

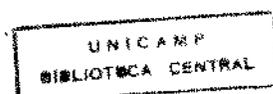
ERNI MARIA MANCINI CIA

***TÉCNICA AgNOR: UM AUXÍLIO NO
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL EM
CITOLOGIA URINÁRIA.***

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação, da Faculdade de
Ciências Médicas, da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Anatomia Patológica.*

***Orientadora: Dr^a. Miriam Aparecida da Silva Trevisan
Co-orientador: Dr. Konradin Metze***

Campinas - 1996



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	UNICAMP C488
V.	Ex.
TOMBO BC	23037
PROC.	667170
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	86/11,00
DATA	20/02/96
N.º CPDC	M.00025368-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP**

Cia, Erni Maria Mancini

C48t **Técnica AgNOR : um auxílio no diagnóstico diferencial em citologia urinária / Erni Maria Mancini Cia. Campinas, SP : [s.n.], 1996.**

Orientador : Miriam Aparecida da Silva Trevisan

Tese (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Região organizadora do nucléolo. 2. Urina - citologia. 3. Diagnóstico diferencial. 4. Carcinoma. I. Trevisan, Miriam Aparecida da Silva. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Tese de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Miriam Aparecida da Silva Trevisan

Membros:

1. MIRIAM APARECIDA DA SILVA TREVISAN, PROF. LIVRE-DOC. UNICAMP *Miriam*
2. ATHANASE BILLIS, PROF. TITULAR UNICAMP *A. Billis*
3. PATRÍCIA CABINO DE MATTOS, PROF. ASS'T. SR. PUCCAMP *Patrícia Cabino de Mattos*

Curso de pós-graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10.01.1996

*A Geraldo, meu esposo e
Hugo, Isa, Noemi e Elia, nossos
filhos, pelo seu amor, compreensão,
orações e apoio, em todo o tempo.*

Agradecimentos

Ao meu Deus, pelo amor e pela graça renovados a cada dia.

Aos meus orientadores:

Dr^a Miriam Aparecida da Silva Trevisan, pela sugestão do tema e orientação, estímulo, tempo dispendido, revisão do texto e de quem tenho aprendido citologia diagnóstica e o amor ao trabalho.

Dr. Konradin Metze, pelos conselhos, estímulo, apoio, orientação e o trabalho estatístico.

Aos técnicos de laboratório: Sr^a Naime e Sr Carlos Aprigio, pelo processamento do material citológico de rotina usado na tese, além do auxílio no aprendizado da técnica AgNOR e na tentativa de citoinclusão no início do trabalho. À bióloga Fátima Neder, também pelo auxílio na técnica AgNOR e companherismo na pós-graduação. Ao Sr. Marco Antonio Gongora, por alguns trabalhos fotográficos.

À secretária da pós-graduação Maria do Carmo Machado da Silva, pelo sorriso, assistência, boa vontade e colaboração constantes.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia Patológica que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

Ao Dr. Athanase Billis, pela licença no uso dos casos de histopatologia urológica, participação na banca de qualificação e sugestões.

À Dr^a Patricia Sabino de Matos, pela participação na banca de qualificação e sugestões.

Aos meus colegas de trabalho, pela amizade, pelo incentivo, conselhos e ensinamentos, dr^{as} Liliana, Leticia, Irene, Ingrid, Cecília e dr José Vassalo, muito obrigada.

Aos residentes da Urologia, Dr. Cássio e seus colegas, pelas informações clínicas do protocolo.

Ao Serviço de Apoio Didático da F.C.M., pelos recursos audiovisuais, montagem dos slides da aula de apresentação da tese. Ao Jefferson pelo trabalho de editoração. À prof.^a Maise pela correção ortográfica. Ao Sr. Emilton pela montagem dos slides. À Sr^a Léia, pela versão para o inglês do resumo (summary).

À UNICAMP, que me possibilitou esta oportunidade.

Aos meus pais, Walterni e Antonio, pela minha formação e pelos valores eternos que me passaram.

Ao meu esposo Geraldo, pelo amor incondicional.

***“Mas, quando vier o que é perfeito,
então o que é em parte será aniquilado.”***

1 COR. 13 : 10



SUMÁRIO

RESUMO.....	i
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O CARCINOMA UROTELIAL VESICAL.....	2
1.2. UROCITOLOGIA.....	4
1.2.1. <i>CITOLOGIA DO UROTÉLIO NORMAL</i>	7
1.2.2. <i>CITOLOGIA DO UROTÉLIO REACIONAL</i>	7
1.2.3. <i>CITOLOGIA NOS TUMORES UROTELIAIS PUROS</i>	9
1.2.4. <i>ACURÁCIA, ESPECIFICIDADE e SENSIBILIDADE - REVISÃO da LITERATURA</i>	11
1.3. SOBRE AS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEARES.....	14
1.3.1. <i>A TÉCNICA AgNOR</i>	20
1.3.2. <i>APLICAÇÃO DA TÉCNICA AgNOR EM UROPATOLOGIA</i>	24
1.3.3. <i>APLICAÇÃO DA TÉCNICA AgNOR EM UROCITOLOGIA</i>	26
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. MATERIAL.....	29
3.2. MÉTODOS.....	34
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA-MÉTODOS.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. RESULTADOS, TABELAS E ILUSTRAÇÕES.....	39
4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	49
4.2.1. <i>CURVAS DA DISTRIBUIÇÃO DE CASOS POR NÚMERO MÉDIO DE AgNORS. DETERMINAÇÃO DO PONTO DE CORTE ENTRE AS CURVAS</i>	49
4.2.2. <i>NÚMERO DE AgNORs POR GRUPO (CONTROLE versus TUMORAL)</i>	52

4.2.3. <i>TESTE DE COMPARAÇÃO ENTRE OS TRÊS GRUPOS SIMULTANEAMENTE</i>	54
4.2.4. <i>GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL versus NÚMEROS DE AgNORs</i>	56
4.2.5. <i>PADRÃO MORFOLÓGICO DE APRESENTAÇÃO DAS AgNORs NOS GRUPOS</i>	58
4.2.6. <i>ANÁLISE DISCRIMINATÓRIA</i>	59
5. <i>DISCUSSÃO</i>	61
6. <i>CONCLUSÕES</i>	69
6. <i>SUMMARY</i>	70
7. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	72
8. <i>ANEXOS</i>	85

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1a - RELAÇÃO GERAL da CASUÍSTICA e RESULTADOS do GRUPO 1 - Controles (n: 26)	40
CONT. TAB. 1b- RELAÇÃO GERAL da CASUÍSTICA e RESULTADOS do GRUPO 2- Tumores uroteliais de baixo grau (n: 19)	41
CONT. TAB. 1c- RELAÇÃO GERAL da CASUÍSTICA e RESULTADOS do GRUPO 3- Tumores uroteliais de alto grau (n: 25)	42
FIGURA 1 (CASOS: 7,12 e 13) - Células uroteliais normais/reacionais	43
FIGURA 2 (CASO 35) - Tumor urotelial de baixo grau	44
FIGURA 3 (CASO 35 e 43)- Tumor urotelial de baixo grau	45

FIGURA 4 (CASO 70) - Tumor urotelial de alto grau.....	46
FIGURA 5 - (CASO 48) - Tumor urotelial de alto grau.....	47
GRÁFICO 1 - Número médio de AgNORs por grupos 1, 2 e 3.....	48
GRÁFICO 2 - Entrecruzamento das curvas do grupo controle e do grupo tumoral.....	51
TABELA 2 - Números médios das AgNORs nos Grupos: Controle e Tumoral Geral.....	52
GRÁFICO 3 - Histograma da distribuição de número AgNORs por grupos tumoral (G1 e G2 +3).....	53
TABELA 3 - Teste de Dunn - para comparação 2 a 2	54
GRÁFICO 4 - Histograma da distribuição de número AgNORs por grupos tumorais (G2) e (G3).....	55
TABELA 4 - O valor médio de AgNORs por grau histológico tumoral.....	56
GRÁFICO 5 - Distribuição de AgNORs por graus histológicos.....	57
TABELA 5 - Padrão Morfológico das AgNORs nos Grupos G1, G2 e G3.....	58
TABELA 6 - Análise discriminatória (matriz de classificação).....	60
ANEXO 1 - Casuística e Métodos - Modelo de Protocolo.....	86
ANEXO 2 - TABELA 7 - Distribuição da Frequência do Estádio nos Grupos Tumorais: G2 e G3. Análise estatística AgNORs x Estádio Tumoral.....	87
ANEXO 3.1 - TABELA 8 - Graduação Citológica <i>versus</i> Graduação Histológica nos Grupos G1, G2 e G3.....	88
ANEXO 3.2 - TABELA 9 - Correlação dos Resultados Citológicos <i>versus</i> Estádio Histológico.....	89



RESUMO

Palavras-chave: AgNORs, citologia urinária, carcinoma e diagnóstico diferencial.

RESUMO- A técnica AgNOR pode ser de ajuda para solucionar o problema do diagnóstico diferencial citológico de tumores uroteliais de bexiga, especialmente nos de baixo grau de malignidade *versus* células uroteliais reacionais, por ser considerada como marcadora de proliferação celular e/ou de malignidade, conforme a literatura especializada tem demonstrado nos diferentes tecidos.

Aplicando-se a técnica AgNOR, o objetivo principal foi correlacionar as análises quantitativa (contagem) e qualitativa (morfológica) dos pontos nucleares prata-positivos em células uroteliais de casos controles e neoplásicos, de baixo e alto grau de malignidade. Este estudo compreendeu setenta (70) exames citológicos pareados com seus respectivos histopatológicos de carcinomas uroteliais primários vesicais (n=44) e de controles (n=26). As avaliações citológicas foram realizadas em lâminas de sedimento urinário, previamente coradas pela hematoxilina-eosina, descoradas, impregnadas pela prata coloidal, através da técnica AgNOR (PLOTON et al., 1986) e analisadas com microscopia óptica comum, em objetiva de 40x. Na citologia, os casos positivos para células neoplásicas foram classificados conforme a graduação citológica de KOSS (1992) em: tumores de baixo grau de malignidade (n=19), correspondendo aos graus 1 e 1-2 da classificação histológica de KOSS e tumores de alto grau (n=25), correspondendo aos graus 2, 2-3, e 3. Houve significância estatística entre as diferenças das médias de pontos contados nos casos de neoplasia e nos controles ($p < 0,001$ - teste de Mann- Withney) e entre os três grupos juntos ($p < 0,001$ - teste de Kruskal-Wallis).

Na interseção das curvas da distribuição dos pontos AgNORs, no grupo controle e no tumoral (valores logaritmados), determinamos o valor crítico de corte de 2,96 pontos AgNORs. A especificidade da técnica é 96,29%, a sensibilidade é 97,77%, e a acurácia, 97,22%. Pela morfologia das AgNORs há diferença significativa entre os casos tumorais e os controles ($p < 0,001$) e entre os de alto e baixo grau de malignidade ($p = 0,001$), aplicando-se dois (2) testes de Fisher. Além disso, a análise discriminatória, pelo método de Jackknife, classifica corretamente 84% dos casos com as variáveis independentes: número médio de AgNORs, o diferencial da variação máxima e mínima de AgNORs para cada caso e o padrão morfológico (homogêneo e heterogêneo). As variáveis dependentes foram: ausência de neoplasia, neoplasia de baixo grau e neoplasia de alto grau.

Concluimos, portanto, que a técnica AgNOR, em citologia oncótica urinária, é auxiliar no diagnóstico diferencial das lesões vesicais, usando-se os critérios quantitativo e qualitativo.



1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O CARCINOMA UROTELIAL VESICAL

O carcinoma urotelial vesical representa de 3 a 4 % das neoplasias do sexo masculino e tem-se descrito um aumento na incidência desse tipo de tumor com a industrialização dos grandes centros urbanos (KOSS, 1992). Corresponde à sétima mais comum neoplasia do sexo masculino em nosso meio (TORLONI & BRUMINI, 1978). Apresenta-se em duas formas principais: superficial e invasiva.

Os tumores superficiais da bexiga ocupam um lugar importante em oncologia. Isto porque são tumores heterogêneos no potencial biológico, com aparência morfológica similar entre si e têm um comportamento evolutivo diferente. Alguns apresentam recorrências superficiais e outros já se mostram, inicialmente, nas formas infiltrativas. Essa última apresentação, na história natural do tumor é um índice prognóstico negativo.

A clínica revela-nos que a maioria dos tumores bem diferenciados tem um curso benigno, enquanto os demais são mais agressivos. Dois terços (2/3) deles apresentam-se como papilíferos superficiais e, destes, cerca de dois terços (2/3) recorrem; 20% das recorrências são de alto grau de malignidade, invadem profundamente e metastatizam; cerca de 26% evoluem para a morte, por causa da doença. 80% das recorrências não mostram aumento no grau de malignidade (FRANKS, 1984). Há, portanto, diferentes formas de comportamento e evolução da enfermidade. Geralmente são multicêntricos, papilíferos, originam-se em diferentes locais, em diferentes tempos, de diferentes células e por diferentes causas.

O momento exato da progressão tumoral é imprevisível e não pode ser determinado durante o curso da doença. A impossibilidade de se prever a evolução do tumor vesical, somente com bases anatomomorfológicas e histopatológicas, tem sido o estímulo para a pesquisa de indicadores prognósticos preditivos do comportamento tumoral (MARANDOLA et al., 1992).

WEBB (1984) refere que os carcinomas uroteliais de grau 1, no primeiro diagnóstico, eram invasivos em apenas 6% dos casos, os de grau 2, 52%, e os de grau 3, 82%. Do total, 60% tinham invasão muscular já no primeiro diagnóstico. Quanto ao prognóstico, os pacientes seguidos por cinco (5) anos morreram em consequência do tumor: dos de grau 1, apenas 5% de cento e cinquenta e cinco (155) casos; dos de grau 2, 16% de noventa e dois (92) casos e dos de grau 3, 62% de cento e dezoito (118) casos, totalizando 26% dos trezentos e sessenta e cinco (365) pacientes (WEBB, 1984).

A maioria dos tumores uroteliais são papilíferos (tups) e o estudo do valor prognóstico das suas diferentes classificações histológicas é complicado, pelos seguintes fatos:

- Os tups são freqüentemente multifocais; observam-se as possíveis combinações em vários locais: pélvis renal e ureter, ou pélvis e bexiga, ou bexiga e uretra, ou ainda, em mais de dois (2) órgãos, como bexiga, uretra e ureter ou bexiga, pélvis e ureter;
- Em muitos desses pacientes o tumor pode recorrer. 69% dos carcinomas uroteliais recorreram em até 14 meses, num total de oitenta e quatro (84) casos observados em 5 anos (DE VOOGT et al., 1977); dos graus 1 e 0, 53% recorreram;
- Na macroscopia, a mucosa vizinha, aparentemente normal, de uma bexiga com tumor papilífero, pode apresentar focos microscópicos de acentuada atividade hiperplásica ou com alguma atipia, alguns dos quais podem ser classificados como carcinoma *in situ*.

Os estudos têm demonstrado que no carcinoma urotelial há uma alteração epitelial difusa e que alterações pré-neoplásicas podem ocorrer muito antes de qualquer tumor visível (WEBB, 1984), de formas variáveis, desde hiperplasias simples até o carcinoma *in situ* plano.

Referem-se três possíveis modos de desenvolvimento de uma recorrência de tumores:

- 1 - Recorrência real, quando o tumor original volta a crescer, provavelmente por remoção inicial incompleta;
- 2 - Implante do tecido tumoral durante o procedimento cirúrgico, ou implante de fragmento tumoral da bexiga ou ureter, na bexiga;
- 3 - Desenvolvimento de novos tumores como resultado de continuada influência de agentes carcinógenos no urotélio remanescente.

Em geral, a graduação tumoral relaciona-se com a extensão da invasão ou ausência dela. Tumores grau 3 tendem a invadir profundamente, enquanto lesões grau 1 são quase invariavelmente superficiais ou apenas focalmente invasivas na lâmina própria (WEBB, 1984).

1. 2. UROCITOLOGIA

As aplicações da técnica citológica no trato urinário são, principalmente, para:

- 1 - Diagnóstico de tumores do trato urinário, em pacientes com hematuria ou outros sinais e sintomas suspeitos para neoplasia;
- 2 - Monitoramento de pacientes tratados de lesões neoplásicas do trato urinário inferior. Segundo KOSS (1992), a citologia tem alta acurácia em detectar recorrência tumoral e câncer residual;
- 3 - Seguimento de trabalhadores assintomáticos de indústrias químicas, com alto risco para câncer das vias urinárias;
- 4 - Determinação do grau de diferenciação tumoral.

Estudos da acurácia da citologia oncótica urinária têm mostrado uma grande diversidade de resultados, considerando os diferentes graus tumorais. Diferenças nas técnicas de preparação dos esfregaços, no número de amostras incluídas nos estudos e variações no critério citológico de malignidade dos tumores vesicais têm sido usadas como possíveis explicações.

Para KOSS (1992), é importante reconhecer que a interpretação citológica de urina espontânea não é fácil e que a preparação do sedimento urinário deve ser cuidadosa, recomendando o uso de pelo menos três amostras do material.

Dificuldades na interpretação citológica para certas lesões não neoplásicas do urotélio têm sido detalhadas na literatura. Diante de um amplo espectro de modalidades terapêuticas, o citopatologista encontra uma grande variedade de reações celulares, cujo conhecimento é fundamental para a interpretação correta do sedimento urinário.

Existem condições benignas que podem produzir "atipias" em células uroteliais que, muitas vezes, mimetizam células neoplásicas e provocam erro de interpretação. O diagnóstico diferencial entre elas nem sempre depende apenas da experiência do patologista porque se assemelham muito com as alterações citológicas neoplásicas de baixo grau de malignidade.

Segundo KANNAN & BOSE (1993), as possíveis causas de erro no citodiagnóstico são:

- alterações artefatuais por técnicas abrasivas como instrumentação vesical, cateterismos, lavagem vesical e mesmo simples manipulação da bexiga;
- imunoterapia com BCG e/ou uso de drogas quimioterapêuticas de instilação local, intravesical;
- radioterapia e eletrocauterização;
- cálculos nas vias urinárias;

- inflamação severa e/ou crônica das vias urinárias;
- infecção pelo *Polyoma virus*;
- hiperplasias uroteliais típicas e atípicas;
- efeito de drogas como enduxan, bleomicina ou fenacetina;
- contaminação por células da vesícula seminal (em homens idosos, após massagem da próstata) ou de papilomatose da carúncula nas mulheres.

O citopatologista necessita, então, de uma técnica auxiliar para diferenciação dessas células alteradas ou identificação das neoplásicas, especialmente as tumorais de baixo grau de malignidade.

