e reacionais: Média e variação dos pontos AgNOR por núcleo e Nº de células contadas por caso.

---

Casos	ncc	Var	x
22638	50	1 a 4	2,28
27749	99	1 a 3	1,07
28810	84	1 a 3	1,23
28952	60	1 a 3	1,35
29714	33	1 a 3	1,33
29866	95	1 a 4	1,49
29924	93	1 a 5	2,35
29968	99	1 a 3	1,17
30410	21	1 a 5	1,85
31034	42	1 a 4	1,75
31175	100	1 a 2	1,22
31400	65	1 a 6	2,50
31442	26	1 a 5	2,46
31621	50	1 a 6	2,50
31678	40	1 a 3	1,20
31679	57	1 a 5	2,15
31711	81	1 a 3	1,60
31794	68	1 a 4	1,92
31909	71	1 a 3	1,18
32046	50	1 a 2	1,26
32084	14	1 a 3	1,57
32142	22	1 a 8	1,57
32147	21	1 a 3	1,38
32424	25	1 a 2	1,84
32471	60	1 a 3	1,40
32638	50	1 a 4	2,20
33066	54	1 a 3	1,30
33068	78	1 a 5	2,70
33207	40	1 a 5	2,08
33289	82	1 a 4	1,50

continuação

Tabela 3 - Células mesoteliais normais e reacionais: Média e variação dos pontos AgNOR por núcleo e N<sup>o</sup> de células contadas por caso

Casos	ncc	Var	x
33588	56	1 a 5	1,70
33879	50	1 a 3	1,44
33967	100	1 a 5	1,90
35305	80	1 a 5	2,00
36648	50	1 a 4	2,30
36688	43	1 a 2	1,30
36693	50	1 a 3	1,50
36694	61	1 a 4	2,00
36713	30	1 a 2	1,06
36729	67	1 a 4	2,40
36773	78	1 a 4	1,33
40167	55	1 a 5	1,56
40181	60	1 a 7	2,08
40182	40	1 a 4	1,85
40189	22	1 a 2	1,09
40975	34	1 a 5	2,29
41061	42	1 a 3	1,35
41151	50	1 a 4	1,90
41351	29	1 a 4	2,55
Média = 1,71		Desvio Padrão = 0,46	

ncc = N<sup>o</sup> de células contadas

Var = Variação dos pontos AgNOR por caso

x = Média dos pontos AgNOR por caso

Tabela 4- Células epiteliais neoplásicas metastáticas: Média e variação dos pontos AgNOR por núcleo e N<sup>o</sup> de células contadas por caso.

Casos	ncc	Var	x
1618/79	18	1 a 9	4,00
27713	37	1 a 11	6,25
29458	44	1 a 9	4,06
30974	25	1 a 12	4,80
31214	17	1 a 17	6,66
31266	36	1 a 12	5,75
33297	50	1 a 6	3,70
33715	21	1 a 9	3,85
33720	40	1 a 10	3,47
33721	31	1 a 12	3,58
33862	22	1 a 12	3,40
34247	50	1 a 12	4,30
34430	28	1 a 8	3,40
34696	100	1 a 5	2,30
35368	83	1 a 5	2,50
35406	40	1 a 5	3,06
36017	15	1 a 5	2,40
36174	100	1 a 7	2,40
36181	38	1 a 7	3,07
36682	32	1 a 6	2,30
37012	50	1 a 9	3,10
-	21	1 a 12	5,75
40319	23	1 a 8	3,87
40472	35	1 a 14	4,42
41093	34	1 a 18	7,10

Média = 3,98

Desvio Padrão = 1,38

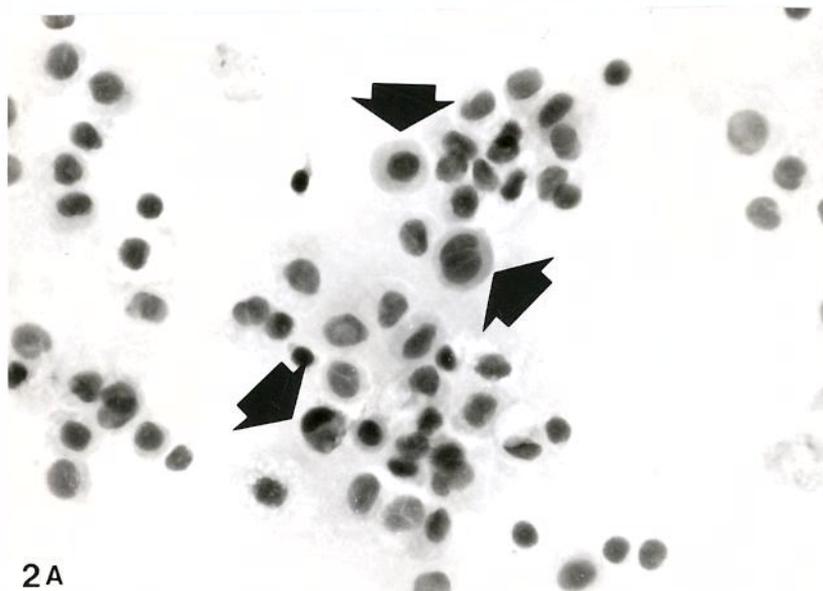
ncc = N<sup>o</sup> de células contadas

Var = Variação dos pontos AgNOR por caso

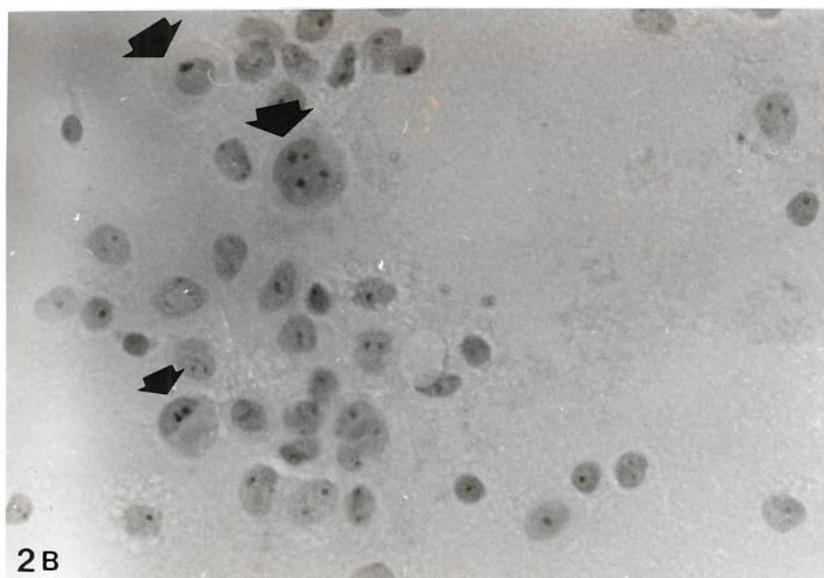
x = Média dos pontos AgNOR por caso



Fig. 1. (C. 30410). Células mesoteliais normais.  
(a) Hematoxilina-eosina (b) Técnica AgNOR.  
Média de NORs = 1.85



2A



2B

Fig. 2. (C.31794). Células mesoteliais reacionais (seta).  
(a) Hematoxilina-eosina . (b) Técnica AgNOR.  
Média de NORs = 1.92