Embora não haja unanimidade entre os autores quanto a sua aplicabilidade e reprodutibilidade, o emprego de métodos que avaliem a proliferação celular tem auxiliado no diagnóstico diferencial entre as alterações artefatuais ou reacionais e aquelas de caráter neoplásico. Entre estes métodos está a técnica AgNOR (PLOTON et al., 1986), que cora as proteínas associadas às regiões organizadoras do nucléolo e permite observação direta ao microscópio óptico ou ao microscópio eletrônico. Com este processo, as AgNORs se apresentam prata-positivas (pretas ou acastanhadas) intranucleares, tendo número, forma e/ou área relacionados, na literatura, com neoplasia e também com malignidade (DERENZINI et al., 1986; ANONYMOUS, 1987; CROCKER & SILBECK, 1987; CROCKER & NAR, 1987; EGAN et al., 1987; UNDERWOOD & GIRI, 1988; WALKER, 1988; CROCKER & McGOVERN, 1988; CROCKER & EGAN, 1988; CROCKER et al., 1989; DERENZINI et al., 1988; 1989; 1990; GIRI et al., 1989; CROCKER, 1990; 1992; DELAHUNT et al., 1991; DERENZINI & PLOTON, 1991; DERENZINI & TRÈRE, 1991; RÜSCHOFF et al., 1989; 1990a; 1990b; 1992; 1993; EGAN & CROCKER, 1992; TREVISAN; SOUZA & MAGNA, 1993; TREVISAN, 1995).

1.2.1. CITOLOGIA DO UROTÉLIO NORMAL

Para o exame citológico, usa-se o sedimento do centrifugado de urina espontânea, puncionada, cateterizada, ou o produto de lavagem vesical ou ureteral com solução salina, ou ainda, o escovado de lesões na mucosa vésico-ureteral.

A urina espontânea normal é pobre em células, cujo número, após exercício físico, aumenta consideravelmente. Entre as células do sedimento urinário normal encontram-se as uroteliais: superficiais ou "umbrella-like", as piriformes ou intermédias e as parabasais, além de células escamosas, colunares ciliadas e muco-secretoras.

As células "umbrella-like" ou superficiais têm a forma levemente alongada ou rombóide. Apresentam núcleos grandes, com a cromatina bem organizada e que são múltiplos, freqüentemente. As células menores profundas são as parabasais, com o núcleo centralmente localizado ou são mais cilíndricas (células piriformes) e o núcleo na posição mais basal.

Núcleos picnóticos podem aparecer nas células superficiais e nas profundas, em quadros degenerativos, o que ocorre com freqüência, pois a urina não é isotônica e as células degeneram rapidamente. Se a urina é obtida por técnicas abrasivas, como o cateterismo ou lavagem vesical, é freqüente o encontro das superficiais multinucleadas ("umbrella-cells") muito grandes. Se a bexiga está superdistendida, as células desprendidas podem ter núcleos de tamanhos diferentes e aumentados.

1.2.2. CITOLOGIA DO UROTÉLIO REACIONAL

Uma marcada atipia pode ser encontrada quando a inflamação vesical é severa e/ou crônica. Alterações celulares reativas a inflamação ou a cálculos são responsáveis pela maioria dos diagnósticos falsos positivos nos espécimes urinários (DE VOOGT et al., 1977). Pode ocorrer hiperplasia reativa do epitélio de transição, com grande esfoliação

celular e até mesmo metaplasia escamosa. Esta ocorre também por estímulo hormonal ou na infecção pelo *Schistosoma haematobium*.

Fragmentos papilíferos presentes na citologia urinária precisam ser cuidadosamente estudados e não considerados simplesmente como carcinoma papilífero, a menos que as células exibam algum grau de anaplasia.

Infeções virais também entram no diagnóstico diferencial de malignidade como a infecção pelo *Herpes virus*, o *Citomegalovirus* ou o *Polyoma virus*, especialmente em pacientes transplantados e/ou imuno-deprimidos. Na infecção pelo *Polyoma virus*, os núcleos dos virócitos são marcadamente hipercromáticos e podem facilmente ser confundidos com núcleo maligno, se a perda da textura da cromatina não é notada.

O efeito de radiação em células uroteliais é comparável ao que é visto em citologia cervical. As alterações incluem alargamento celular e nuclear, alterações na forma (célula em girino e em fibra), vacuolização, eosinofilia do citoplasma e efeito de "dois em um" do citoplasma, núcleos múltiplos, alargamento e forma anormal do nucléolo. Tais modificações podem ser vistas em células benignas ou malignas, não havendo influência na relação núcleo/citoplasma nem alterações grosseiras na cromatina. Muitas degeneram e o sedimento pode conter numerosas células necróticas, com núcleo picnótico. Em alguns casos, é difícil ou impossível diferenciar entre alterações da irradiação em células uroteliais benignas e as alterações das neoplásicas verdadeiras. O estudo da textura da cromatina e a determinação da relação núcleo/citoplasma é de grande ajuda na diferenciação entre as mesmas.

Quimioterápicos podem causar "atipia" celular que pode desaparecer após cessada a terapia ou ser encontrada até um ano mais tarde. Essas drogas podem causar alterações comparáveis aos efeitos da irradiação como: formas predominantemente anormais (em girino, por exemplo), alargamento celular e nuclear, multinuclearidade e vacuolização do citoplasma. Entretanto, esses pacientes podem desenvolver câncer vesical infiltrativo.

1.2.3. CITOLOGIA NOS TUMORES UROTELIAIS PUROS

TUMORES PAPILÍFEROS DE BAIXO GRAU (papiloma e tumor papilífero grau 1 de KOSS): - Por definição, os tumores papilíferos de baixo grau são revestidos por urotélio normal ou levemente anormal. Dessa forma, teoricamente, as células deles derivadas não podem ser identificadas como malignas. Entretanto, pequenos agrupamentos celulares papilíferos podem, algumas vezes, ser observados em preparados de urina.

A cistoscopia aumenta o possível erro diagnóstico por alterações artefatuais. Instrumentação, cateterismo e manipulação simples da bexiga produzem agregados celulares que mimetizam os fragmentos teciduais destacados de tumores papilíferos de baixo grau (RIFE et al., 1979; KOSS et al., 1985).

A sensibilidade da citologia urinária para o carcinoma urotelial de baixo grau está entre 25% (VURAL et al., 1993) e 62% (MURPHY et al., 1984). Para VURAL et al. (1993), exames citológicos múltiplos podem aumentar-lhe a sensibilidade, mas uma citologia isolada é ferramenta diagnóstica pouco sensível na detecção da neoplasia urotelial bem diferenciada.

TUMORES PAPILÍFEROS DE ALTO GRAU (graus 2 e 3 de KOSS): - No sedimento urinário, células com características de malignidade podem ser encontradas, isoladas ou agrupadas. Geralmente o número de células malignas isoladas aumenta com o grau tumoral porque diminui a coesão intercelular, apresentando-se: nucléolos de contornos irregulares, cromatina distribuída irregularmente, cromatina grosseiramente granular, núcleos aumentados, borda nuclear proeminente, múltiplos nucléolos, núcleos degenerados e agrupamentos densos de células.

KOSS (1975) estabeleceu o mais útil indicador isolado para células uroteliais malignas, que é a cromatina em grânulos densos.

Nos tumores de grau 2, as células malignas são arranjadas principalmente em grupos papilíferos, com moderado índice de polimorfismo nuclear. Há pouca sobreposição nuclear, porém, esta não pode ser usada como critério diagnóstico de malignidade, porque também é vista em agrupamentos de células fixadas em álcool, nos tumores de grau 1. Os núcleos são ovais ou redondos, freqüentemente pálidos na coloração de Papanicolaou com clareamento e proeminente envelope nuclear, grumos de cromatina e a presença de mais de três (3) nucléolos é conspícua. A relação núcleo/citoplasma está alterada. As células malignas podem, ainda, ser reconhecidas como células de epitélio de transição ou uroteliais.

O diagnóstico de malignidade não é difícil nos tumores papilíferos de grau 3, sempre altamente anaplásicos, que apresentam células que freqüentemente menores e de configuração variável. Em muitas, os núcleos são grandes, hipercromáticos e freqüentemente sobrepostos. O fundo usualmente pode ser necrótico ou mostrar evidência de inflamação, mas isto não permite determinar se há ou não invasão tumoral. O tipo de grandes células pode conter células gigantes; a variante das pequenas apresenta células isoladas com anormalidades de formas nucleares (em batata ou com indentações) e nucléolo proeminente. As malignas não mais podem ser reconhecidas como células uroteliais.

CARCINOMA INTRA - EPITELIAL PLANO (CARCINOMA *IN SITU*): - O urotélio, apesar de plano, está espessado e as células epiteliais apresentam alterações como aquelas notadas no carcinoma de alto grau. As lesões podem ser observadas em qualquer parte do urotélio, de forma predominante nos ninhos de Von Brunn, e são, com freqüência, multifocais. Se deixadas sem tratamento, a infiltração da submucosa poderá ocorrer após algum tempo, variando de 10 a 70 meses. O diagnóstico histológico poderá ser errôneo se a biópsia for tomada de uma área desnuda, não profunda o suficiente e não contendo os referidos ninhos. A coesão celular fica diminuída, o que contribui para uma alta porcentagem de diagnóstico citológico positivo correto.

O carcinoma (Ca) *in situ* tem uma apresentação citológica característica, com células hipercromáticas pequenas e uniformes, geralmente o fundo não apresenta necrose e os leucócitos raramente são observados. O sedimento de urina espontânea é o meio ideal para o diagnóstico primário de Ca plano *in situ*.

CARCINOMAS UROTELIAIS SÓLIDOS, INVASORES: -São usualmente de células transicionais indiferenciadas, que podem ser grandes ou pequenas. Os carcinomas invasivos podem apresentar células idênticas às do Ca *in situ*, que, entretanto, em geral, são de variados tamanhos, de configuração irregular, com escasso citoplasma e núcleo proeminente e hipercromático. O grau de anormalidade e a freqüente variação na aparência das células sugerem carcinoma invasor. A presença de células queratinizadas isoladas não é incomum, é um componente habitual do carcinoma invasor, além de ter evidências de inflamação e/ou necrose.

1.2.4. ACURÁCIA, ESPECIFICIDADE e SENSIBILIDADE - REVISÃO da LITERATURA.

O exame citológico de urina é altamente sensível para detecção de células malignas, segundo KOSS (1992). Para ALÓS et al. (1995), o valor preditivo positivo para tumores recorrentes iniciais é de 90% nos lavados vesicais pós-cirúrgicos. A especificidade varia de 89,4 (SACK et al., 1995) a 95,4% (FARROW, 1992).

Reverendo a literatura podemos observar:

SENSIBILIDADE- (V. P.)- 62,7% (SACK et al., 1995);

NOS DE BAIXO GRAU-25 a 30% (VURAL et al., 1993) a 62% (MURPHY et al., 1984);

NOS DE ALTO GRAU-50 a 60% (PIATON et al., 1993) a 90,5% (SACK et al., 1995)

ESPECIFICIDADE:- (V. N.)- 95,4% (FARROW, 1992) e 89,4% (SACK et al., 1995).

VALOR PREDITIVO NEGATIVO:- 93% (ALÓS et al., 1995);

ACURÁCIA:- 71,6% (UMIKER, 1964) (de 26 a 100%, em revisão);

78%-P/ DE B. G. e 91%-P/ A. G. (ESPOTI & ZAJICEK, 1972);

FALSOS POSITIVOS, em reacionais-11% (KANNAN & BOSE, 1993).

O grande valor preditivo de um resultado positivo em citologia urinária, assim como a influência do grau tumoral e modo de terapia, na acurácia diagnóstica da mesma foram demonstrados por WIENER et al. (1993). A acurácia da urocitologia diferiu claramente entre pacientes tratados e não tratados, com tumores de alto e baixo graus. A alta frequência de diagnósticos citológicos de atipia em espécimes de pacientes sob quimio e radioterapia, reflete os problemas diagnósticos. A porcentagem de diagnósticos errados, quando não subdivididos de acordo com o grau tumoral, variou de 29% em pacientes não tratados para 56% em pacientes com quimioterapia prévia. A acurácia total em casos pré-tratamento foi de 71,4%, após qualquer espécie de terapia cirúrgica foi de 47,25%; durante ou após radioterapia, de 50,0% e de 44,1%, durante ou após quimioterapia. Qualquer espécie de terapia reduz a eficácia do exame citológico, porém, o grau tumoral é o parâmetro mais importante na interpretação citológica.

KOSS et al. (1985) e WIENER et al. (1993) mostraram maior acurácia diagnóstica em tumores de alto grau e menor, em tumores de grau I com invasão máxima limitada à lâmina própria. Isto pode ocorrer antes, durante ou após tratamento.

Os resultados de DiBONITO et al. (1992), em correlações cito-histológicas, confirmam que a citologia tem diagnósticos extremamente variados no carcinoma de epitélio de transição da bexiga urinária. Os autores obtiveram as seguintes médias de correlações: para o grau 1, 20%; para o grau 2, 61,7%; para o grau 3, 92,8%. Subdividindo-se o grau 2 em a e b pelo pleomorfismo, polaridade nuclear e outras irregularidades celulares, foram obtidas correlações em 33% dos casos do grau 2a (6/18) e em 79% dos casos, 2b (23/29).

O valor positivo da citologia do lavado vesical pós-cirúrgico para prever recorrência precoce de carcinoma urotelial vesical foi determinado por ALÓS et al. (1995). Concluem os autores, que o método é útil, entretanto, pode apresentar alguma dificuldade diagnóstica com as verdadeiras alterações reacionais que as células uroteliais podem apresentar.

Em um estudo do valor diagnóstico de citologia de lavado vesical, com especial referência à neoplasia urotelial de baixo grau, são discriminadas as possíveis razões para os resultados falsos negativos: escassez e degeneração celular, inflamação ou hemorragia e volume insuficiente do lavado obtido. Para os resultados falsos positivos, as possíveis razões seriam: degeneração celular urotelial, atipia reacional associada a marcada inflamação, fragmentos degenerados do estroma e células tipo parabasais reativas (SACK et al., 1995).

1.3. SOBRE AS REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEARES

¹ VALENTIN (1839) denominou de nucléolo a estrutura celular já descrita por ² FONTANA (1781). Há muito tempo já se tinha evidência de que os nucléolos eram particularmente proeminentes em células com alta atividade de síntese de proteínas. Os estudos sobre a composição nucleolar datam do início do nosso século, quando ³ RUSICKA (1899) e ⁴ SIMARRO (1900) descrevem a reação de impregnação pela prata no núcleo e ⁵ CAJAL (1910) relata a presença de grânulos argentofílicos no nucléolo.

⁶ HEITZ (1931) e ⁷ McCLINTOCK (1934) descreveram, pela primeira vez, regiões organizadoras nucleolares (NORs) em células vegetais, como regiões cromatínicas durante a reforma do nucléolo na telófase.

Atualmente, os conhecimentos sobre o nucléolo já estão relativamente definidos e estudados no que diz respeito a sua morfologia, à microscopia óptica e à ultra-estrutura, composição química e função.

¹ VALENTIN (1839) apud MELLO, M.L.S. Nucléolo-Estrutura-Ultra-Estrutura e Composição. A Biogênese de ribossomos e outras funções. In: *Biologia Celular*. VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. (ed.). São Paulo. Atheneu. 1987. p.184-95.

² *FONTANA (1781) apud MELLO, M.L.S. Nucléolo-Estrutura-Ultra-Estrutura e Composição. A Biogênese de ribossomos e outras funções. In: *Biologia Celular*. VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. (ed.). São Paulo. Atheneu. 1987. p.184-95.

³ *RUSICKA (1899) apud SCHWARZACHER, H.G. & WACHTER, F. The nucleolus. In: *Anatomy and Embriology*. Berlin. Springer-Verlag; 1993; p 515-35.

⁴ *SIMARRO (1900) apud SCHWARZACHER, H.G. & WACHTER, F. The nucleolus. In: *Anatomy and Embriology*. Berlin. Springer-Verlag; 1993; p 515-35.

⁵ *CAJAL (1910) apud SCHWARZACHER, H.G. & WACHTER, F. The nucleolus. In: *Anatomy and Embriology*. Berlin. Springer-Verlag; 1993; p 515-35.

⁶ *HEITZ (1931) apud DERENZINI, M. & PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cell. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32: 149-92, 1991.

⁷ *McCLINTOCK (1934) apud DERENZINI, M. & PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cell. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32: 149-92, 1991.

O número, tamanho e forma do nucléolo variam em função do organismo, tipo celular e estado funcional da célula.

Segundo SCHWARZACHER & WACHTLER (1993), os nucléolos vão-se modificando de acordo com o seu estado funcional, o que permite a sua classificação em três tipos: anular, reticulado e compacto. O nucléolo anular é visto em células com baixa atividade na biogênese de ribossomos, tendo um centro fibrilar pequeno, envolto por pequena zona de componente fibrilar denso e de componente granular. Já nas células com muita atividade em biogênese ribossômica são observados tanto os nucléolos reticulados como os compactos, tendo estes maior número de centros fibrilares. De acordo com o tecido estudado, observam-se variações, por exemplo, células sintetizadoras ou secretoras de proteínas, que em rápida divisão podem apresentar os três tipos de nucléolo.

Durante a interfase o número de nucléolos varia, em células humanas, de acordo com a fase do ciclo celular em que se encontram (GOESSENS, 1984).

À microscopia eletrônica o nucléolo é constituído por: 1 - centros fibrilares, 2 - componente fibrilar denso, 3 - componente granular, 4 - cromatina condensada associada e 5 - interstício nuclear (GOESSENS, 1984; ALBERTS et al., 1994).

- 1 - Os centros fibrilares são constituídos por material fibrilar frouxo, de densidade moderada, envolvidos por anéis espessos de material fibrilar denso e que correspondem aos organizadores nucleolares. Fazem parte da sua composição: proteínas não-histonas, em especial as proteínas argirofílicas (NORAPs), as enzimas envolvidas na formação dos componentes ribossomais maduros do RNA e lípidos.
- 2 - O componente fibrilar denso é composto de fibras de aproximadamente 4 nm de diâmetro, associadas aos centros fibrilares, o que sugere uma relação funcional entre os dois componentes. Apresentam regiões de alta densidade, exibindo um aspecto reticulado. Através da digestão com RNase foi constatada a presença de RNA no componente fibrilar, além de DNA e de proteínas ácidas argirofílicas demonstradas após a coloração pela prata, as NORAPs.

- 3 - O componente granular contém numerosas partículas de 15 a 20 nm de diâmetro, irregularmente distribuídas pelo nucléolo, ao redor ou entre o componente fibrilar. Os grânulos são compostos por ribonucleoproteínas (RNP) e formam-se próximos ao componente fibrilar; em seguida são liberados como partículas pré-ribossomais e, finalmente, transportadas ao citoplasma como subunidades ribossomais. Nessa região não ocorre reação com o nitrato de prata.
- 4 - Rodeando a massa nucleolar está o interstício, que forma áreas esféricas claras, de baixa densidade. Seus grânulos parecem corresponder a partículas pré-ribossomais maduras, que são estocadas e transportadas nesse interstício.
- 5 - A cromatina associada ao nucléolo separa o corpo nucleolar do nucleoplasma e é composta de filamentos conectados a alças de cromatina intranucleolar, que penetram no corpo nucleolar, assim como, mantêm uma ligação com os centros fibrilares.

É no componente fibrilar denso do nucléolo que ocorre a transcrição do DNAr em RNAr. O centro fibrilar mostra marcação, usando-se uridina radioativa, somente na sua periferia, no limite com o componente fibrilar denso (HERNANDEZ-VERDUN et al., 1980). Ambos constituem uma unidade funcional e, portanto, não podem ser dissociados (GOESSENS, 1984). Assim, a unidade fibrilar e o componente granular constituem a chamada "região organizadora do nucléolo" (NOR).

HSU et al. (1975) demonstrou essas regiões pela metodologia de hibridização *in situ*. As NORs contêm alças de DNA ribossomal (DNAr) que transcrevem para RNA ribossomal (RNAr) sob a influência da RNA polimerase.