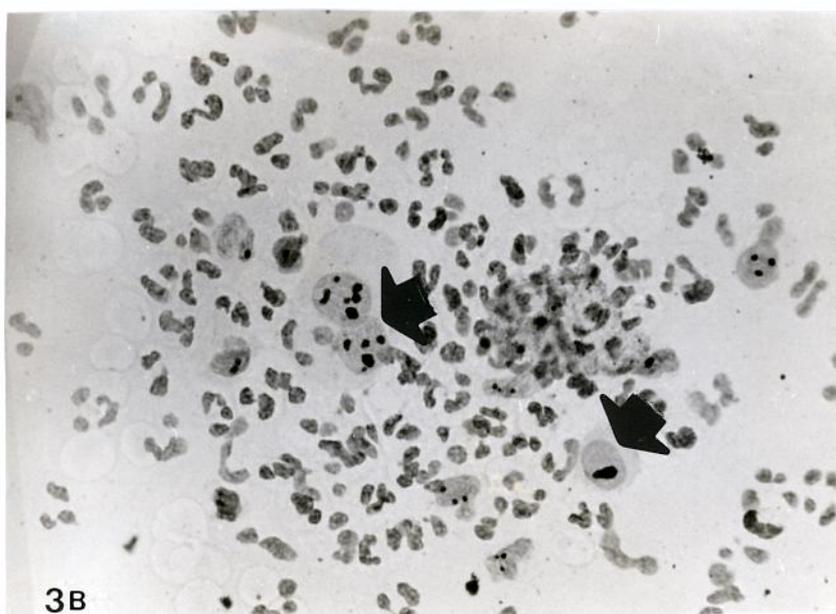
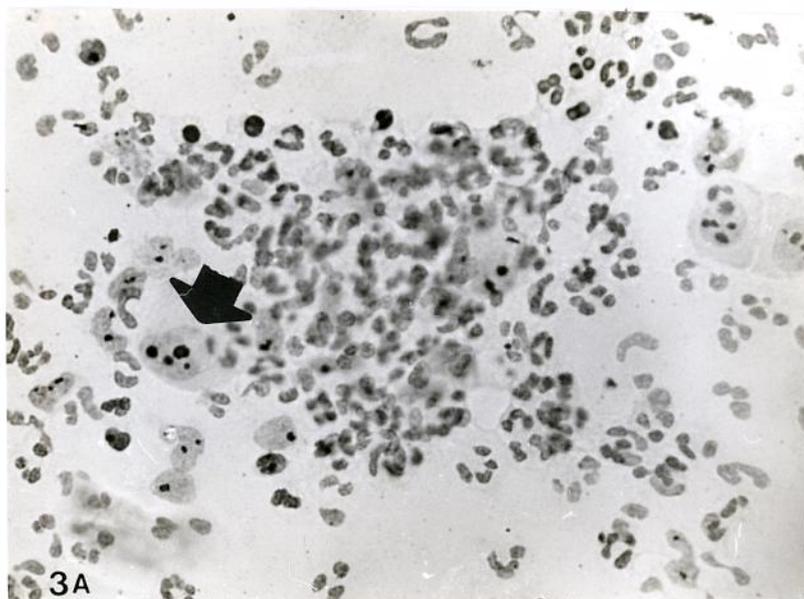
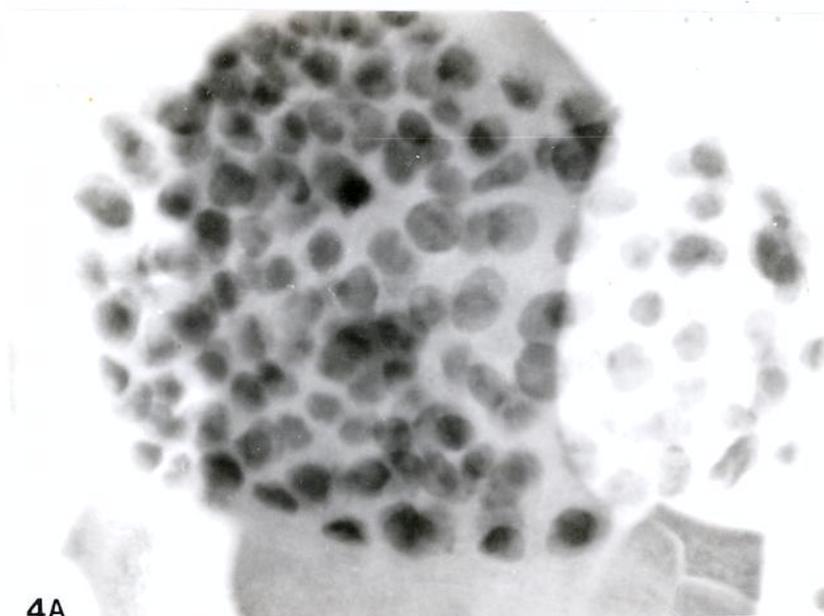
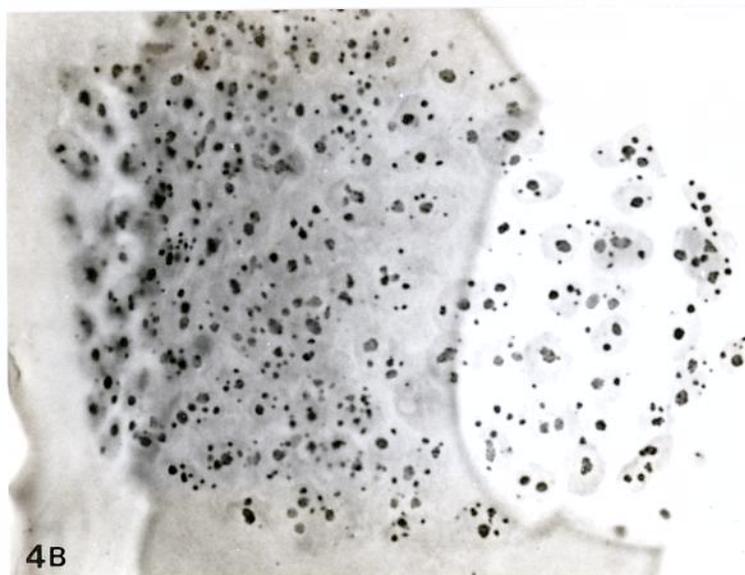


Fig. 3 (C. 31442). Células mesoteliais reacionais (setas).  
(a) e (b) Técnica AgNOR. Média de NORs = 2.46.



4A



4B

Fig. 4 (C.29458). Células carcinomatosas em lavado peritoneal.

(a) Hematoxilina-eosina. (b) Técnica AgNOR.