As NORs correspondem às constrições secundárias dos braços curtos, de cinco (5) cromossomos acrocêntricos humanos, os de número 13, 14, 15, 21 e 22 (HOWELL, 1982). As NORs variam em tamanho e forma, de acordo com a transcrição nucleolar e estão intimamente relacionadas com o ciclo celular (GOESSENS et al., 1987). Podem estar relacionadas com a proliferação ou ploidia em algumas circunstâncias (DERENZINI et al., 1989). Teoricamente, vinte (20) sítios de AgNORs são demonstráveis no núcleo

humano diplóide, antes da mitose, após a síntese de DNA, quando está duplicado o material genético (UNDERWOOD, 1990; LIPPONEN et al., 1991; EGAN & CROCKER, 1992). UNDERWOOD & GIRI (1988) referem que os citogeneticistas freqüentemente observam vinte (20) NORs, porque elas ocorrem aos pares, uma em cada cromátide irmã, nos cinco (5) cromossomos acrocêntricos.

No entanto, há autores que referem que, em células normais, as NORs estariam unidas dentro de um (1) ou dois (2) nucléolos evidentes, em preparados citológicos ou histológicos e as AgNORs individuais não estariam distintas. Também consideram que o número de AgNORs detectável dependeria de vários fatores: do nível de atividade de transcrição, do número de cromossomos contendo NORs (a ploidia da célula), do estágio do ciclo celular observado e do grau de proliferação. Quando é muito intensa, diminui a associação das NORs (UNDERWOOD & GIRI, 1988; DERENZINI et al., 1989).

As NORs têm grande afinidade com a prata, devido à presença de proteínas não-histonas associadas ao rRNA recém-transcrito, que são as proteínas AgNORs associadas (NORAPs) (HOWELL et al., 1975). As grandes subunidades de RNA polimerase I (RPI) seriam as responsáveis pela argirofilia das NORAPs, assim como as fosfoproteínas C₂₃ (nucleolina) e B₂₃ (numatrina) (DERENZINI et al., 1990; EGAN & CROCKER, 1992). SCHWARZACHER & WACHTLER (1993) citam também a DNA topoisomerase (topoisomerase I) que descondensa o DNA durante a transcrição e a fibrilarina e a ribogranulina, que seriam importantes fatores para o processamento do RNAr.

A técnica AgNOR é muito específica para detectar as NORs (CROCKER et al., 1989). Esta especificidade tem sido confirmada por meio de estudo ultra-estrutural e também usando sondas fluorescentes para os grupos sulfidríla, dissulfeto e carboxila. Há coincidência entre a localização da argirofilia e a localização dos anticorpos fluorescentes para NORAPs (CROCKER et al., 1989). Portanto, as AgNORs são coincidentes com os grupos dissulfeto e sulfidríla nas proteínas AgNORs associadas, assim como, com os grupos carboxila e seus fosfatos (EGAN & CROCKER, 1992).

Não está bem esclarecida a função das proteínas AgNORs: alguns autores defendem que elas estariam envolvidas na montagem, agrupamento e processamento do RNA pré-ribossomal, já que estão associadas ao RNAr recém-transcrito (pré-RNAr nascente). A grande produção de proteínas NOR-associadas ocorre na interfase, acompanhando a síntese do RNAr na fase G₂, do ciclo celular (PLOTON et al., 1985). Elas seriam responsáveis pela transferência de partículas de ribonucleoproteínas do componente fibrilar, para o componente granular do nucléolo, ou fariam parte do complexo de transcrição do DNAr em RNAr. Recentemente, demonstrou-se que essas proteínas têm uma função estrutural, estando provavelmente envolvidas com a manutenção da cromatina ribossomal na configuração distendida, o que favorece o fenômeno da transcrição (HERNANDEZ-VERDUN et al., 1984). Sabe-se que a estrutura terciária das proteínas AgNORs seria dada pelos grupos sulfidríla, carboxila e fosfato. A nucleolina poderia controlar a transcrição dos genes ribossomais pela modificação do seu estado fosforilativo (DERENZINI et al., 1990; DERENZINI & PLOTON, 1991). Portanto, as proteínas associadas às NORs têm função transcricional, estrutural, de maturação e de montagem das subunidades pré-ribossômicas.

As AgNORs podem apresentar três tipos de configuração. Na primeira delas, em células com a atividade transcricional baixa, as NORs estão agregadas, formando uma estrutura arredondada e solitária, correspondendo ao próprio nucléolo, onde, ultra-estruturalmente, pode ser observado um pequeno centro fibrilar circundado por pouco material fibrilar denso, devido à pequena quantidade de RNP ribossomal processada e escasso componente granular. As NORs também podem ser vistas, num segundo tipo, dentro do nucléolo, como pontos corados inseridos numa matriz nucleolar e indicativo de estar iniciando-se a atividade transcricional. O componente fibrilar denso forma uma grande rede, provavelmente correspondendo à NOR totalmente distendida e os centros fibrilares são muito pequenos ou totalmente ausentes. E, finalmente, correspondendo à alta atividade transcricional, as NORAPs podem apresentar-se como vários pontos compactos distribuídos pelo núcleo, correspondendo a numerosos centros fibrilares rodeados por

material fibrilar denso, nos quais as NORs distendidas estão localizadas (SCHWARZACHER et al., 1978; CROCKER et al., 1989).

Causa dificuldade na sua enumeração essa heterogeneidade de apresentação das AgNORs. Segundo CROCKER et al. (1989), podem-se contar todas as estruturas coradas, mas, quando agrupadas em um "cluster", devem ser consideradas como uma única estrutura ou, cada AgNOR, como uma unidade ou um ponto corado, independentemente de estar localizado dentro ou fora do nucléolo.

Em patologia tumoral, foi demonstrado por RÜSCHOFF et al. (1989) que, além do número médio de AgNORs, a área média ocupada e a sua distribuição eram significativas para o diagnóstico de malignidade. DERENZINI et al. (1989) observou AgNORs numerosas, heterogêneas em tamanho e distribuídas irregularmente, em neoplasias.

Independente da sua interpretação, a avaliação das AgNORs tem sido aplicada no diagnóstico e é considerada uma técnica marcadora de malignidade, sendo útil para a diferenciação de células neoplásicas malignas, em cortes histológicos e em preparados citológicos (RÜSCHOFF et al., 1989 1993; TREVISAN, SOUZA, MAGNA, 1993; TREVISAN, 1995). A técnica AgNOR pode ajudar a discriminar entre benigno e maligno e entre baixo e alto grau, por exemplo, em linfomas ou em carcinomas. Potencialmente, alterações qualitativas e quantitativas das NORs, na interfase, podem ser relacionadas à atividade proliferativa e sua avaliação poderia auxiliar no diagnóstico e prognóstico de neoplasia maligna (ANONYMOUS, 1987; CROCKER & NAR, 1987; EGAN et al., 1987; AYRES et al., 1988; CROCKER & McGOVERN, 1988; DERENZINI et al., 1987; 1988; 1989; UNDERWOOD & GIRI, 1988; WALKER, 1988; BOLDY et al., 1989; CAIRNS et al., 1989; CROCKER & EGAN, 1989; RÜSCHOFF et al., 1989; 1990a; CROCKER, 1990; 1992; CLEMENT et al., 1991; COLECHIA et al., 1991; LEEK et al., 1991; TREVISAN et al., 1993; TREVISAN, 1995).

A valorização das NORs da interfase tem sido usada como uma "nova" arma que pode ajudar quantitativamente e semi-quantitativamente o patologista no diagnóstico de malignidade (ANONYMOUS, 1987).

1.3.1. A TÉCNICA AgNOR

A técnica AgNOR é baseada na impregnação, pela prata, das proteínas ácidas não histonas associadas à região organizadora nucleolar e, indiretamente, das AgNORs. Essa argirofilia atua como um marcador do nível de transcrição DNA ribossomal. Ela é, há muito tempo, conhecida pelos citogeneticistas na investigação da banda NOR nos cromossomos dos grupos D e G, sofreu modificações e tem sido utilizada por patologistas, principalmente para diagnóstico de malignidade e diagnóstico diferencial, graduação e prognóstico das neoplasias.

CITOQUÍMICA E OBSERVAÇÃO DAS NORs - No início, os métodos de demonstração das NORs foram realizados em cromossomos metafásicos espalhados para estudos citogenéticos e posteriormente adaptados para estudo citológico e/ou de tecidos preparados para observação em microscopia óptica ou eletrônica. Para uso geral, o método argirófilo "AgNOR" encontrou aceitação; é simples, reprodutível e considerado específico para demonstração de NORs. Ele demonstra pontos ou agrupamentos de pontos prata-positivos intranucleolares, que se podem apresentar com número, forma e tamanho variados, permitindo uma análise quantitativa, qualitativa morfológica ou morfométrica dos mesmos. Técnicas de análise de imagem computadorizadas também podem ser empregadas com padronização da contagem e avaliação da área das NORs por núcleo (RÜSCHOFF et al., 1989; 1990c; 1993).

Na técnica de um passo, o nitrato de prata e o ácido fórmico são misturados em diluições apropriadas, como colocado no capítulo de material e métodos. Basicamente a reação se processa numa fase de impregnação pela prata metálica e noutra, pela revelação com um agente redutor, como a amônia e/ou o ácido fórmico e a gelatina, um estabilizante

colóide da reação. O componente responsável pela redução dos íons prata (Ag^+) em prata metálica (Ag^0) parece ser o grupo carboxila das proteínas ácidas (SMITH et al., 1988).

A reação AgNOR foi descrita primeiramente por GOODPASTURE & BLOOM (1975), subseqüentemente foi abreviada para um passo por HOWELL & BLACK (1980) e modificada por PLOTON et al. (1986), quando passou a ser feita à temperatura ambiente.

MECANISMO - O processo ocorre essencialmente em dois estágios, semelhante a um procedimento fotográfico. Primeiro, núcleos submicroscópicos de íons prata depositam-se nos sítios reativos no nucléolo; se existe um suficiente potencial redox, isso será seguido por aglutinação de mais prata sobre as primeiras, na presença de um agente redutor, como uma solução de formaldeído. Isso resulta em pontos de cor preta à microscopia de luz. No estudo da química da reação de AgNOR, a extração da histona não tem nenhum efeito na seqüência da técnica AgNOR. Em compensação, tratamentos proteolíticos e oxidativos eliminam a capacidade de reação pela prata.

FATORES QUE INFLUEM NO RESULTADO FINAL - O sucesso da técnica depende de vários fatores que influem nos resultados e que atuam antes e durante a aplicação da técnica de AgNOR. Entre eles estão a natureza do material, a falta da pré-incubação com a solução fixadora, a concentração inadequada do sal de prata, a presença de grande quantidade de precipitado de gelatina ou de prata no fundo do material a ser examinado, além do tempo insuficiente ou exagerado de coloração.

Segundo RÜSCHOFF et al. (1990b), problemas técnicos, como o tempo de coloração excessivo, podem alterar os resultados da análise quantitativa e diminuir as diferenças entre as lesões benignas e malignas, já que aumentariam as áreas coradas no nucléolo. Outro fator a ser considerado, na análise dos resultados, diz respeito à metodologia empregada. Há várias maneiras de observar os pontos corados: pela microscopia comum com objetiva de 40x, por imersão, ou por imagens fotografadas de microscopia óptica comum, o que facilita a posterior comparação de diferentes campos:

A) **FIXADORES** - Certos fixadores são extremamente deletérios para a técnica AgNOR como, por exemplo, o ácido pícrico e os fixadores que contêm mercúrio (SMITH et al., 1988). SMITH et al. (1988), em um estudo com quatoze (14) diferentes fixadores, concluiu que os alcoólicos davam bons resultados, que eram obtidos também com fixação em formol neutro a 10% tamponado. O fixador histológico de rotina, formol a 10%, dava resultados adequados, assim como os preparados congelados e a fixação em microondas. Sabe-se que a formalina, que constitui pontes-metila entre grupos sulfidríla e carboxila adjacentes, pode inibir a reação com a prata. A lavagem com álcool quebra essas pontes, deixando os grupos ativos disponíveis para os íons metálicos.

A coloração seqüencial com reagentes imuno-histoquímicos não produz efeito adverso no resultado final da técnica AgNOR (EGAN & CROCKER, 1992).

DERENZINI & TRÈRE (1991) observaram melhores resultados em cortes histológicos incluídos em parafina, quando fixados em etanol ou líquido de Clark (3 volumes de metanol : 1 volume de ácido acético); porém, formol ou fixador Bouin produziram resultados menos intensos e menos específicos de impregnação das NORs.

A abundância de AgNORs não tinha relação com proliferação celular nem com o prognóstico, em material de arquivo, rotineiramente fixados pela formalina, em cem (100) carcinomas retais (GRIFFITHS et al., 1989).

A fixação pelo formaldeído, sozinha, resulta em reação inespecífica e o uso isolado do ácido acético vai impedi-la por causa da solubilização das proteínas AgNORs (DERENZINI & PLOTON, 1991). Usa-se a mistura de um (1) volume de ácido acético para três (3) de etanol (ou metanol), para solubilizar qualquer outra proteína que possa ligar-se à prata.

B) TEMPERATURA e TEMPO - O tempo de reação e a temperatura estão intimamente relacionados com a velocidade desejada de revelação e o nível aceitável de "background" ou de precipitados. O aumento da temperatura implica na diminuição do tempo necessário para a impregnação seletiva das NORs (DERENZINI & PLOTON, 1991).

C) OUTROS FATORES QUE INFLUEM NO RESULTADOS FINAL - Tumores com população celular muito heterogênea ou a espessura dos cortes histológicos examinados são dois fatores que também podem interferir no produto final, principalmente na reprodutibilidade dos resultados.

Valores de AgNORs citológicas são maiores que os obtidos de cortes histológicos (AYRES et al., 1988; RÜSCHOFF et al., 1989).

Segundo CROCKER et al. (1989), o erro intra e interobservador, na avaliação final numérica das AgNORs, isto é, a diferença percentual entre a contagem das médias, varia de 2 a 7 %, o que é aceitável para a maioria de tecidos ou tumores.

VANTAGENS DA TÉCNICA AgNOR

RÜSCHOFF (1993) afirma que os seus achados em relação a AgNORs são similares aos de imunocitoquímica com Ki 67. Entretanto, a técnica AgNOR tem mais vantagens porque: a) a técnica é rápida e facilmente realizável e b) um número relativamente menor de células permite resultados satisfatórios. O autor investigou somente trinta (30) núcleos malignos, obtendo alta sensibilidade e especificidade pela contagem e medida da área de AgNORs.

Em relação ao valor diagnóstico, a análise de AgNORs isolada foi tão sensível quanto à imunocitoquímica e mais vantajosa que a análise de DNA. A imunocitoquímica tem alta acurácia se for aplicado um painel de anticorpos. Na citometria para DNA, de fluxo ou de imagem, o critério de malignidade útil, a aneuploidia, pode ser demonstrado em 85% das efusões positivas. Tem sido demonstrado que uma combinação destas duas

em cerca de 17 a 20% das citologias inconclusivas ou positivas. Quase idêntica porcentagem foi obtida com a técnica AgNOR sozinha. O mais sensível e específico parâmetro foi o índice AgNOR, definido pelo quociente da média da área AgNOR, em presumíveis células tumorais (ANORT) e em linfócitos pequenos (ANORT_{LI}). Ao contrário da contagem média pelo olho, o referido índice é muito mais fácil e rapidamente estabelecido pela análise de imagem digital (RÜSCHOFF, 1993).

1.3.2. APLICAÇÃO DA TÉCNICA AgNOR EM UROPATOLOGIA - (VALOR PARA DIAGNÓSTICO EM BEXIGA URINÁRIA)

Tem sido estudado o valor diagnóstico desta técnica, como também para graduação e prognóstico, tanto pela contagem como pela análise morfométrica, em cortes histológicos de bexiga urinária (CAIRNS et al., 1989; OOMS & VELDHWIZEN, 1989; MANSOUR et al., 1990; TAKEUCHI et al., 1990; 1991; CLEMENT et al., 1991; KODOUSEK & DUSEK, 1991; LIPPONEN et al., 1991; HANSEN et al., 1992; MARANDOLA et al., 1992; MARTIN et al., 1992; RÜSCHOFF, 1992; SKOPELITOU et al., 1992; LIPPONEN & ESKELINEN, 1991 e 1992; RÜSCHOFF et al., 1992; COHEN et al., 1993; HELPAP & LOSEVITZ, 1993; LIMAS et al., 1993; LIPPONEN, 1993).

Em tumores papilíferos vesicais (RÜSCHOFF et al., 1989) e também nas displasias (RÜSCHOFF et al., 1992), a técnica AgNOR tem valor diagnóstico. Os autores concluem, em estudo morfométrico, que a análise de imagem de AgNORs contribui para a discriminação útil dos graus altos de displasias planas e na graduação de malignidade em lesões uroteliais papilíferas vesicais. Lesões benignas e malignas poderiam claramente ser separadas pelo número médio das AgNORs/célula, assim como pela área média das AgNORs. Ambos os parâmetros estavam inversamente correlacionados ($r=0,69$ e $p<0,001$). Também, a análise das AgNORs é um instrumento diagnóstico valioso para uma precisa discriminação entre as alterações displásicas intra-epiteliais, de baixo e alto grau.

LIPPONEN et al. (1991) relacionou o número de AgNOR com atividade proliferativa e malignidade em câncer vesical.

O número total e o número de AgNORs dispersos está significativamente relacionado com a graduação histológica e o estágio clínico (KODOUSEK & DUSEK, 1991), principalmente nos tumores de alto grau de malignidade (LIPPONEN & ESKELINEN, 1992).

A avaliação das AgNORs é considerada por MARANDOLA et al. (1992) como o novo marcador para detecção precoce e indicador de progressão do câncer de bexiga urinária, em avaliação semi-automática de cortes de material embocado em parafina e que também poderia ser reprodutível em citologia urinária, principalmente em tumores de baixo grau de malignidade, reduzindo o número de falsos negativos. Para MASUDA et al. (1994), a opinião é a mesma, em estudos onde se observaram 83% de sensibilidade da técnica AgNOR e 90% de especificidade, em material urocitológico.

O número e área de AgNORs são maiores com o agravamento do grau tumoral. A investigação em cortes de parafina encontrou aumento estatisticamente significativo no número e área de AgNORs, em relação aos graus progressivamente maiores de malignidade (MARTIN et al., 1992).

A graduação dos tumores uroteliais, através da técnica AgNOR, é limitada, segundo MANSOUR et al. (1990) e não recomendada por outros autores (LIMAS et al., 1993; HELPAP & LOSEVITZ, 1993; MASUDA et al., 1994).

Entretanto, para alguns pesquisadores, esta técnica tem valor diagnóstico limitado (LIPPONEN & SKELINEN, 1992, OOMS & VELDHUIZEN, 1989). OOMS & VELDHUIZEN (1989), em cortes histológicos de tumores vesicais, concluíram que somente a contagem das partículas coradas pela prata tinha valor limitado na graduação dos tumores vesicais e que este método não era superior a outras técnicas adicionais de graduação, como histomorfometria e citometria de fluxo para tais neoplasias. Para

KODOUSEK & DUSEK (1991), as AgNORs não são marcadores específicos oncológicos pois o método não poderia reconhecer células neoplásicas como tal.