Média de NORs = 4.06

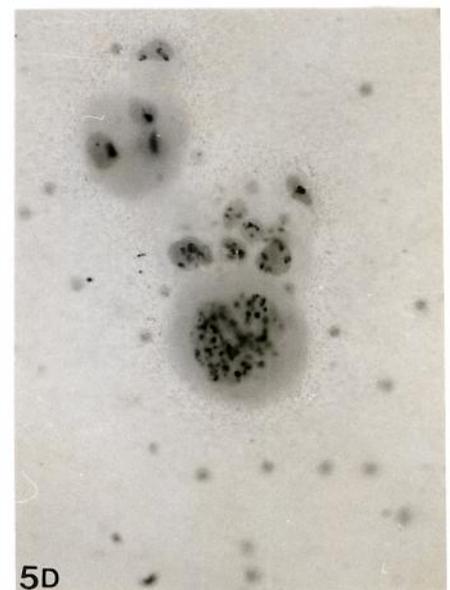
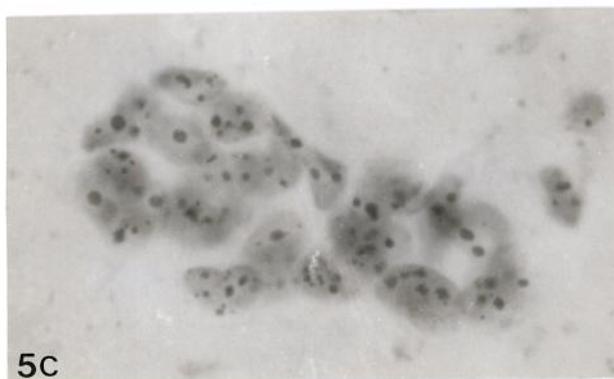
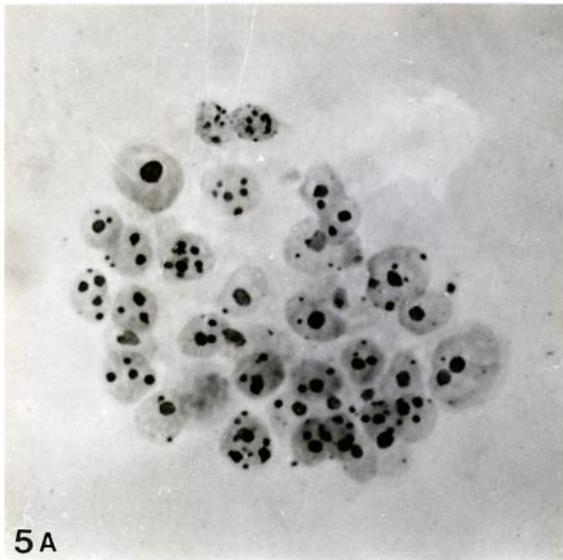


Fig. 5 Células carcinomatosas metastáticas (a = C. 29458, média de NORs = 4.06), (b = C.30974, média de NORs = 4.80), (c = 31266, média de NORs = 5.75) e (d = s/n<sup>o</sup>, média de NORs = 5.75). Técnica AgNOR.

Média dos pontos Ag-NOR por célula

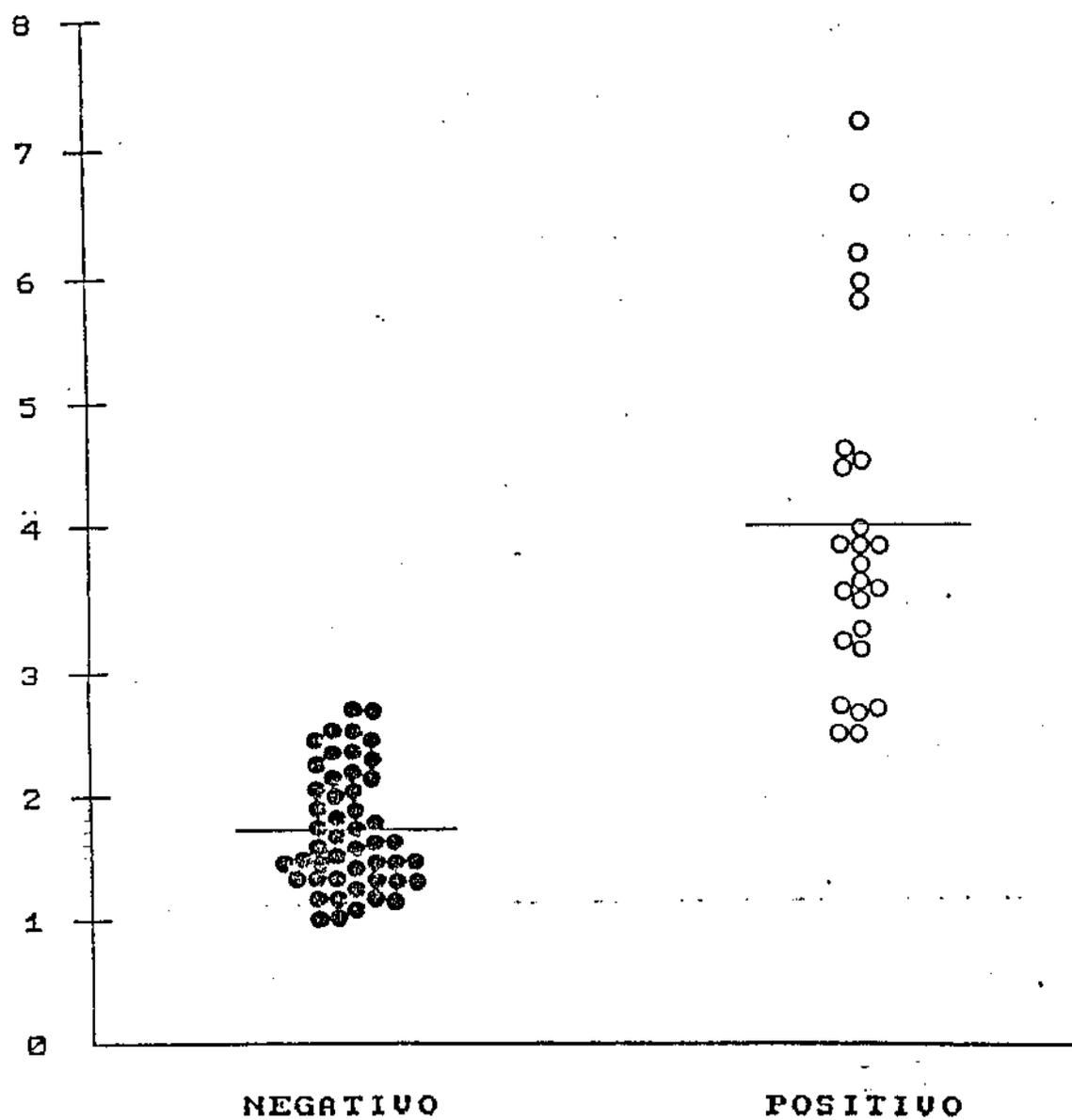
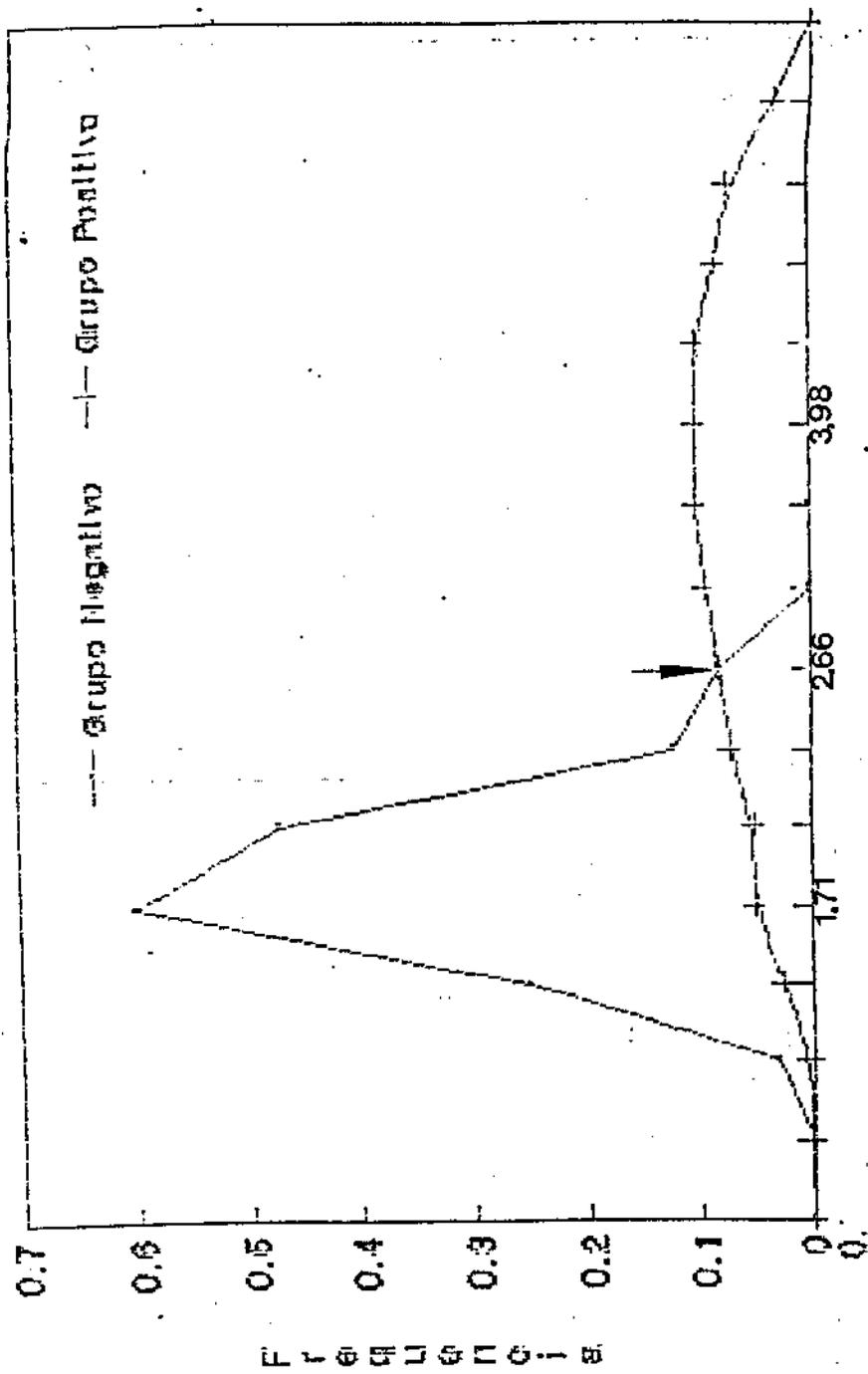


Fig.6 - Média dos pontos Ag-NOR por célula para os grupos negativo (●) (n=49) e positivo (○) (n=25) para neoplasia em efusões e lavados peritoneiais.  $p < 0.05$  (Student T test).