A técnica AgNOR não é útil para o diagnóstico diferencial nas proliferações da mucosa vesical, segundo CAIRNS et al. (1989). Os autores avaliaram as variações de AgNORs em condições benignas e malignas do urotélio, em cortes histológicos (n: 39) e observaram que, enquanto há uma separação estatística significativa entre grupos normais e neoplásicos, há um grau de superposição entre o urotélio normal, inflamatório, displásico e neoplásico.

A enumeração das AgNORs poderia refletir a natureza proliferativa das lesões vesicais induzidas pelo carcinógeno BBN, em experimentos com ratos. Avaliando AgNORs em mucosa de bexiga normal e em tumores uroteliais induzidos pelo carcinógeno N-butyl-N (4 - hydroxybutyl) nitrosamina (BBN), foram encontraram valores crescentes de AgNORs diretamente relacionados à gravidade da lesão ou à piora do grau histológico tumoral (TAKEUCHI et al., 1990).

1.3.3. APLICAÇÃO DA TÉCNICA AgNOR EM UROCITOLOGIA

A avaliação citológica das AgNORs no diagnóstico de malignidade é útil e pode ser usada rotineiramente, porque esse método é barato, fácil e de pouco tempo de execução (AYRES et al., 1988; BOLDY et al., 1989; DERENZINI et al., 1989; RÜSCHOFF et al., 1989; BARSOTTI et al., 1990; COLECHIA et al., 1991; COLECHIA & LEOPARDI, 1992; TREVISAN et al., 1993; CARRILO et al., 1994; TREVISAN, 1995). AgNORs, em efusões peritoneais, foram analisadas em microscopia eletrônica por LIM et al., 1992.

Entretanto, poucos outros autores aplicaram a técnica AgNOR em preparados urocitológicos (RÜSCHOFF et al., 1989; TAKEUCHI et al., 1991; MASUDA et al., 1994 e ABENOVA et al., 1995), considerando-a útil no diagnóstico de células uroteliais carcinomatosas, com discutível aplicabilidade para graduação tumoral citológica e/ou prognóstico.

Refere-se a técnica AgNOR como marcadora de malignidade, com um considerável valor neste diagnóstico e também na graduação tumoral, em urocitologia (RÜSCHOFF et al., 1989).

A análise de imagem das AgNORs por computador, poderia oferecer um índice objetivo para definição da doença da bexiga urinária. Ainda, segundo TAKEUCHI et al. (1991), a técnica AgNOR é de grande valor para a rápida detecção de cânceres vesicais.

De acordo com MASUDA et al. (1994), não há diferença significativa entre as médias dos três diferentes graus histológicos, 1, 2 e 3. Porém, os pacientes do carcinoma de grau 2, com maiores números de AgNORs, mostravam uma tendência a ter a lesão mais difusa ou invasiva. Para os autores, o número de AgNORs tem valor preditivo do potencial maligno do tumor.

Para ABENOVA et al. (1995), o exame da atividade do organizador nucleolar, na determinação do grau do carcinoma de epitélio de transição, confirma que, nos processos de transformação tumoral, o número aumentado dos grânulos argirofílicos mostra maior atividade dos organizadores nucleolares das células tumorais, com perda da diferenciação.



2. OBJETIVOS

- 1 - Aplicar a técnica AgNOR em urocitologia.
- 2 - Contar e classificar morfológicamente as AgNORs de células uroteliais normais ou reacionais e carcinomatosas (análise quantitativa e qualitativa).
- 3 - Verificar o valor da técnica AgNOR para o diagnóstico citológico de tumores uroteliais vesicais.
- 4 - Verificar o valor da técnica AgNOR, no diagnóstico diferencial citológico, entre tumor urotelial de baixo grau e tumor urotelial de alto grau de malignidade.
- 5 - Verificar o valor da técnica AgNOR, no diagnóstico diferencial citológico, entre tumor urotelial de baixo grau de malignidade e células uroteliais reacionais.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Foram selecionados setenta (70) casos de exames de rotina de citologia oncológica urinária (urina ou lavado vesical), pareados com seus respectivos exames anátomo-patológicos de bexiga urinária, do Laboratório de Anatomia Patológica, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, de 1992 a 1994. Para avaliações diagnósticas tumorais foram aplicadas a graduação citológica de KOSS (1992) e a histológica de KOSS (1975).

O diagnóstico histológico foi o critério seletivo para os grupos estudados:

Grupo 1 - CONTROLE -vinte e seis (26) casos negativos para câncer vesical;

Grupo 2 -TUMOR DE BAIXO GRAU - dezenove (19) casos de tumor urotelial de baixo grau (compreendendo os tumores de graus 1 e 1-2 histológicos);

Grupo 3- TUMOR DE ALTO GRAU - vinte e cinco (25) casos de tumor urotelial de alto grau (compreendendo os tumores de graus 2, 2-3 e 3 histológicos).

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA:

POR IDADE

As idades variaram de 26 a 81 anos, no estudo todo, com idade média do grupo total de 56,92; desvio padrão de 19,76 (mediana: 63,00 e a moda: 66,00), sendo assim distribuídas:

Grupo 1: idade média de 43,30 anos (de 26 a 81 anos).

Grupo 2: idade média de 64,20 anos (de 45 a 78 anos).

Grupo 3: idade média de 65,60 anos (de 45 a 79 anos).

POR SEXO

Quanto ao sexo, no conjunto de setenta (70) casos, a distribuição foi treze (13) mulheres (18,6% do total) e cinquenta e sete (57) homens (81,4%):

1: n=9 do sexo feminino e n=17 (65,4%) do masculino;

2: n=4 do sexo feminino e n=15 (78,95 %) do masculino;

3: n=0 do sexo feminino e n=25 (100%) do masculino.

QUADRO CLÍNICO

Grupo 1:-TOTAL n=26

n=03-sem queixa urológica principal;

n=06-cistites de repetição;

n=17- hematúria a esclarecer.

Grupo 2: - TOTAL n=19

n=01- recidiva de tumor;

n=03- seguimento de Ca vesical tratado;

n=15- hematúria e/ou tumor vesical;

Grupo 3: -TOTAL n=25

n=01- sem informações;

n=01- tumor vesical em divertículo vesical;

n=02- recidiva de tumor vesical;

n=04- seguimento de Ca vesical tratado;

n=08- hematúria;

n=09- tumor vesical, de primeira vez.

Os dados clínicos acima foram obtidos com a ficha de dados, cujo modelo consta em ANEXO 1- Modelo de protocolo.

CITOLOGIA - O presente estudo compreende exames citológicos de urina espontânea ou do produto de lavado vesical de pacientes sintomáticos ou não. O material foi encaminhado, sem fixador, ao laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP- Faculdade de Ciências Médicas, onde foi conservado em geladeira até o momento do processamento. Deste produto foram obtidos sedimentos em citocentrífuga ou em centrífuga comum e com os quais se realizaram esfregaços em lâminas de vidro previamente albuminizadas.

O material sedimentado foi fixado em álcool a 96% e corado por hematoxilina-eosina.

BIÓPSIA - Os fragmentos da bexiga urinária são biópsias únicas ou múltiplas, multifocais, dirigidas para lesões tumorais ou suspeitas ou ao acaso, em regiões pré-determinadas pelo serviço de Urologia da UNICAMP (paredes laterais, fundo, trígono, uretra). Pode ser também o material cirúrgico de ressecção transuretral (RTU) de lesões vesicais, além de dois (2) casos de biópsias pós-morte (casos de autópsias do grupo controle). Os fragmentos foram fixados em formalina a 10%, processados para inclusão em parafina e também corados pela hematoxilina- eosina.

Para os diagnósticos foram usadas as seguintes classificações:

GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DE KOSS (1975):

Grau 1 - O aumento do volume nuclear é de leve a moderado e o hiperchromatismo, leve em algumas células. O epitélio tem mais de sete (7) camadas.

Grau 2 - O aumento do volume nuclear é de moderado a intenso e o hiperchromatismo, leve a moderado, em 25 a 50% das células.

Grau 3 - O aumento do volume nuclear é intenso, com grande variação de tamanho, e o hiperchromatismo é observado em 50% ou mais das células.

Obs: - A UICC (1978) inclui no grau 3 os tumores indiferenciados, isto é, aqueles que perderam as características da origem urotelial.

GRADUAÇÃO CITOLÓGICA (TUMORAL) UROTELIAL DE KOSS (1992):

TUMOR (PAPILÍFERO) DE BAIXO GRAU - compreendendo os tumores de graus 1 e 1-2, histológicos.

TUMOR (PAPILÍFERO) DE ALTO GRAU - compreendendo os tumores de graus 2, 2-3 e 3, histológicos.

3.2. MÉTODOS

a) PREPARAÇÃO - (do material citológico):

Os mesmos preparados de urocitologia por centrifugação, previamente corados pela hematoxilina-eosina, examinados e diagnosticados, foram descorados com uma solução álcool-acidulada (1 ml de ácido clorídrico puro em 100 ml de álcool a 70%) e, posteriormente, submetidos à impregnação pela prata, segundo a técnica de PLOTON et al. (1986).

b) IMPREGNAÇÃO ARGÊNICA:

Dois volumes de solução aquosa de AgNO_3 a 50%, em um volume de solução de gelatina a 2%, em ácido fórmico a 1%, por 30 minutos, em temperatura ambiente e câmara escura. Vejamos as fases de preparação:

TÉCNICA AgNOR - (PLOTON et al., 1986).

FASE 1 - PREPARO DAS SOLUÇÕES

Solução A - Nitrato de prata a 50% em água destilada.

Este procedimento deve ser executado no momento de uso da solução.

Solução B - Gelatina a 2% em solução de ácido fórmico a 1%.

A gelatina a 2% (2g /100 ml) é dissolvida em água destilada e a mistura é levada ao aquecimento, sem ebulição, para dissolução total. Após o resfriamento da mesma solução, acrescenta-se ácido fórmico a 1%.

FASE 2 - PROCEDIMENTO

Misturam-se duas (2) partes da solução A para uma (1) parte de solução B.

As lâminas são dispostas sobre um trilho suporte e cobertas pela mistura das soluções A e B, por 30 minutos, em câmara escura e à temperatura ambiente.

Lavagem cuidadosa em água destilada.

Desidratação e montagem com resina sintética.

Observe-se que não é realizada a contracoloração nuclear.

Resultado: pontos pretos ou estruturas acastanhadas no núcleo.

ANÁLISE QUANTITATIVA - CONTAGEM DE AgNORS - A avaliação foi realizada com objetiva de 40x. O exame das lâminas foi realizado em "leitura tipo varredura" sistemática, examinando-se o maior número possível de células por lâmina (mínimo de vinte (20) até o máximo de trezentas (300) células). Observar que a urina proveniente de paciente sem tumor vesical apresenta, normalmente, escasso número de células.

Como contamos as AgNORs? O número e a morfologia dos pontos ou áreas prata-positivos foram avaliados. Cada estrutura dentro do núcleo, os pontos (dots) ou os agrupamentos (clusters) individualizados (AgNORs) foram contados como unidade, independente do tamanho, conforme recomendação de CROCKER et al. (1989). Os resultados foram tabulados, calculando-se a média de AgNORs para cada caso, assim como a média e o desvio padrão para cada grupo.

ANÁLISE QUALITATIVA - As AgNORs foram classificadas, quanto ao padrão morfológico, em "homogêneas" ou "heterogêneas".

PADRÃO HOMOGÊNEO - São as estruturas nucleares puntiformes ou arredondadas e uniformes na forma e volume. A aparência dos pontos pretos é delicada, arredondada e de contorno liso.

PADRÃO HETEROGÊNEO - São as estruturas irregulares, de contornos sinuosos, com muita variação, na forma e tamanho, únicas ou múltiplas. Com aspecto grosseiro e sem apresentar uniformidade, podendo ser redondas, alongadas ou de formas bizarras, as AgNORs, por vezes, incluem material acastanhado na sua estrutura.

As análises quantitativas e morfológicas das AgNORs foram realizadas sem o conhecimento dos resultados citológico e histopatológico, do mesmo exame.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os métodos seguintes foram empregados com ajuda dos programas "Primer of bio-statistics" GLANTZ (1987) e o WINSTAT (1994), para a análise de significância estatística dos resultados. Os testes aplicados foram :

Testes não paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis.

Teste de Dunn.

Teste Qui-quadrado de aderência para comparações entre as curvas.

Teste de Qui-quadrado e testes de Fisher (com ajuste do erro alfa, segundo BORTZ et al., 1990).

Teste de correlação de dados por postos de Spearman.

Análise discriminatória (LACHENBRUCH, 1975 e programa WINSTAT, 1994)

Testes de correlação de Kendall e Kappa-ponderada (ANEXOS 3: 1 e 2).



4. RESULTADOS

Os dados numéricos obtidos com a contagem das AgNORs e sua respectiva avaliação morfológica constam da tabela 1 (a, b e c), com a relação geral da casuística e resultados.

4.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA

GRUPO 1: GRUPO CONTROLE - Para o grupo controle, com vinte e seis (26) casos, a média de AgNORs foi 2,33, o desvio padrão (SD)=0,3288, com uma variância de 14% e com padrão morfológico AgNOR tipo "homogêneo", em 100% dos casos (FIG. 1).

GRUPO 2: TUMORAL DE BAIXO GRAU - No grupo de tumores de baixo grau, com dezenove (19) casos, a média foi 5,07 para o número de AgNORs, SD=1,26 e padrão morfológico "homogêneo", em 79% (15/19) dos casos (FIGs. 2 e 3).

GRUPO 3: TUMORAL DE ALTO GRAU - Nos vinte e cinco (25) casos de alto grau, a média das AgNORs ficou em 8,73, SD=2,32 e, quanto à morfologia, 76% (19/25) eram de padrão "heterogêneo" (FIGs. 4 e 5).

GRUPO (2+3): TUMORAL GERAL - Para o grupo tumoral geral, a média das AgNORs foi 5,82, SD=2,2291, com uma variância de 39%, sendo 23/44 "heterogêneos" e 21/44, "homogêneos" quanto ao padrão morfológico.

Ver Gráfico 1, onde podemos observar a média do número de AgNORs por grupo 1, 2 e 3.

ERRO INTRA-OBSERVADOR - Houve uma diferença média, menor que 10% do número das AgNORs resultantes e sem discordância quanto ao padrão morfológico. (Foram reavaliados casos da amostra controle estudada).

TABELA 1a-RELAÇÃO GERAL da CASUÍSTICA e RESULTADOS do GRUPO 1- Controle (n: 26)

N	Citologia	Biópsia	idade	sexo	X	Ag (var)	NOR padr	ncc
1	C40331	B 75152- Cist.Crôn.Inesp.	--	M	1,80	1-3	hom	020
2	A 1	A 375- S/particularidades	43	M	1,84	1-5	hom	100
3	C1532	B4849- Cist.Crôn.Inesp.	56	F	1,88	1-4	hom	033
4	C40380	B75245- Cist.Crôn.Inesp.	--	M	1,96	1-6	hom	100
5	C37076	B61234- Cist.Crôn.Inesp.	68	M	2,05	1-4	hom	022
6	C40120	B74684- Cist.Crôn.Inesp.	38	F	2,06	1-4	hom	017
7	C 580	B2559/94-S/ particular.	81	F	2,10	1-4	hom	100
8	C39167	B71716- Cist.Crôn.Inesp.	--	M	2,10	1-4	hom	040
9	A 2	A379-S/ Particularidades	60	M	2,16	1-4	hom	050
10	C38533	B69415- Cist.Intersticial	54	F	2,17	1-4	hom	023
11	C36377	B71406- Cist.Crôn.Inesp.	29	M	2,20	1-3	hm	010
12	C41317	B77918- Cist.Crôn.Inesp.	77	M	2,23	1-5	hom	100
13	C3097	B 9608- Cist.Crôn.Inesp.	74	M	2,30	1-4	hom	050
14	C36072	B61235- Cist.Crôn.Edemat	33	F	2,39	1-4	hm	023
15	C 1287	B4125/9- Cist.Crôn.Inesp.	38	M	2,42	1-5	hom	100
16	C 3976	B12654- Bex. ni, Uretrite	66	F	2,45	1-5	hom	100
17	C 608	B 2097-Cist.Crôn.Inesp.	26	F	2,49	1-7	hom	100
18	C41324	B77904-Cist.Crôn.Inesp.	30	F	2,50	1-6	hom	100
19	C 816	B 2831- Cist. Intersticial	34	F	2,52	1-6	hom	050
20	C 480	B 1488- Cist.Crôn.Inesp.	65	M	2,52	1-5	hom	080
21	C36172	B61507-Cist.Crôn.Inesp.	30	M	2,60	1-4	hom	042
22	C 690	B2366-Cist.Crôn.Inesp.	75	M	2,63	1-6	hom	100
23	C 3969	B12644- Cist.Crôn.Inesp.	38	M	2,65	1-5	hom	100
24	C36496	B 61675-Cist.Crôn.Inesp.	54	M	2,80	2-4	hom	100
25	C39334	B72240-Cist.Crôn.Inesp.	34	M	2,89	1-5	hom	100
26	C37024	B 64234-Tec./ granulação	64	M	3,07	1-7	hom	054

A:autópsia; C:citologia; B:biópsia; M:masculino; F:feminino; X: média de pontos AgNORs por célula; var (v): variação; padr: padrão; hom:homogêneo; ncc:número de células contadas.

CONT. TAB. 1b-RELAÇÃO GERAL da CASUÍSTICA e RESULTADOS do GRUPO 2 - Tumores uroteliais de baixo grau (n: 19)

N	Citologia	Biópsia	idade	sexo	Grau	Est	X	Ag (var)	NOR padr	ncc
27	C 173-BG	B 528	53	M	1	0	2,90	(1-4)	het	020
28	C39565-BG	B72873	65	M	1	A	3,10	(2-6)	hom	100
29	C 987-AG	B 3184	78	M	1.2	0	3,20	(1-6)	hom	030
30	C40158-BG	B74970	50	M	1.2	A	3,57	(1-6)	hom	047
31	C35913-BG	B66147	56	F	1	A	4,20	(2-8)	hom	030
32	C 218-AG	B 546	74	M	1.2	A	4,57	(1-12)	het	200
33	C36109-AG	B61422	72	M	1.2	A	4,64	(2-15)	het	110
34	C 2792-BG	B8839	67	F	1.2	0	4,83	(2-9)	hom	100
35	C40020-POS	B74292	60	M	1	0	4,97	(3-9)	hom	100
36	C 354-BG	B71270	65	M	1	0	5,05	(2-11)	hom	056
37	C 1774-BG	B 5584	68	F	1	0	5,50	(2-12)	hom	110
38	C 1903-BG	B 5586	45	M	1	0	5,50	(3-12)	hom	200
39	C37989-BG	B66207	66	M	1	0	5,57	(3-10)	het	300
40	C2038-AG	B 6495	74	M	1.2	0	5,76	(3-11)	hom	200
41	C 1666-POS	B5342	63	F	1	0	6,04	(2-18)	hom	100
42	C 1155-BG	B 4298	63	M	1	0	6,32	(2-10)	hom	100
43	C38477-BG	B69322	57	M	1	A	6,42	(3-12)	hom	050
44	C37591-BG	B65703	77	M	1.2	0	6,80	(4-12)	hom	020
45	C2524-POS	B 7866	66	M	1.2	0	7,51	(3-25)	hom	190

AG:Alto Grau; BG:Baixo Grau; X: média de pontos AgNORs; var:variação mínima e máxima de pontos AgNOR; padr: padrão; hom:homogêneo; het:heterogêneo; ncc:número de células contadas; Graus de KOSS (1992): 1 e 1.2 (BG) 2, 2.3 e 3 (AG); Est: Estádio de JEWETT-STRONG/ MARSHALL (1962).