# CONTAGEM AG-NOR EM DERIVAMES DE CAVIDADES Serosas e em Lavados Peritoneais



Média de Ag-NORs/Célula

Fig. 7 - Distribuição dos pontos Ag-NOR por núcleo nos grupos negativo e positivo com as respectivas médias. A seta destaca o valor de interseção dos dois grupos.

## 5. DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

Escolhemos o estudo de líquidos coletados espontaneamente em cavidades serosas e de lavados peritoniais, porque o diagnóstico diferencial entre célula mesotelial reacional e célula epitelial neoplásica é reconhecidamente difícil (KOSS, L.G., 1979). É sabido que nas revisões de cavidade peritoneal ("second look"), o exame citológico do lavado permite a obtenção de resultado positivo para células neoplásicas mesmo quando as biópsias são negativas. Estas são feitas ao acaso quando não há lesão evidente, por isso é grande a chance de não detectar um implante inicial no peritônio (ZUNA, R.E. et al., 1989). O seguimento mostra que os casos com biópsia negativa e citologia positiva tem pior prognóstico, indicando necessidade de um acompanhamento diferente para esses pacientes. Outras situações clínicas mostram que o exame citológico de líquidos, geralmente colhidos precocemente, pode orientar a conduta com o paciente.

Nossa contagem AgNOR em células mesoteliais normais ( $\bar{x} = 1,71$ ,  $sd = 0,45$ ) é muito semelhante à apresentada por AYRES et al. (1988) ( $\bar{x} = 1,75$ ,  $sd = 0,55$ ) e COLECCHIA et al. (1991) ( $\bar{x} = 1,56$ ,  $sd = 0,77$ ). DERENZINE et al. (1988) não contaram o número de AgNOR por núcleo, mas a área ocupada por eles.

Nossos resultados demonstram claramente que a técnica AgNOR pode prestar um grande auxílio na interpretação dos líquidos cavitários ( efusões e lavados ), pois há uma acentuada diferença na contagem de NORs de células mesoteliais (normais ou reacionais) e células epiteliais malignas.

Foi extremamente fácil a contagem dos líquidos ou lavados negativos , pois os pontos AgNOR não variam de forma e tamanho. A margem de erro fica relativamente pequena utilizando o valor de 2,66 com limite entre os dois grupos, sendo 1,07% a chance de darmos diagnóstico falso positivo.

Consideramos elevada a chance de haver falsos negativos (17,02%), que resultou da existência de 5 casos positivos com contagem abaixo de 2,66 ( ver tabela 4). Esses casos nos trouxeram muitas dificuldades na contagem pois algumas células apresentavam vários pontinhos AgNOR, impossíveis de serem contados e estes foram considerados como um só. Em outras havia poucos pontos, mas eram grandes e de morfologia variada e/ou bizarra. Isto está de acordo com estudos em outras células epiteliais (ARENDS & KATE, 1988 ; RAYTER et al. , 1992 ; SUAREZ et al. , 1989) onde a afirmação de haver elevada contagem de NOR em célula neoplásica não é uma constante . Especificamente em mucosa colo-retal a morfologia dos NORs é mais importante para o diagnóstico que sua contagem (TREVISAN\* et al. , 1993 ; BUFO et al. , 1992). Entretanto para a finalidade específica de diferenciação de células

---

\*TREVISAN, M.A.S. (Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas). Aplicação da técnica Ag-NOR na mucosa colo-retal: interpretações e limitações [ Apresentado ao XIX Congresso Brasileiro de Patologia, Santos, 1993 ]

mesoteliais reacionais versus célula epitelial neoplásica, a contagem de NOR é de grande valia pois vai poder ajudar no diagnóstico em cerca de 80% dos casos, como ficou demonstrado . Isto só foi possível porque a célula mesotelial mostra pouca alteração morfológica e quantitativa nos NORs, mesmo em condições reacionais.

Sabemos que não existe técnica com 100% de sensibilidade e de especificidade no diagnóstico de neoplasias, incluindo as reações imunohistoquímicas (CHIN-YANG LI et al., 1988; KWEE et al., 1982 ; ; LINARI et al ., 1989). O ideal seria podermos fazer um painel de reações nos casos duvidosos ao HE , mas na prática isto é quase impossível. Sendo assim, a técnica AgNOR pode dar esse auxílio de forma barata e de fácil execução , portanto reproduzível na maioria dos laboratórios de Anatomia Patológica .

Gostaríamos ainda de comentar que todas as reações com prata utilizadas em histoquímica eventualmente não apresentam bons resultados técnicos por motivos desconhecidos. Em nosso trabalho cerca de 10% dos casos submetidos à técnica AgNOR não coraram ou mostraram precipitado de prata ou gelatina. Esses casos evidentemente foram retirados do trabalho, restando então as 76 amostras relatadas. Os usuários do método devem ter conhecimento dessa possibilidade de falha técnica.

## 6. CONCLUSões

## CONCLUSÕES

- 1- A análise quantitativa dos NORs em células do sedimento de derrames em cavidades serosas e de lavados peritoniais levou à sua padronização na célula mesotelial normal/reacional e em células carcinomatosas metastáticas na membrana serosa.
- 2- Para as células carcinomatosas, os pontos AgNOR mostraram grande variação morfológicas:
  - muitos pontos com forma e tamanho variados, ou
  - múltiplos pontinhos, ou
  - poucos pontos de forma aberrante, ou
  - numerosos pontos pequenos agrupados (clusters)
- 3- Com a aplicação da técnica Ag-NOR nos casos de derrame de difícil interpretação, a chance de obtermos um diagnóstico falso positivo foi mínima (1,70%).
- 4- A técnica Ag-NOR auxilia nos casos de difícil interpretação dos derrames em cavidades serosas e dos lavados peritoniais com uma chance de 80% de acerto no diagnóstico desses casos específicos.
- 5- A técnica Ag-NOR é simples, de custo baixo e facilmente reprodutível em qualquer laboratório de Anatomia Patológica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Molecular Biology of the cell. Garland Publishing, Inc. New York & London, 1989.

ARENDS, J.W.; KATE, J. AgNOR in colonic mucosa lesions. [letter]. Histopathology, 13: 707, 1988.

AYRES, J.G.; CROCKER, J.G.; SKILBECK, N.Q. Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells by the argyrophil technique for nucleolar organiser region associated proteins. Thorax, 43: 366-370, 1988.

BARSOTTI, P.; ASCOLI, V.; NARDI, F.; MARINOZZI, V. Silver staining of interphase nucleolar organizer regions in cytologic smears by the Papanicolaou and May - Grunwald - Giensa techniques. Diagnostic Cytopathology, 6: 289-296, 1989.

BEIGUELMAN, B. Citogenética humana. Editora Guanabara Kaogan S.A. Rio de Janeiro, 1982.

- BUFO, P.; FRANSANITO, F.; MAIORANO, E. Colorectal carcinoma and its precursors: role of argyrophilic nucleolar regions (Ag-NOR). Bolletino Societa Italiana Biologia Sperimentali, 68: 129-136, 1992.
- BUSCH, H.; DASKAL, Y.; GYORKEY, F.; SMETANA, K. Silver staining of nucleolar granules in tumor cells. Cancer Res, 39: 857-863, 1979.
- CHIN - YANG LI; ZIESMER, B.S.; WONG, Y-C; YAM, L.T. Diagnostic Accuracy of the Immunocytochemical study of body fluids. Acta Cytologica, 33: 667-673, 1989.
- COLECCHIA, M.; AGNELLI, T.; CARONNI, E.; LEOPARDI, O. Utilità della morfometria e della conta delle regioni nucleolo - organizzatrici nella discriminazione delle cellule mesoteliali reattive e maligne nei versamenti pleurici. Pathologica, 83: 89-97, 1991.
- COLECCHIA, M. & LEOPARDI, O. Evolution of AgNOR count in distinguishing benign from malignant mesothelial cells in pleural fluids. Pathology Research Practice, 188: 541-544, 1992.
- DERENZINI, M.; ROMAGNOLI, T.; MINGAZZINI, P.; MARINOZZI, V. Interphasic nucleolar region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. Virchows Archiv B Cell Pathol, 54: 334-340, 1988.

DIMOVA, R.N.; MARKOV, D.V.; GAJDARDJIEVA, K.C.; DABEVA, M.D  
& HADJIOLOV, A.A. Electron microscopic localization of  
silver staining NOR-proteins in rat liver nucleoli upon  
D- Galactosamine black of transcription. Eur Journal  
Cell Biol, 28: 272-277 , 1982.

ERARD, M.S.; BELENGUER, D.; CAIZERGUES-FERRER, M.;  
PANTALORI, A.; AMALRIC, F. A major nucleolar protein,  
nucleolin, induces chromatin decondensation by binding  
to histone H1. Eur Journal Biochem, 175: 525-530 , 1988.

FERNANDEZ-GOMEZ, M.E.; SANCHES-PINA, M.A.; RISUENO, M.C &  
MEDINA, F.J. Differential staining of the nucleolar  
organizing region (NOR) and nucleolar components by a  
new silver technique in plants. Cell Mol Biol, 88:  
181-187 , 1983.

GHOSH, S. The nucleolar structure. Int Rev Cytol, 44:  
1-28, 1976.

GOESSENS, G. Nucleolar structure. Int Rev Cytol, 87:  
107-158 , 1984.