CONT.TAB. 1c -RELAÇÃO GERAL da CASUÍSTICA e RESULTADOS do GRUPO 3 - Tumores uroteliais de alto grau (n:25)

N	Citologia	Biópsia	idade	sexo	Grau	Est	X	Ag (var)	NOR padr	ncc
46	C40636-AG	B76071	72	M	2.3	B	3,42	(2-9)	het	060
47	C40823-BG	B76699	61	M	2.3	A	3,61	(1-12)	het	190
48	C37507-BG	B62815	39	M	2	A	3,64	(1-8)	het	090
49	C41071-AG	B77259	87	M	2	A	3,75	(2-16)	het	153
50	C41732-AG	B78947	72	M	2	B	4,20	(2-10)	het	050
51	C 219-AG	B 563	67	M	2.3	B	4,38	(1-12)	het	100
52	C40435-AG	B75483	56	M	2.3	B	5,24	(2-14)	hom	100
53	C35899-AG	B60825	57	M	2	0	5,67	(1-14)	het	100
54	C 138-POS	B 305	78	M	2.3	B	5,70	(3-20)	het	010
55	C40825-BG	B76702	79	M	2	B	5,77	(3-10)	hom	100
56	C 2414-BG	B 7534	78	M	2	A	5,90	(3-19)	hom	100
57	C40093-AG	B74571	60	M	2	B	6,69	(2-17)	het	100
58	C40530- BG	B75724	67	M	2	A	6,99	(1-21)	het	100
59	C 139-AG	B 305	71	M	2.3	B	7,03	(3-20)	het	100
60	C37109-BG	B64241	55	M	2	B	7,04	(3-15)	hom	100
61	C2597-AG	B 8165	58	M	2	B	7,29	(3-17)	het	100
62	C 2411-AG	B 7532	74	M	2	A	7,29	(4-20)	het	200
63	C39282-AG	B72064	72	M	2.3	C	7,37	(3-15)	het	100
64	C39498-AG	B3889	71	M	2	0	7,53	(4-10)	het	015
65	C 2527 -AG	B 9612	60	M	2	A	7,64	(2-17)	het	200
66	C39378-AG	B72355	48	M	2.3	B	8,34	(5-22)	het	095
67	C33783-AG	B54960	63	M	2.3	B	8,75	(5-13)	hom	050
68	C2727-POS	B Ext.	76	M	2	A	10,51	(5-30)	hom	100
69	C37679-BG	B65703	66	M	2	0	11,77	(3-32)	het	100
70	C 727- AG	B 6048	72	M	3	C	12,04	(2-25)	het	100

AG: Alto Grau; BG: Baixo Grau; X: média de pontos AgNORs; padr:padrão; ncc:número de células contadas; var:variação mínima e máxima de pontos AgNOR; hom: homogêneo; het: heterogêneo; Graus de KOSS (1992): 1 e 1.2 (BG); 2, 2.3 e 3 (AG); Est: Estádio de JEWETT-STRONG/MARSHALL, (1962).

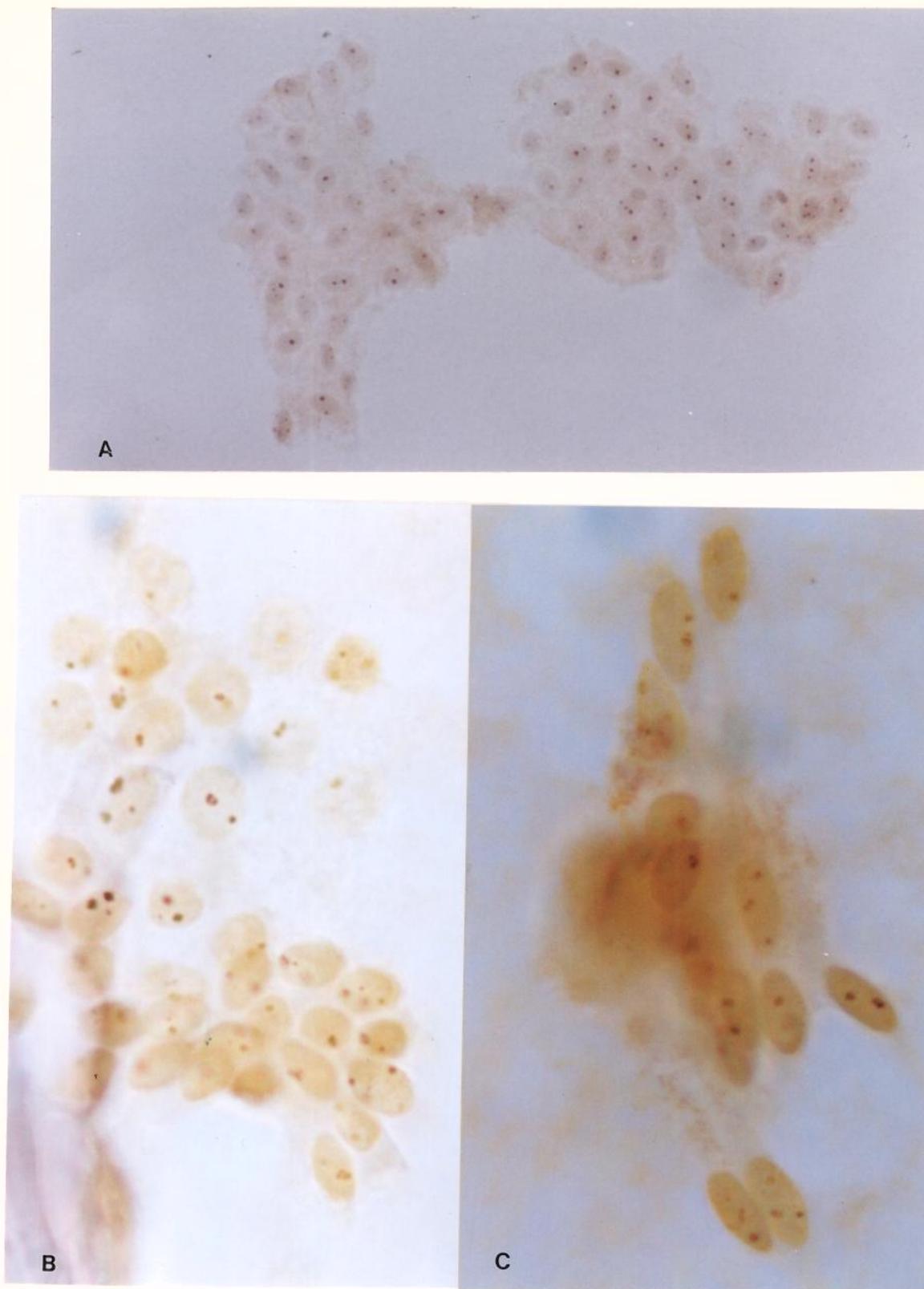


FIG. 1 - (CASOS:-7, 12 e 13) - Células uroteliais normais/reacionais mostrando AgNORs pequenos, regulares e de padrão homogêneo. Média de AgNORs por núcleo: a) 2,10; b) 2,23; c) 2,30. (Téc. Ag-NOR, a) x 160, b e c) imersão).

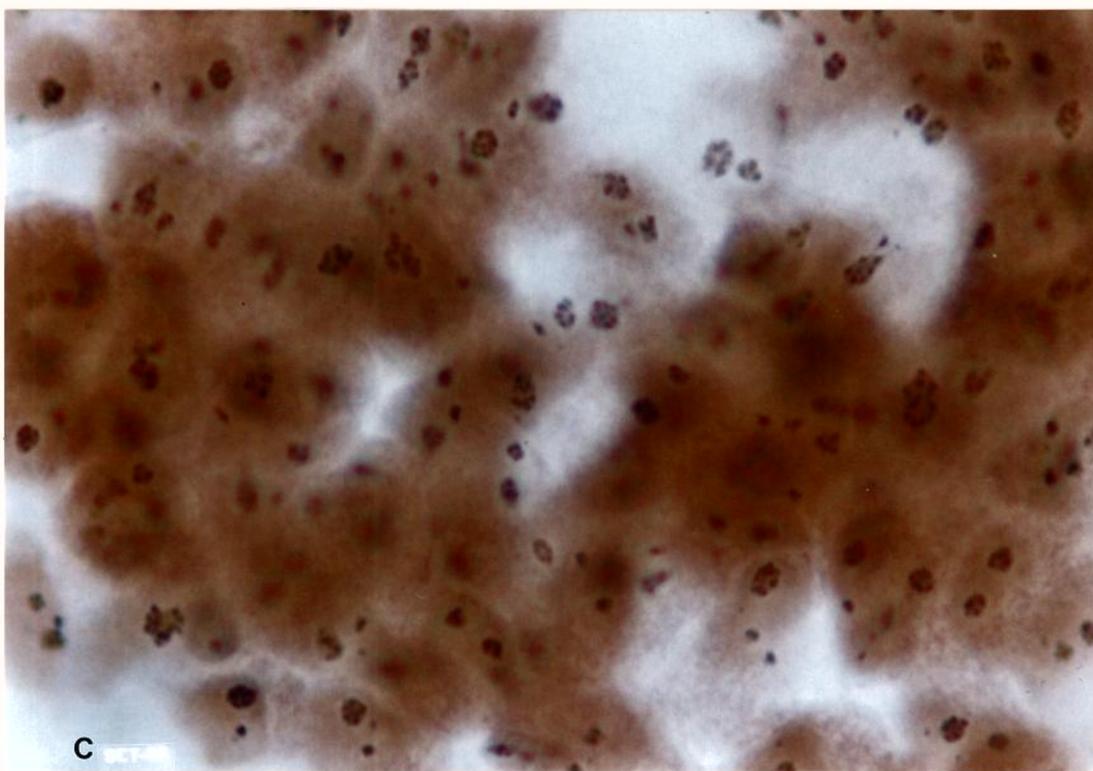
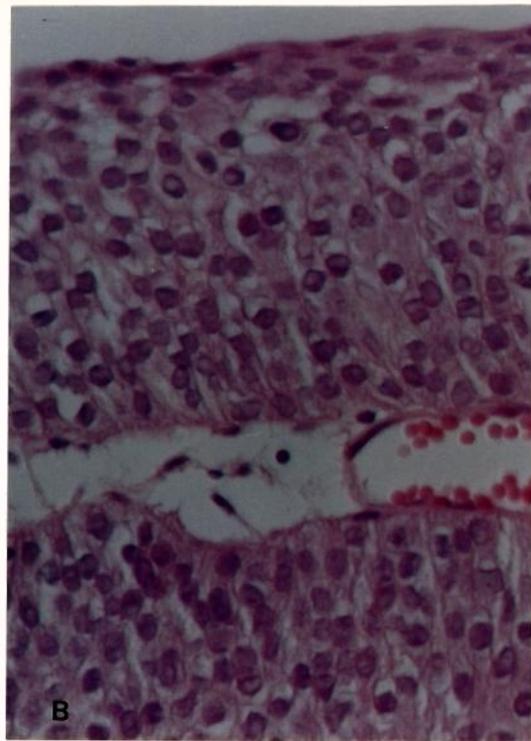
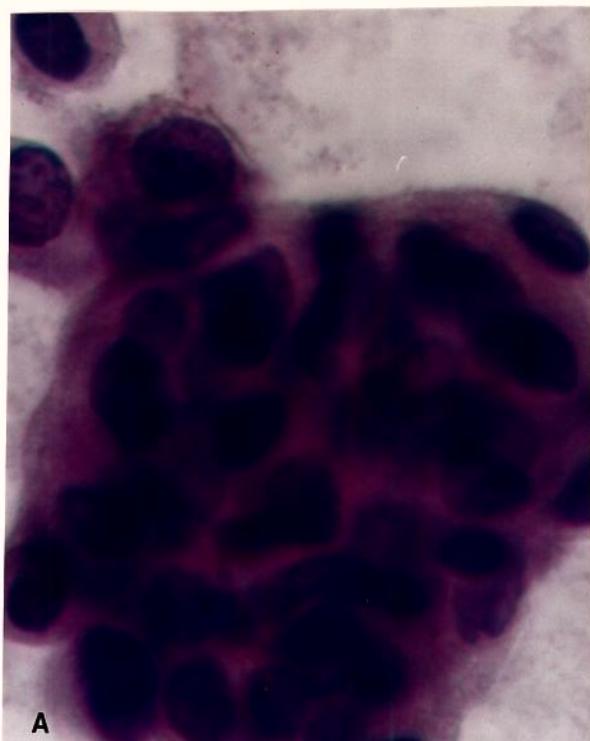


FIG. 2 - (CASO 35) - Tumor urotelial de baixo grau. a) Papila bem formada vista no sedimento urinário, com células uroteliais de volume um pouco aumentado. b) Tumor urotelial grau I de KOSS, exame histopatológico. (HE, a) x 400 e b) x 125) c) AgNORs pequenos, numerosos e homogêneos. Média de AgNORs=4,97 (Téc. AgNOR, imersão).

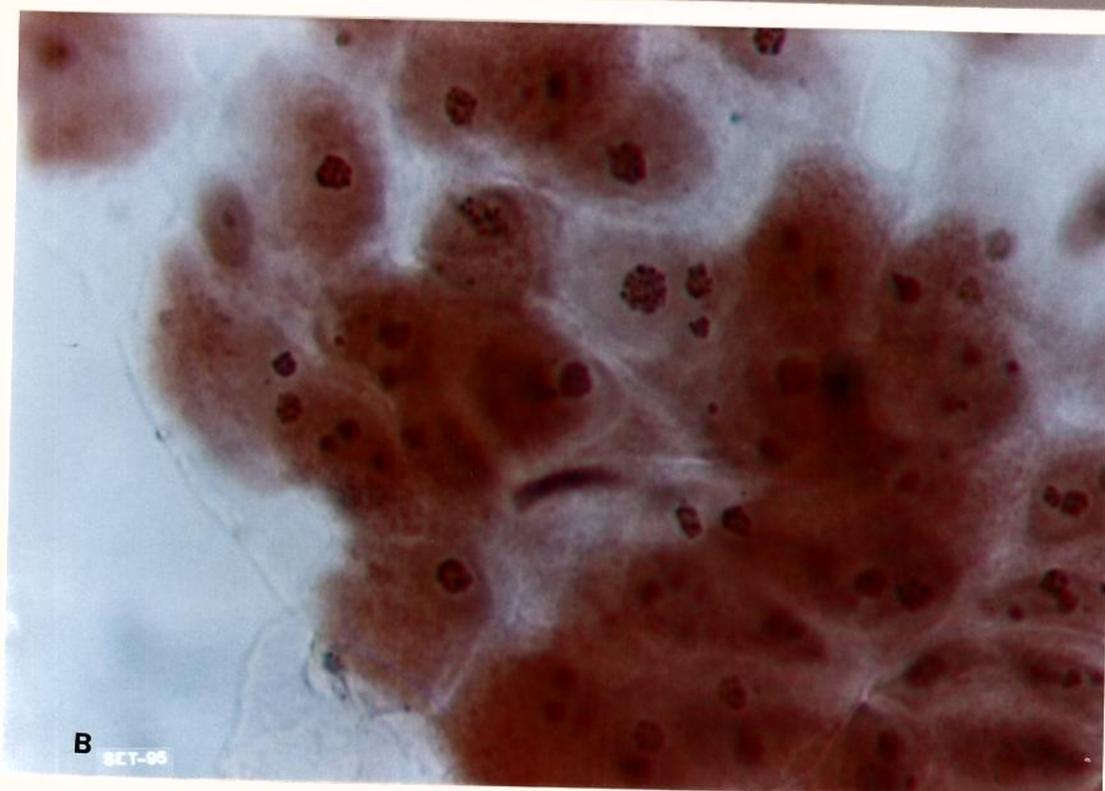
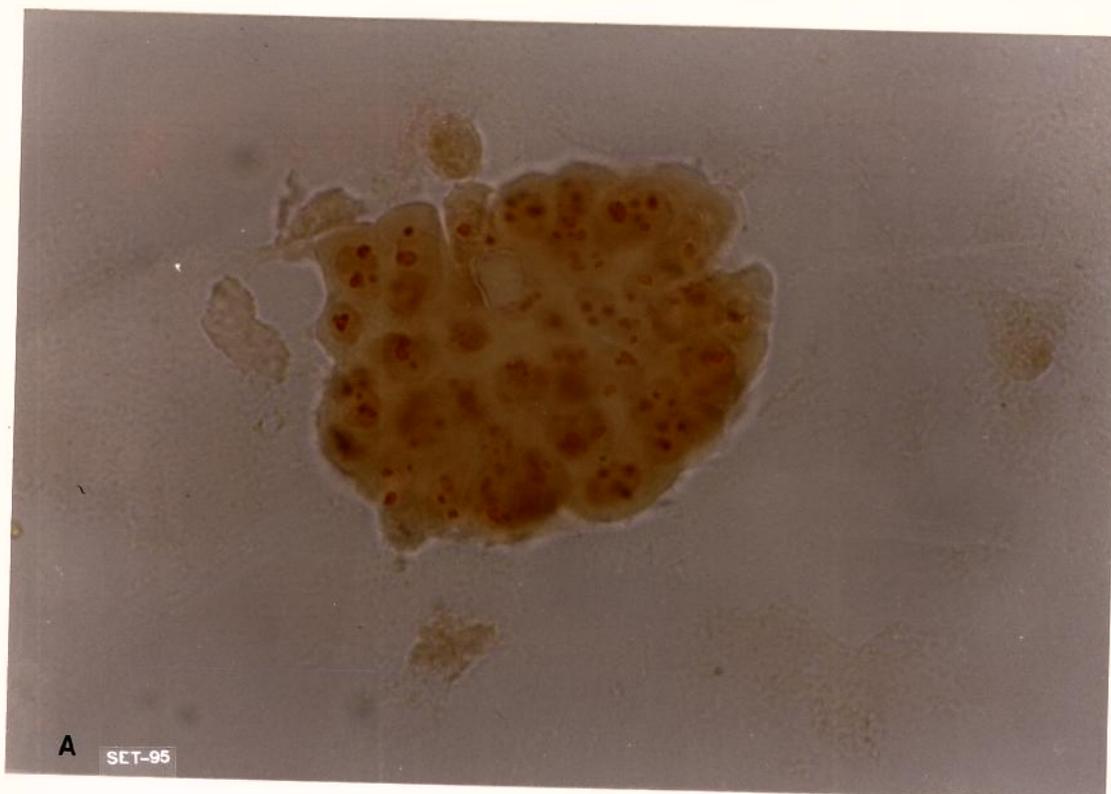


FIG. 3 - (CASOS a)- 35, b)- 43) Tumor urotelial de baixo grau. Inúmeros pequenos pontos agrupados, com padrão homogêneo. A média das AgNORs foi a) 4,97 e b) 6,42 (Téc. AgNOR), a) x 200, b) imersão).

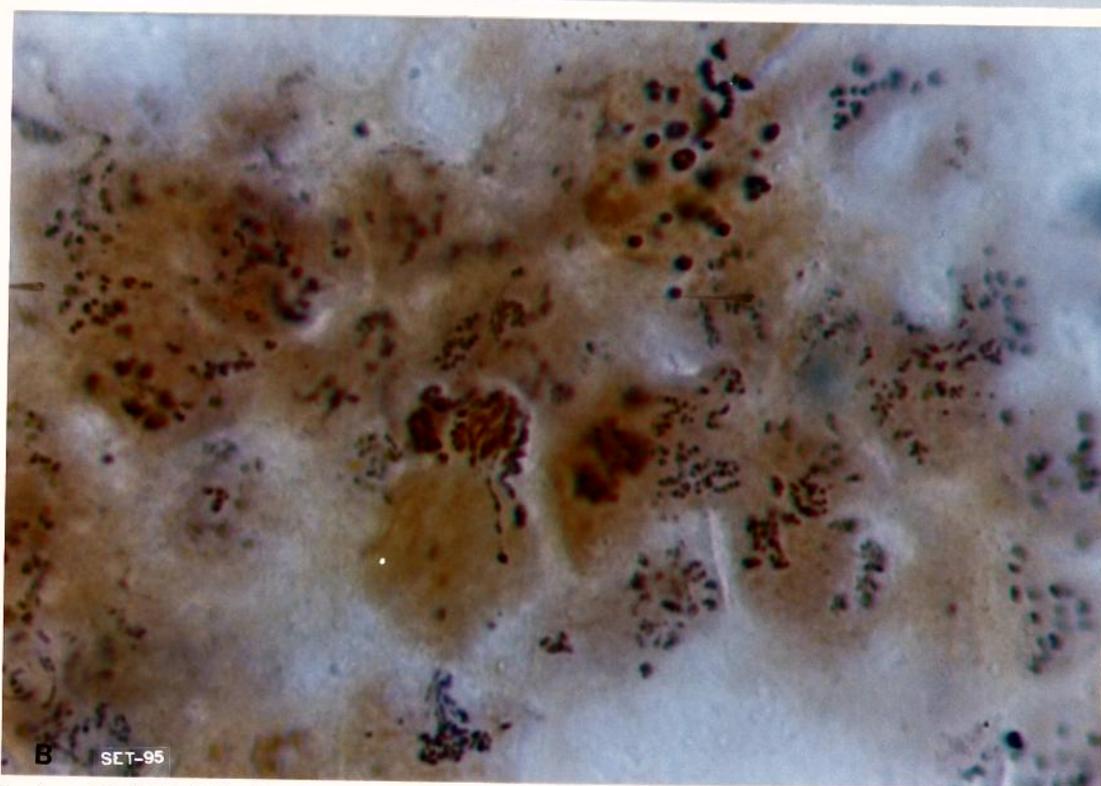
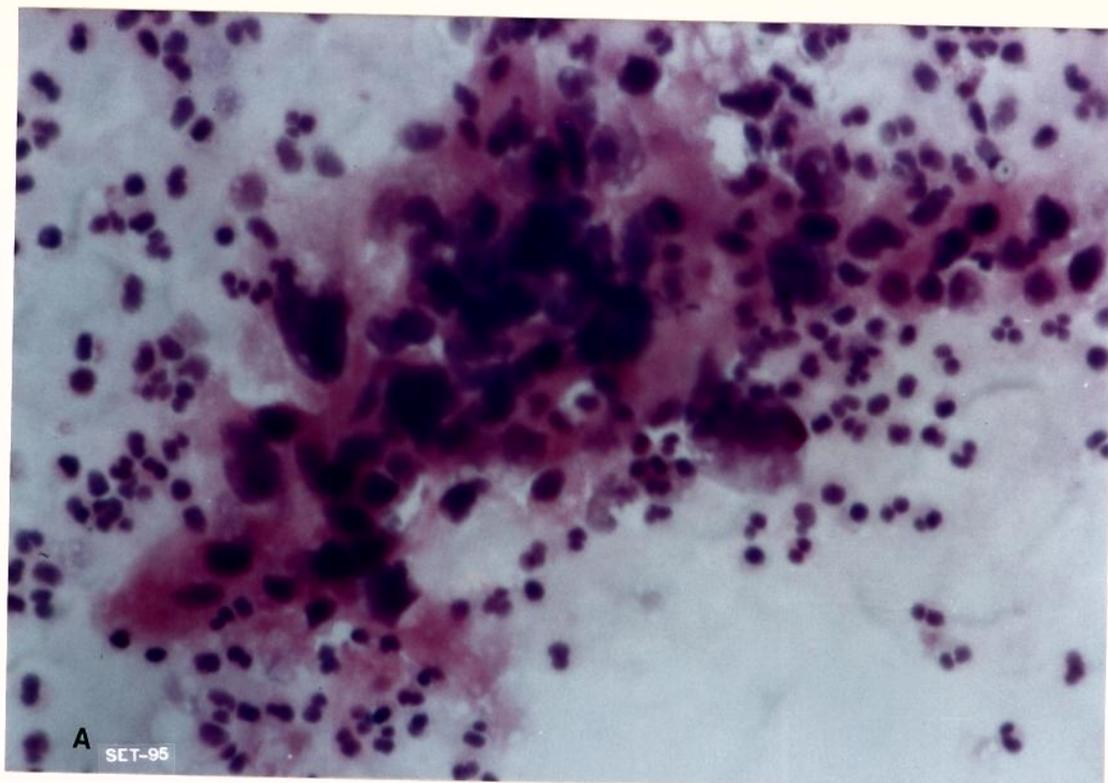


FIG. 4 - (CASO 70) Tumor urotelial de alto grau. a) Células neoplásicas com acentuada anisonucleose, cromatina muito densa e hipercorada (HE, x 125). b) AgNORs muito pequenas, incontáveis, às vezes, interligadas. O padrão morfológico é heterogêneo. A média de AgNORs foi 12,04 (Téc. AgNOR, imersão).

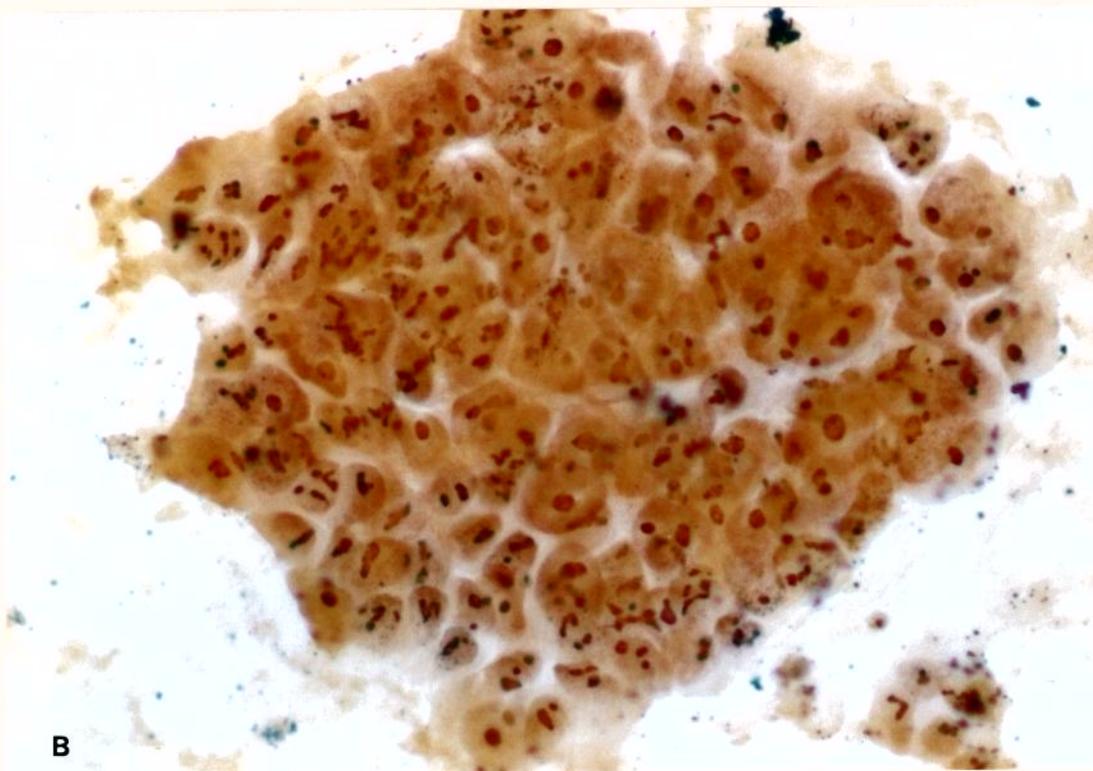
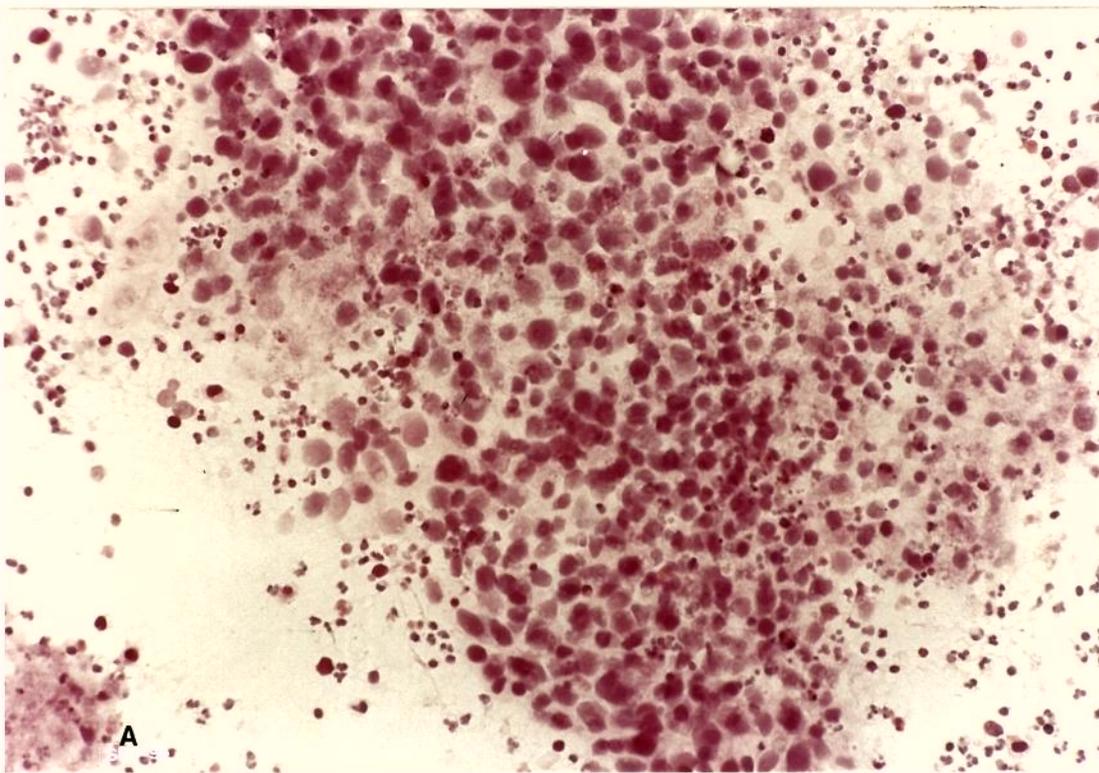
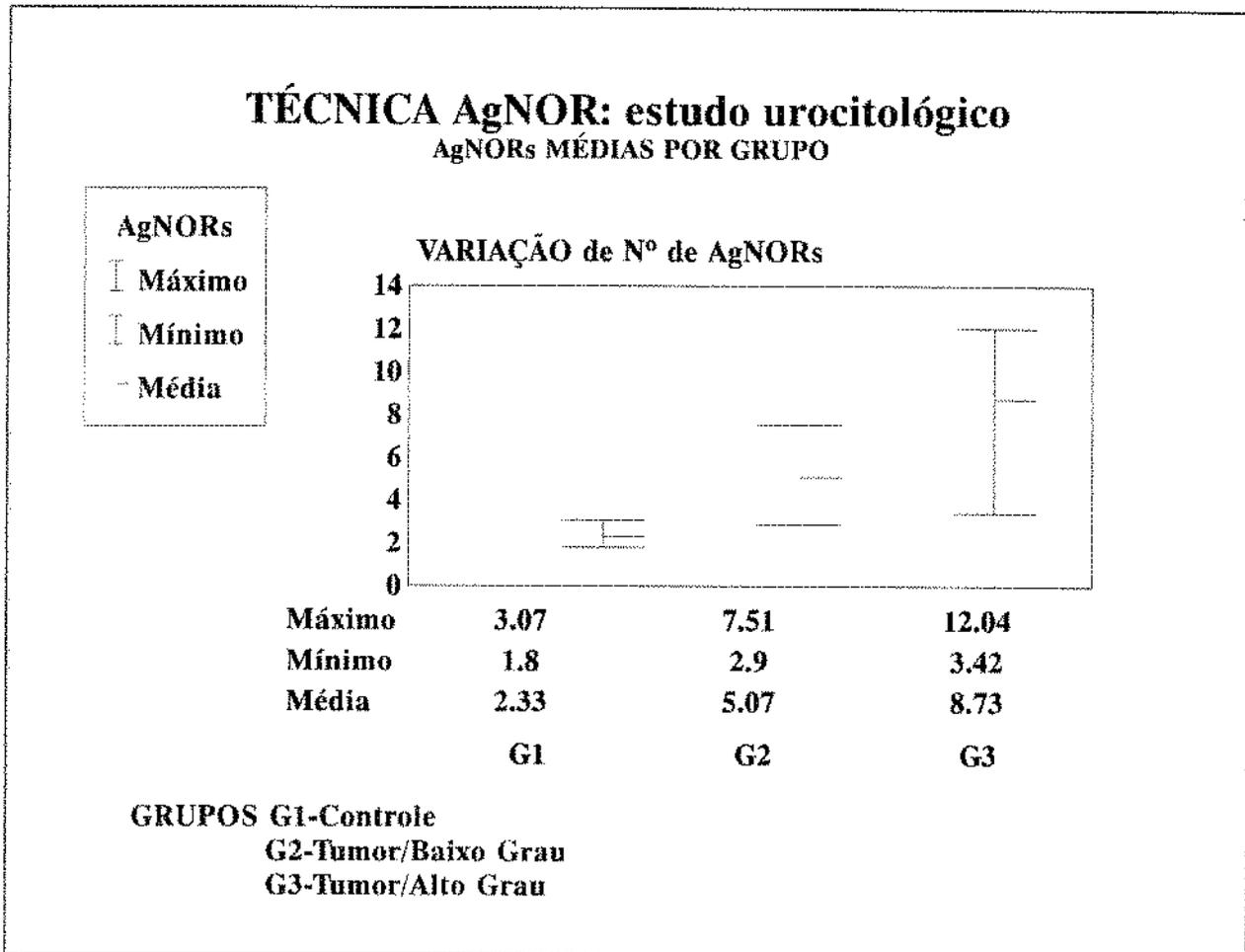


FIG. 5- (CASO 48) Tumor urotelial de alto grau. a) O sedimento do lavado urinário, corado por hematoxilina-eosina, já mostra células muito volumosas, com núcleos hipercoreados e moderada anisocitose. Há também células necróticas e inflamatórias (HE, x250). As AgNORs nas células tumorais têm padrão heterogêneo, com grande variação na forma e no tamanho. A média das AgNORs foi de 3,64 (Téc. AgNOR, imersão).

GRÁFICO 1:



4.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

4.2.1. CURVAS DA DISTRIBUIÇÃO DE CASOS POR NÚMERO MÉDIO DE AgNORS. DETERMINAÇÃO DO PONTO DE CORTE ENTRE AS CURVAS.

Aplicando-se o teste Qui-quadrado de aderência (ou de aproximação) (STEVENSON, 1986) demonstramos que a curva de distribuição de pontos do grupo controle (G1) é bem superponível à curva de Gauss (da distribuição normal de valores) (a H_0 ou hipótese nula). Com $n=26$, a média $X=2,33$, $dp= 0,3288$ e $p<10\%$, o valor crítico foi $T=0,45852 < 2,77$, o valor de T crítico que corresponde ao nível de significância de alfa de 10%. Portanto, a hipótese nula H_0 , de semelhança das curvas, não pode ser rejeitada e elas foram consideradas superponíveis.

Para o grupo tumoral (G2+G3), com $n=44$, a média $X= 5,8239$, $dp= 2,2291$ e $p<10\%$, o teste Qui-quadrado de aderência não demonstrou semelhança com a curva de Gauss. Porém, após logaritmização de seus valores (a fim de compactar a curva), esta pode ter uma boa aproximação com a curva de Gauss ($T= 5,43 < 6,251$, o T crítico ao nível de significância de alfa de 10%, com 3 graus de liberdade).

A partir da demonstração gráfica da distribuição de casos, em porcentagens, por números médios das AgNORs, no grupo controle e no grupo tumoral geral, determinaram-se valores críticos no ponto de corte de interseção das curvas obtidas dos dois grupos estudados. (Ver gráfico 2).

Assim, a partir do ponto de corte entre as curvas ("cut off"), que corresponde a 2,96 pontos AgNORs, observamos, acima deste valor, 97,1% da área definida pela curva, de casos neoplásicos. Igualmente, observamos 97,1% da área dos valores AgNORs do grupo controle, abaixo deste.

Ele também delimita os falsos negativos na área definida pela curva do grupo tumoral, que são 2,9% dos casos e, na curva do grupo controle, os falsos positivos, outros 2,9% de casos.

Portanto, pode-se concluir que, ao nível de corte de 2,96 pontos AgNORs, temos, segundo BAAK et al. (1983):

Especificidade $(100 \times VN/VN+FP) = 96,29\%$

Sensibilidade $(100 \times VP/VP+FN) = 97,77\%$

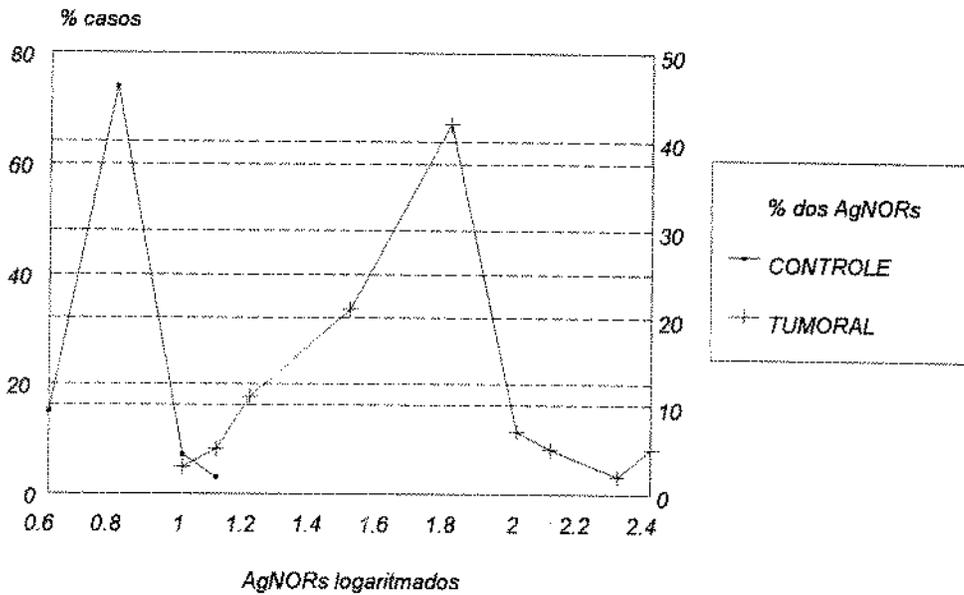
Acurácia $(100 \times VN + VP/VN+VP+FN+FP) = 97,22\%$

Valor preditivo de um resultado negativo $(100 \times VN/ VN+FN) = 96,97\%$

Valor preditivo de um resultado positivo $(100 \times VP/ VP+FP) = 97,77\%$

GRÁFICO 2:

TÉCNICA AgNOR: Um auxílio no diagnóstico diferencial em citologia urinária



DISTRIBUIÇÃO em % dos VALORES AgNORS LOGARITMADOS
Ponto de corte em 2,9% = erro (falso +/-)

4.2.2. NÚMERO de AgNORs POR GRUPO (CONTROLE versus TUMORAL)

Houve significância estatística ($p < 0,001$) entre as diferenças das médias de AgNORs, nos casos tumorais uroteliais primários vesicais e nos controles, aplicando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para duas amostras independentes (SIEGEL, 1975; STEVENSON, 1986). (Tabela 2).