GROTTO, H.Z.W. Regiões Organizadoras do Nucléolo na  
Hematopoese normal e nas leucemias agudas. Campinas,  
1990. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

- HERNANDEZ-VERDUN, D.; DERENZINI, M & BOUTEILLE, M.  
Relationship between the Ag-NOR protein and ribosomal  
chromatin in situ during drug-induced RNA synthesis  
inhibition. Journal Ultrastuct Res, 88 :55-65, 1984.
- HERNANDEZ-VERDUN, D.; HUBERT, J.; BOUGEDIS, C.A.;  
BOUTELLE, M. Ultrastructural localization of Ag-NOR  
stained protein in the nucleolus during the cell cycle  
in other nucleolar structures. Chromosoma, 79: 349-362 ,  
1980.
- HERRERA, A.H.; OLSON, M.D.J. Association of protein C23  
with rapidly labeled nucleolar RNA . Biochemistry, 25:  
6258-6264 , 1986.
- HERRERA, G.A.; WILKERSON, J.A. Ultrastructural studies of  
malignant cells in fluids. Diagnostic Cytopathology, 1 :  
272-285 , 1985.
- HOWELL, W.M . Selective staining of nucleolus organizer  
regions (NORs). In : BUSCH, H.; ROTHBLUM, L (eds) The  
cell nucleus. Vol XI. Academic Press , New York. pp  
89-142 , 1982.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver colloid  
stainig of nucleolar organising regions with a  
protective colloidal developer; a one-step method.  
Experimentia, 36: 1014 , 1980.

JORDAN, G . At the heart of the nucleolus. Nature, 329: 489- 490 , 1987.

KOSS, L.G. Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases. J.B. Lippincott , 1979.

KWEE, W.S.; VELDHUIZEN, R.W.; GOLDING, R.P.; MULLINK, H.; STAM, J. Histologic distinction between malignant mesothelioma, benign pleural lesion and carcinoma metastasis. Virchows Arch [Pathol Anat], 397: 287-299 , 1982.

LINARI, A.; BUSSOLATI, G . Evolution of impact of immunocytochemical techniques in cytological diagnosis of neoplastic effusions. Journal Clinical Pathology, 42: 1184-1189 , 1989.

MEDINA, F.J. ; RISUEND, M.C.; SANCHEZ-PINA & FERNANDEZ-GOMES, M.E. A study on nucleolar staining in plant cells. The role of argyrophilic protein in nucleolar physiology. Chromosoma, 88: 149-155 , 1983.

MEGAN LIM, S.; DUGGAN, M.A.; RUFF, M.; RAHIM, S.; MCGREGOR, S.E.; GREEN, F.Y. Morphometric analysis of nucleolar organizer regions in benign and malignant peritoneal effusions using backscattered electron microscopy. Journal of Pathology, 166 : 53-60 , 1992.

MELLO, M.L.S. Nucleolo. Estrutura, ultraestrutura e composição. A biogênese de ribossomas e outras funções. In Biologia Celular (ed. B.C. Vidal & Mello) pg 183-195, 1987.

MIRRE, C.; STALL, A. Ultrastructural organization sites of transcription and distribution of fibrillar center in the nucleolus of the mouse oocyte. Journal Cell Sci , 48 : 105-126 ,1981.

NANCE, K.V.; SILVERMAN, J.F. The utility of ancillary techniques in effusion cytology. Diagnostic Cytopathology, 8 : 185-189 , 1991.

PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic protein of the nucleolar organizer region at the optical level. Histochemical Journal ,18 : 5-14 , 1986

PLOTON, D.; THIRUY, M.; MENAGER, M.; LEPOINT, A.; ADNET, J.J.; GOESSENS, G. Behaviour of nucleolus during mitosis. A comparative ultrastructural study of various cancerous cell lines using the AgNOR staining produce. Chromosoma, 95 : 95-107 , 1987.

RAYTER, Z.; SURTEES, P.; TILDESLEY, G.; CORBISHLEY, C. The prognostic values of NORs in colorectal cancer. European Journal of Surgical Oncology,18: 37-40 , 1992.

SUAREZ, V. ; NEWMAN, J.; HILEY, V. ; VTOVKRT, J. & COLLINS, M. The value of NOR numbers in neoplastic and non-neoplastic epithelium of the stomach. Histopathology, 14 : 61-66 , 1989.

ZUNA, R.E.; MITCHELL, M.L.; MULICK, K.A.; WEIJCHERT, W.M.; Cytohistologic correlation of peritoneal washing cytology in gynecologic disease. Acta Cytologica 33 : 327 , 1989.

## ABSTRACT

The AgNOR reaction was performed on effusions and peritoneal washings, and the silver dots counted on normal or reactive mesothelial cells versus carcinomatous cells, ascertained by previous HE staining. The mean values were 1.71 for the former (n=49) and 3.98 for the latter (n=25). The intersection between the two group distributions was 2,66, leaving a chance of only 1.07% for a false positive result. The method may thus be helpful in the interpretation of doubtful cytological cases.