TABELA 2 - NÚMEROS MÉDIOS das AgNORs NOS GRUPOS 1 (CONTROLE) e GRUPO (G2+3) TUMORAL GERAL

GRUPOS	MÉDIA	SD	variância
G1	2,33	0,3288	14%
G (2+3)	5,82	2,2291	39%

SD=desvio padrão

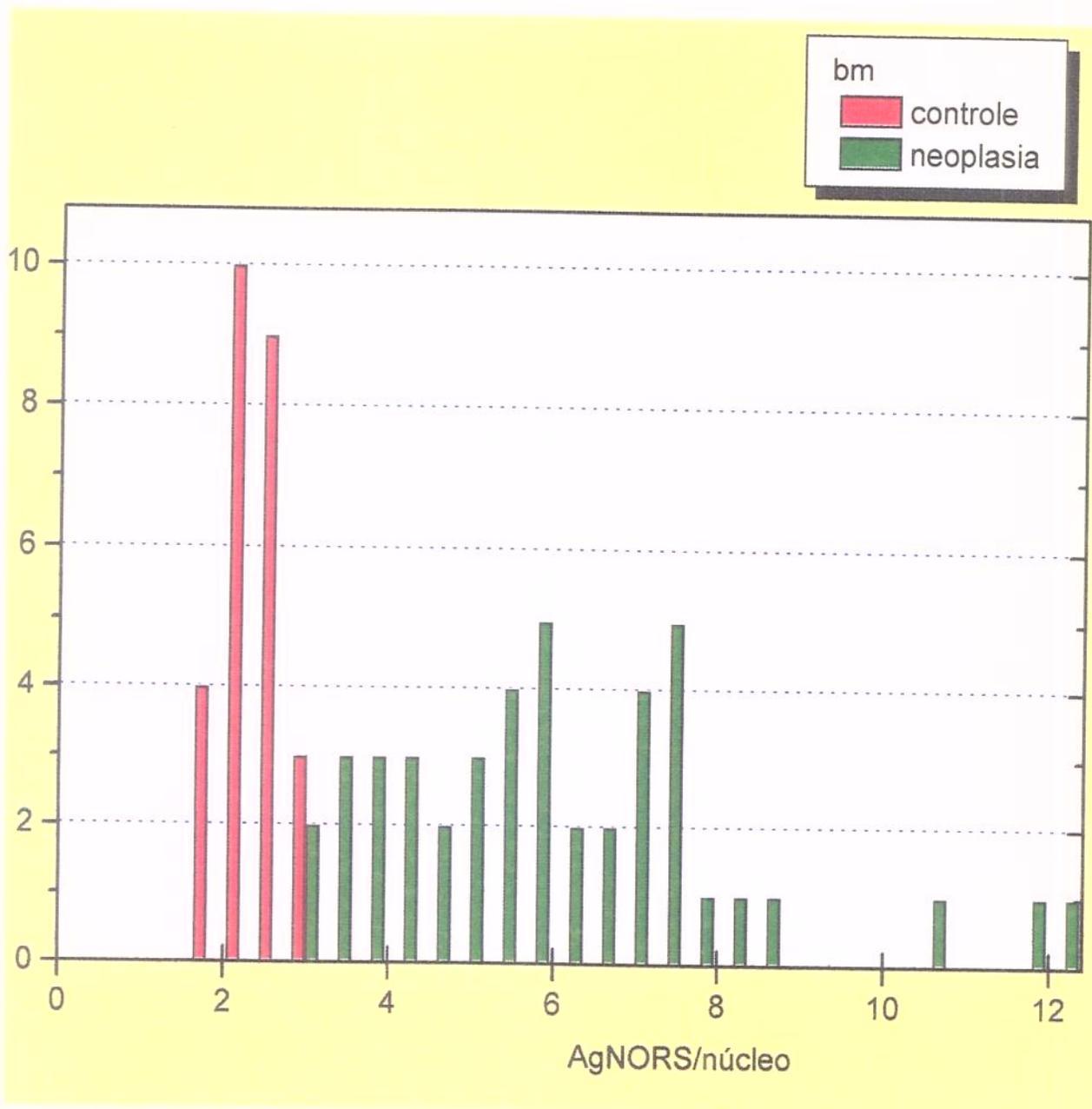
Análise estatística-Teste de Mann-Whitney

G1- GRUPO CONTROLE X (G2 +G3)-GRUPO TUMORAL

($p < 0,001$)

O histograma da distribuição de número AgNORs por grupos: G1 (na cor vermelha) e G2+3 (na cor verde); pode ser visto no Gráfico 3, a seguir.

GRÁFICO 3 - Histograma da distribuição de número AgNORs por grupos: G1 (na cor vermelha) e G2+3 (na cor verde).



4.2.3. TESTE DE COMPARAÇÃO ENTRE OS TRÊS GRUPOS SIMULTANEAMENTE

Para a comparação simultânea do grupo 1 contra o grupo 2 e contra o grupo 3, usou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, obtendo-se: $H= 50,859$ com 2 graus de liberdade e $p<0,01$ ($p= 9,04 \times 10^{-12}$). Portanto, há alguma diferença nas médias das AgNORs entre os três 3 grupos, comparando-os simultaneamente.

COMPARAÇÕES ENTRE OS GRUPOS DOIS A DOIS

Resultados do teste de DUNN (1961)- para comparações múltiplas, 2 a 2, entre os diferentes grupos do estudo, apresentam-se na Tabela 4.

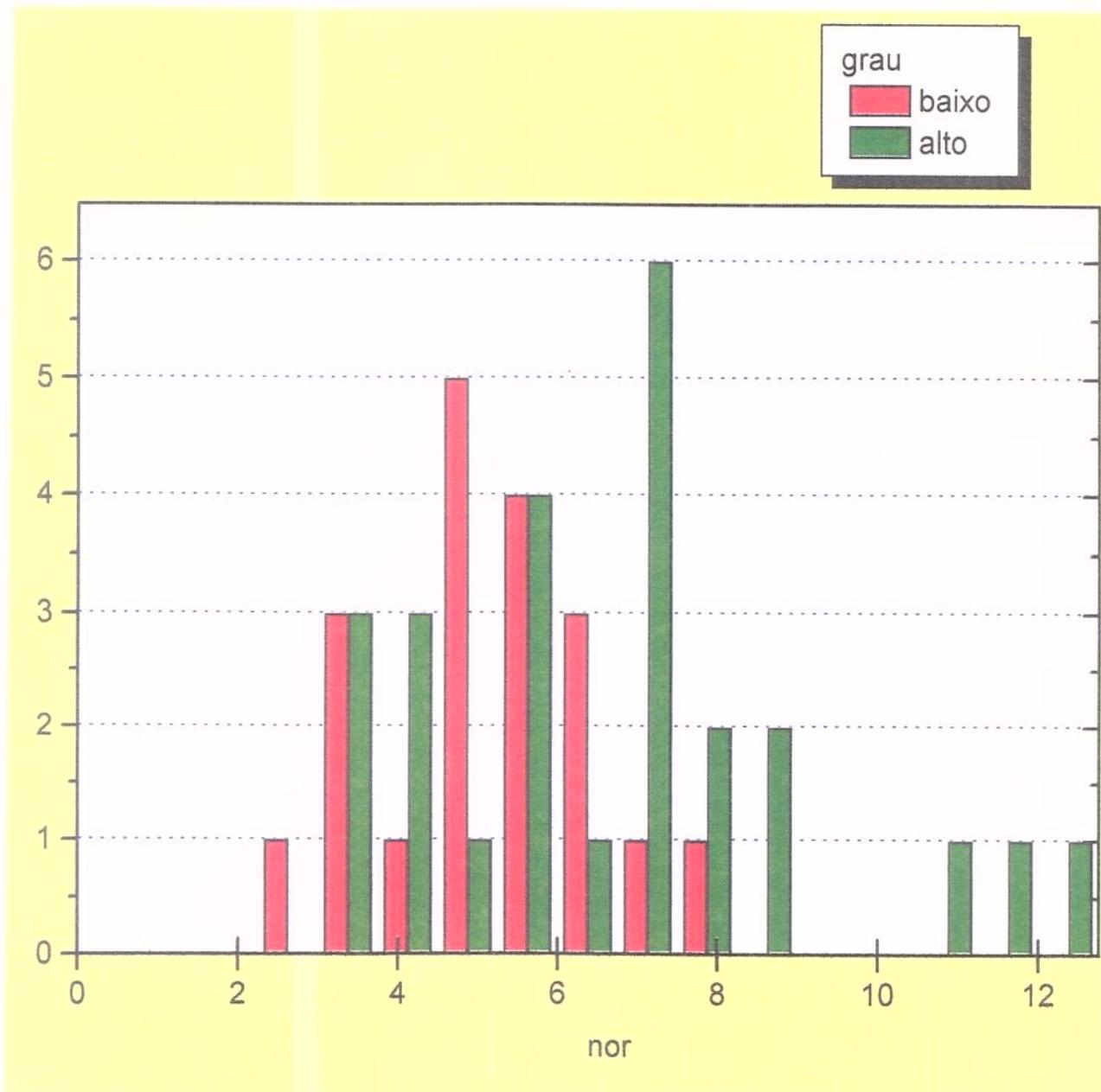
(As médias nos 3 grupos foram: $G1=2,33$, $G2=5,07$, $G3=8,73$).

TABELA 3 - TESTE DE DUNN-PARA COMPARAÇÃO 2 A 2 ENTRE OS GRUPOS

GRUPOS	DIFERENÇA	S E	$p<0,05$
G3xG1	$52,86-13,54=39,32$	5,7	SIM
G3xG2	$52,86-42,71=19,15$	6,19	NÃO
G2xG1	$42,71-13,54=29,17$	6,19	SIM

Na comparação entre os grupos controle *versus* o tumoral de baixo ou do grupo controle *versus* o tumoral de alto grau, consecutivamente, observam-se diferenças estatisticamente significantes, com valores de $p<0,05$. Já na comparação entre os dois grupos tumorais não houve diferença significativa, com $p> 0,05$. Observe-se no Gráfico 4 o histograma da distribuição de casos por números de AgNORs nos dois grupos tumorais (G2-tumoral de baixo grau, em vermelho e G3- tumoral de alto grau, em verde).

GRÁFICO 4 - Histograma da distribuição de número AgNORs por grupo, de baixo grau (G2) e de alto grau (G3)



4.2.4. GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL versus NÚMEROS DE AgNORs

Correlacionamos o grau histológico tumoral com o número de AgNORs (tabela 4), pelo teste de correlação de dados por postos de Spearman, com correção de empates, técnica não-paramétrica para avaliar o grau de relacionamento entre observações emparelhadas de duas variáveis, quando os dados se dispõem em postos.

O coeficiente de correlação por postos de Spearman pode variar de -1,00 a +1,00. Se ficar próximo de 0, sugere ausência de relacionamento entre os dois conjuntos (STEVENSON, 1986).

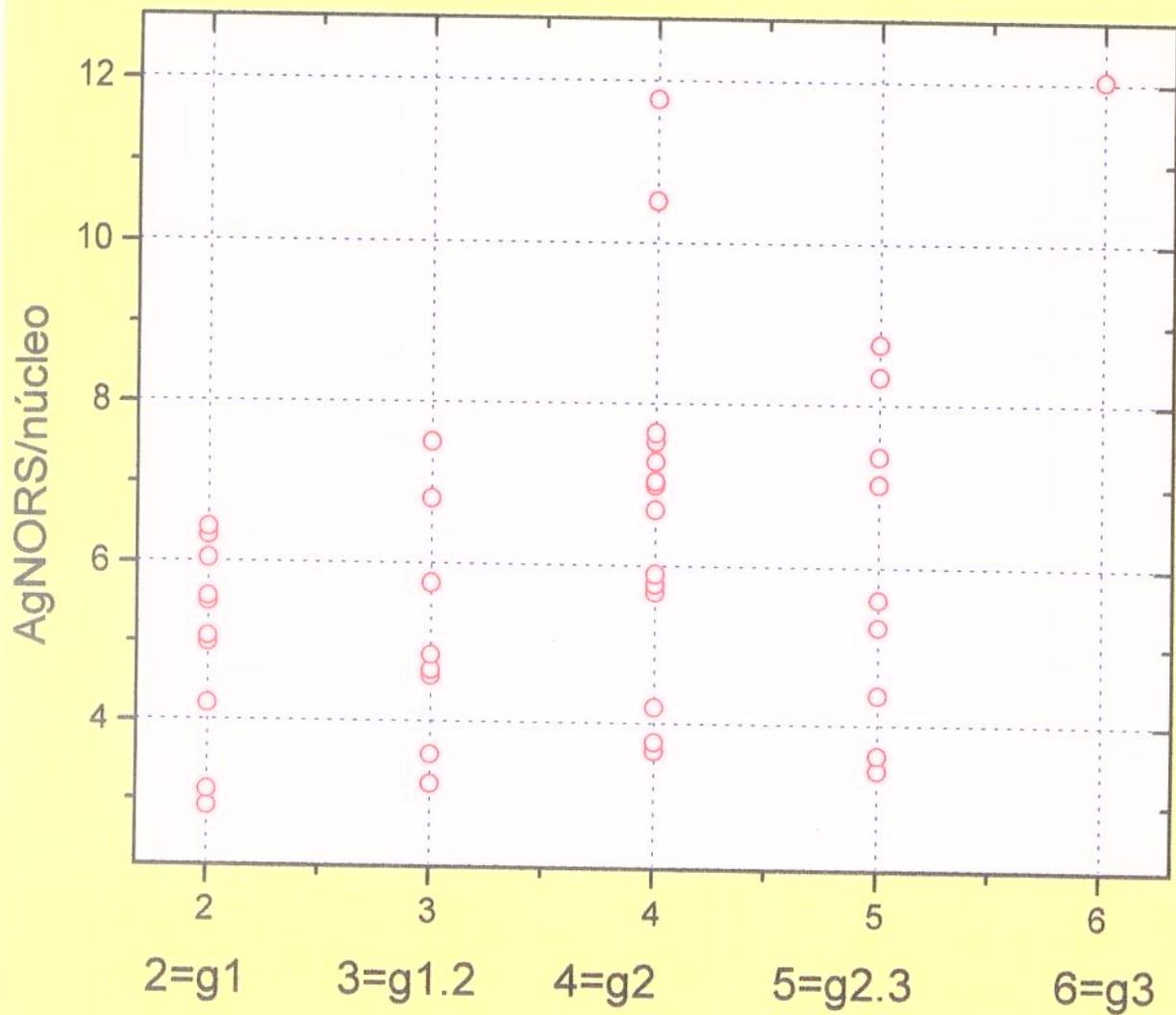
A distribuição dos valores foi a seguinte:

TAB. 4- O VALOR MÉDIO DE AgNORS POR GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL

GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL	média AgNORs	variância	desvio padrão	moda	mediana
G 1 (n 11)	5,26	1,02	1,01	5,50	5,50
G 1-2 (n 8)	4,86	2,49	1,58	2,90	4,64
G 2 (n 16)	6,79	4,92	2,21	7,29	6,99
G 2-3 (n 8)	5,97	3,95	1,98	3,42	5,67
G 4.0 (n 1)	12,04	---	---	12,04	12,04

Transformamos o grau histológico por ordem crescente dos seguintes números: grau 1=1, grau 1-2= 1,5, grau 2= 2, grau 2-3= 2,5 e grau 3= 4. Para o tamanho amostral de n=44, o coeficiente de correlação de dados por postos de Spearman é $r = 0,33782$ e a probabilidade de erro $p < 0,0249$ (programa WINSTAT, 1994). Obtivemos, portanto, uma correlação positiva fraca entre eles, porém, significativa estatisticamente. Vejamos o Gráfico 5 com a distribuição do número de AgNORs por graus histológicos.

GRÁFICO 5 - Distribuição do número de AgNORs por graus histológicos.



4.2.5. PADRÃO MORFOLÓGICO DE APRESENTAÇÃO DAS AgNORs NOS GRUPOS

Para a correlação do grau histológico com o padrão morfológico de apresentação dos pontos AgNORs dos diferentes grupos foi realizado um (1) teste X^2 geral=35,016, com 2 graus de liberdade, e $p<0,001$ (ver tabela 5). Posteriormente foram realizados dois (2) testes de Fisher para dados emparelhados: primeiro, com o grupo controle (G1) *versus* o tumoral (G2+G3) com $p<0,001$ e, no segundo, com o grupo tumoral de baixo grau (G2) *versus* o tumoral de alto grau (G3) com $p=0,001$. Usamos um procedimento estatístico de correção, o ajuste do erro alfa, segundo BORTZ et al. (1990), para comparações de mais de dois (2) grupos, método este que exige um nível de significância individual de 0,02532 (2,5%), porque são dois (2) testes com 5% de significância cada um deles.

COMPARAÇÃO GERAL ENTRE os GRUPOS

TABELA 5 - PADRÃO MORFOLÓGICO das AgNORs NOS GRUPOS G1 (CONTROLE), G2 (TU de BG) e G3 (TU de AG)

GRUPOS	PADRÃO das AgNORs		TOTAL
	homogêneo	heterogêneo	
G1	26	00	26
G2	15	04	19
G3	06	19	25
TOTAL n (%)	47 (67,1%)	23 (32,9%)	70 (100%)

TESTE X^2 Geral=35,016 (2 graus de liberdade) e $p<0,001$

COMPARAÇÕES ALTERNADAS ENTRE OS GRUPOS:

1º TESTE DE FISHER (exato): $G_1 \times G_{(2+3)}$, $p < 0,001$.

Sendo que: G_{2+3} (n:44) = 21 homogêneos e 23 heterogêneos.

2º TESTE DE FISHER: $G_2 \times G_3$, com ajuste do erro alfa (BORTZ et al., 1990) e $p = 0,001$.

Dessa forma, conclui-se que é estatisticamente significativa a diferença do padrão morfológico das AgNORs, quanto ao parâmetro "grau" histológico dos grupos controle e o tumoral total ($p < 0,001$) e, também, entre os dois grupos tumorais entre si ($p = 0,001$).

4.2.6. ANÁLISE DISCRIMINATÓRIA:

Com a finalidade de testar a utilidade da contagem de AgNORs para a classificação (correta) do sedimento urinário, aplicamos a análise discriminatória com o programa WINSTAT (1994).

Como variáveis independentes, escolhemos a média dos números de AgNORs, a diferença entre o valor máximo e o mínimo da contagem do caso individual e o padrão morfológico (homogêneo ou heterogêneo).

As distribuições destas duas variáveis não são semelhantes a uma curva de distribuição normal, sendo então, necessário transformá-las em curvas com boa aproximação à curva de Gauss pela função "boxcox", após logaritmização, com o valor 0,4. A aproximação com a curva de Gauss foi obtida pelo teste de Kolmogorov-Smirnof (WINSTAT, 1994).

Como variáveis dependentes (classificadoras), escolhemos a classificação histológica, que definiu os grupos estudados e foi usada como padrão, em "sem neoplasia, carcinoma de baixo grau e carcinoma de alto grau".

Para poder avaliar o grau preditivo da análise discriminatória, pelo método Jackknife (LACHENBRUCH, 1975), calculamos para cada um dos setenta (70) casos a suposta classificação histológica com a função "valor y perdido" (missing y value), a partir dos dados dos sessenta (69) casos restantes e os valores da média das AgNORs, da diferença entre máximo e o mínimo da contagem do caso em questão, e também, do padrão morfológico (homogêneo ou heterogêneo).

Obtivemos cinquenta e nove (59) casos, de um total de setenta (70), corretamente classificados (84%). O erro total foi de 11/ 70 casos, sendo, dois (2) falsos negativos; cinco (5) falsos de baixo grau (que eram de alto graus na histologia); quatro (4) falsos de alto grau (que eram de baixo grau na histologia).

TABELA 6 - ANÁLISE DISCRIMINATÓRIA (MATRIZ DE CLASSIFICAÇÃO).

CLASSIFICAÇÃO REAL HISTOLÓGICA	VALORES CALCULADOS PELO COMPUTADOR			TOTAL REAL
	O	B	A	
0	26	0	0	26
B	02	13	04	19
A	0	05	20	25
TOTAL n CALCULADO	28	18	24	70



5. DISCUSSÃO

A detecção citológica de neoplasia urotelial de baixo grau continua a ser um desafio, devido à crença de alguns autores de que as lesões de grau 1 não podem ser diagnosticadas com confiança, principalmente em espécimes obtidos por instrumentação. A detecção precoce destas lesões pode ter significado clínico (SACK et al., 1995).

Consideramos a técnica AgNOR útil no diagnóstico de malignidade em urocitologia oncológica, diferenciando entre atipias neoplásicas e as reacionais. Ela pode também ser auxiliar no diagnóstico diferencial da graduação em alto e baixo grau de malignidade.

O fato de podermos descorar a lâmina corada pela hematoxilina-eosina (ou outro corante de rotina) para posterior aplicação da técnica AgNOR, nos casos de problema diagnóstico e a possibilidade da análise de áreas "suspeitas", previamente marcadas, torna a técnica muito útil e de fácil aplicação (BARSOTTI et al., 1990; TREVISAN et al., 1993; TREVISAN, 1995).

Outra vantagem é a possibilidade, mesmo com pequeno número de células, de se obterem resultados conclusivos quanto a número e forma das AgNORs (RÜSCHOFF et al., 1993). Os autores concluíram que, em efusão humana, a investigação de somente trinta (30) núcleos, presumivelmente malignos, resultava em altas especificidade e sensibilidade diagnósticas.

Nossos resultados, comparáveis aos de MASUDA et al. (1994), em material citológico, com 2,9 pontos AgNORs (+/-0,5) para o grupo controle e 5,5 AgNORs (+/-1,9) para o grupo tumoral (sendo 4,0 +/-1,0 no grau 1 e 5,4 +/- 2,0 nos de grau 2 ou mais), foram, respectivamente: 2,33 (+/-0,32) no grupo controle e 5,82 (+/- 2,22) no tumoral, sendo 5,07 (+/-1,26) no baixo grau tumoral e 8,73 (+/-2,32) para o alto grau.

Para ABENOVA et al. (1995), em trinta e cinco (35) casos citológicos de neoplasia vesical e de bexigas normais, no grupo controle, o número médio foi de 3,76 AgNORs; 7,12, no tumoral bem diferenciado; 15,25, no moderadamente diferenciado e

29,51, no pouco diferenciado, respectivamente. Na transformação tumoral há um aumento do número de AgNORs, indicando atividade proliferativa das células.

As médias de 5 AgNORs no grupo controle e de 8 a 9,5 AgNORs, nos diferentes graus de diferenciação do carcinoma de epitélio de transição, em cortes histológicos, foram obtidos por CAIRNS et al. (1989). Porém, houve um grau de superposição entre urotélio normal, inflamatório, displásico e neoplásico.

Também em cortes histológicos, foram relatados por RÜSCHOFF et al. (1992) os seguintes valores: 3,3 (+/-0,5) AgNORs para o grupo normal e 6,9 (+/-1,1) no grupo tumoral geral. Em material urocitológico, segundo RÜSCHOFF et al. (1989), houve diferença entre benigno e maligno, quanto à área média ($p < 0,01$) e quanto ao número de AgNORs ($p < 0,05$).

Em patologia experimental, com ratos, os números médios de AgNORs foram respectivamente: 1,26 (sd=0,09) em urotélio não tratado; 1,75 (sd=0,10) para célula urotelial vizinha de lesão focal; 2,01 (sd=0,15) em hiperplasia simples; 2,15 (sd=0,19) na hiperplasia nodular ou papilifera; 2,37 (sd=0,12) no papiloma urotelial e 3,52 (sd=0,23) em carcinoma urotelial (TAKEUCHI et al., 1990).

A atividade proliferativa de neoplasias uroteliais, comparando-as com as de urotélio normal e determinando sua relação com o grau morfológico e com a presença de invasão, foi avaliada por LIMAS et al. (1993). A contagem média de AgNORs foi 1,57 em epitélio morfológicamente normal, que aumentou progressivamente com o grau do carcinoma urotelial não invasivo, mas variou intensamente em tumores invasivos e não se correlacionou com os índices proliferativos, a incorporação da bromodeoxyuridina (BrdU) e a imuno-expressão do antígeno Ki 67. O espectro de valores para ambos os índices proliferativos e NORs foi particularmente amplo no carcinoma urotelial, grau 2. As atipias severas, sem crescimento exofítico tinham os mais altos NORs por núcleos, assim como, aumentos nos índices de BrdU e Ki 67, comparados com tumores uroteliais graus 3-4, invasivos. Os achados destes autores sugerem que a proliferação celular do carcinoma

urotelial pode ser seguramente avaliada com os vários diferentes marcadores e que muitos destes podem ser correlacionados com grau tumoral mas não com o estágio histológico.

De acordo com MASUDA et al. (1994), avaliando trinta (30) casos no grupo controle e trinta (30) de carcinoma urotelial, foram obtidos três (3) resultados falsos positivos e cinco (5) falsos negativos, ao nível de corte de 3,5 pontos AgNORs. Os autores concluíram pela utilidade do método, já que resultava em valores aceitáveis de 83% de sensibilidade e 90% de especificidade. Para eles, somente a contagem das AgNORs não pôde discriminar entre os tumores de baixo e alto graus de malignidade. Não havia relação significativa entre o número médio de AgNORs e a graduação histológica, porém, os carcinomas de grau 2, com contagem de AgNORs de 6,0 ou mais, tendiam a uma lesão mais difusa ou invasiva. Assim, especialmente nestes, o número de AgNORs podia prever o potencial maligno do tumor.

Observando o nosso gráfico 2, das curvas da distribuição das AgNORs, no grupo controle e no tumoral, no valor crítico de corte de 2,96 pontos AgNORs, obtivemos abaixo deste valor os falsos negativos, 2,9% de casos (1 caso) e acima, os falsos positivos, 2,9%, (1 caso). Respectivamente, há uma percentagem de 97,1% de acerto diagnóstico em cada uma das curvas, na controle e na tumoral. Segundo BAAK et al. (1983), pode-se concluir que ao nível de corte de 2,96 pontos AgNORs, temos a especificidade de 96,29% da técnica AgNOR, neste estudo; a sensibilidade de 97,77%; a eficiência de 97,22%; o valor preditivo negativo de 96,97% e o valor preditivo positivo de 97,77%, no conjunto dos casos, considerando-se o gráfico citado. Em comparação com os resultados de MASUDA et al. (1994), já referidos, os nossos valores são melhores.

Poucos autores se baseiam na forma das áreas prata-positivas para diagnóstico de malignidade e diagnóstico diferencial. Para DERENZINI et al. (1989), as AgNORs estavam mais irregularmente distribuídas no nucléolo e tinham mais variabilidade, quanto ao tamanho, nas células neoplásicas do que nas células mesoteliais reacionais do seu grupo de estudo.

Segundo KODOUSEK & DUSEK (1991), uma acentuada heterogeneidade de AgNORs em tumores malignos individuais foi observada como um quadro comum, sugerindo a presença de subpopulações celulares ou clones, com diferentes atividades proliferativas e propriedades metabólicas.

Para TREVISAN et al. (1995), a heterogeneidade das AgNORs talvez seja o fator mais importante na detecção do caso positivo em mucosa colorretal, o que já pode ser evidenciado em médio aumento microscópico. Múltiplas formas das AgNORs, num mesmo tumor, podem ser encontradas.

Consideramos também a análise da morfologia das AgNORs útil ao diagnóstico diferencial entre benigno e maligno e para a graduação citológica tumoral, entre baixo e alto grau de malignidade. Na análise morfológica dos pontos prata-impregnados, em todos os casos do grupo controle, encontramos um padrão “homogêneo” das AgNORs, enquanto que no grupo neoplásico foram observados 23/44 casos de padrão “heterogêneo”. Nos neoplásicos de baixo grau de malignidade, 15/19 casos eram de padrão “homogêneo” e o padrão heterogêneo ocorreu em 76% (19/25), dos de alto grau de malignidade.

Na comparação da morfologia das AgNORs obtivemos, respectivamente, diferenças significantes ($p < 0,001$) entre o grupo controle (G1) e o grupo tumoral (G2+G3) e do grupo tumoral de baixo grau (G2) e o de alto grau (G3) ($p = 0,001$ - teste de Fisher).

Pela análise discriminatória, método Jackknife, foram classificados corretamente 84% (59/70) dos casos quanto aos três grupos, controle, tumoral baixo grau e tumoral alto grau, (que são as variáveis dependentes), e, baseada a análise no número médio, na diferença da contagem máxima e mínima das AgNORs e no padrão morfológico, as variáveis independentes. O erro total foi de 11/70 casos, conforme matriz classificatória na tabela 6). Os falsos negativos foram 2 (casos 28 e 29), que eram do grupo de baixo grau na histologia. Na citologia, com a coloração de hematoxilina-eosina, um deles foi considerado de alto grau, e portanto, foi supergraduado (tabela 1b).

Dos positivos, de alto grau na histologia, obtivemos na classificação calculada cinco (5) casos falsos de baixo grau e que, na citologia (hematoxilina-eosina), eram dois (2) de alto grau (casos 52 e 67, com padrão morfológico das AgNORs, homogêneo) e três (3) casos de baixo grau (casos 55, 56 e 60, com padrão homogêneo). Portanto, foram subgraduados pela análise classificatória de Jackknife.

Do grupo de baixo grau na histologia, quatro (4) eram falsamente classificados em alto grau. Portanto, foram superestimados, considerando-se provavelmente a alta contagem das AgNORs ou o padrão morfológico das mesmas. Na citologia (hematoxilina-eosina), dois (2) foram classificados como de alto grau (casos 32 e 33 que tinham padrão heterogêneo), um (1), de baixo grau (caso 39 que era heterogêneo) e um (1), positivo, não classificado quanto ao grau (caso 45, com 7,51 pontos de AgNORs e um grande diferencial de AgNORs, que variou de 3-25, apesar de ser homogêneo no padrão). Deve-se considerar também a possibilidade de que a lesão de alto grau não tenha sido representada histologicamente. Para KOSS (1992), se o sedimento urinário mostra óbvias células cancerosas e a biópsia demonstra apenas uma lesão papilifera de baixo grau, os achados sugerem que uma outra lesão maligna de alto grau possa estar presente no trato urinário, em qualquer nível.

A análise quantitativa das AgNORs tem valor diagnóstico positivo para neoplasia e no diagnóstico diferencial da graduação citológica, entre alto e baixo graus, apesar de alguns autores, como UNDERWOOD & GIRI (1988), afirmarem que em muitas circunstâncias há um grau variável de superposições de valores de AgNORs entre as lesões benignas e malignas de baixo grau que contra indicariam o uso da técnica como critério absoluto para o diagnóstico. O uso da análise discriminatória, porém, permite, pelo conjunto de diferentes variáveis de AgNORs, em muitos casos (84% dos nossos), uma análise correta.

Para confirmar um diagnóstico diferencial de carcinoma de baixo grau e alterações reacionais ou artefatuais, consideramos a contagem das AgNORs e o seu padrão morfológico "homogêneo". Para os tumores de alto grau de malignidade, valorizamos o padrão morfológico "heterogêneo" das AgNORs, independente da enumeração das AgNORs.

Concluimos, portanto, que a técnica AgNOR em citologia oncológica urinária é um excelente auxílio no diagnóstico diferencial das lesões vesicais, usando-se os critérios quantitativo e qualitativo.



6. CONCLUSÃO

1- A técnica AgNOR é aplicável em citologia urinária, permitindo uma análise quantitativa e qualitativa dos pontos prata-positivos (as AgNORs), observados à microscopia óptica comum, em objetiva de 40x.

2- Há diferença estatística entre a contagem média das AgNORs do grupo controle e o grupo tumoral (que inclui os tumores uroteliais de baixo e de alto graus), com erro inferior a 6 % (2,9% de erro em cada grupo).

3- A análise quantitativa das AgNORs tem valor diagnóstico positivo para carcinoma urotelial vesical. Tem valor também no diagnóstico diferencial da graduação citológica tumoral, entre alto e baixo graus.

4- A análise qualitativa (morfológica) das NORs coradas pela prata contribui para a graduação citológica tumoral, porque concorre para o diagnóstico diferencial entre células uroteliais neoplásicas de alto grau *versus* de baixo grau de malignidade

5- Há uma probabilidade de acerto de 84% da verdadeira classificação histológica de cada um dos setenta (70) casos estudados, considerando-se o número médio das AgNORs, o diferencial de sua variação máxima e mínima e o seu padrão morfológico nos três grupos estudados, pelo método Jackknife, na análise discriminatória.



7. SUMMARY

Key words: urinary cytology, AgNORs, carcinoma and differential diagnosis.

The oncocytic urinary cytology is a reliable tool in diagnosis and follow-up of bladder tumor treatment as well as in the research of more aggressive forms of bladder cancer. According to the literature it is of great value especially in patients who continue shedding identifiable cancer cells in urinary material after treatment. They are at very high risk for development of invasive bladder cancer (Koss, 1992). AgNOR technique may be helpful for the cytological differential diagnosis of bladder urothelial tumors, especially between those with low malignancy degree and the reactive urothelial cells. This study consisted of paired cytohistological examinations of patients with (n=44) and without (n=26) primary vesical urothelial carcinoma. Evaluations were performed with urinary sediment slides, previously stained by hematoxylin-eosin, unstained, impregnated by colloidal silver (AgNOR technique) and analyzed under common optic microscope (40 x). Control (non neoplastic) and neoplastic cases with low and high malignancy degree were investigated. Our principal aim was to correlate quantitative (counting) and morphological qualitative (subjective) analyses of silver-positive nuclear dots in both cases. The averages of the counted dots showed a statistically significant difference in both cases ($p < 0,001$ - Mann-Whitney's test). The graphic of AgNORs distribution of the neoplastic cases is similar to a logarithmic curve (normal log). The critical cut-off value of 2,96 AgNORs dots was determined in the intersection of the distribution curves of AgNOR dots in control and tumoral groups. There was 2,9% of false negatives cases below this value and 2,9% of false positives above it.

AgNOR morphology was classified into homogeneous and heterogeneous pattern. Control group presented the former in all cases. In the neoplastic group with low malignancy degree, 15/19 cases had the homogeneous pattern and in those with high degree, 15/25 had the heterogeneous pattern. According to AgNOR morphology, there are significant differences between tumoral and control cases ($p < 0,001$) and between those with low and high malignancy degree ($p = 0,001$ - Fisher's tests). Thus, AgNOR technique can be useful to aid in the differential diagnosis in oncotic urinary cytology by using qualitative and quantitative criteria.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABENOVA, M.T.; SHIBANOVA, M.I.A.C.; GAVRILOVA, E. A. Examination of nucleolar organizers activity in determination grade of transitional cell bladder cancer. *Acta Cytol.* **39**: 268, 1995.
2. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Molecular Biology of the Cell*. 3.ed. New York, Garland. 1994.
3. ALÓS, L.L.; MADERUELO, F.; ESTEVE, R.; SOLÉ, M.; BARRANCO, M.A.; CARDESA, A. Value of post-surgical bladder wash cytology to predict early transitional cell carcinoma recurrences. *Acta Cytol.* **39**: 268, 1995.
4. ANONYMOUS. NORs; a new method for the pathologist. *Lancet* **2**:1413-4, 1987.
5. AYRES, J.; CROCKER, J. & SKILBECK, N. Differentiation of malignant from normal and reactive mesothelial cells by the argyrophil technique for nucleolar organizer region associated protein. *Thorax* **43**:366-70, 1988.
6. BAAK, J.P.A.; LANGLEY, F. A.; HERMANS, J. Análise multivariada. In: *A Manual of Morphometry in Diagnostic Pathology*. BAAK, J.P.A. & OORTZ, J. (ed.) Berlin; Springer-Verlag. 1983; p. 27-40.
7. BARSOTTI, P.; ASCOLI, V.; NARDI, F.; MARINOZZI, V. Silver staining on interphase nucleolar organizer regions in cytologic smears previously stained by Papanicolaou and May-Grunwald-Giemsa technique. *Diagn. Cytopathol.* **6**: 289-96, 1990.
8. BOLDY, D.A.R.; CROCKER, J.; AYRES, J.G. Application of the AgNOR method to cell imprints of lymphoid tissue. *J. Pathol.* **157**:75-9, 1989.
9. BORTZ, J.; LIENERT, G.A.; BOEHNKE, K. *Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik*. [Métodos paramétricos em bio-estatística]. Berlin. Springer-Lehrbuch. 1990. p.427.
10. CAIRNS, P.; SUAREZ, V.; NEWMAN, J.; CROCKER, J. Nucleolar Organizer Regions in Transitional Cell Tumors of the Bladder. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **113**:1250-3, 1989.

11. CARRILLO, R.; SNEIGE, N.; EL-NAGGAR, A.K. Interphase Nucleolar Organizer Regions in the Evaluation of Serosal Cavity Effusions. *Acta Cytol.* **38**: 367-72, 1994.
12. CLEMENT, T.; VISSEAU-COLETTO, B.; ADNET, J.J.; PLOTON, D.; LARDENNOIS, B. Nucleolar organizers in superficial bladder tumors. Prognostic analysis of 37 observations. *Prog. Urol.* **1**:216-29, 1991.
13. COHEN, J. Nominal scala agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol. Bull.* **70**:213-20, 1968.
14. COHEN, M.B.; WALDMAN, F.M.; CARROL, P.R.; KERSCHMANN, R.; CHEW, K.; MAYALL, B.H. Compararison of five histopathologic methods to assess cellular proliferation in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum. Pathol.* **24**: 772-8, 1993.
15. COLECHIA, M.; AGNELLI, T.; CARONNI, E.; LEOPARDI, O. Usefulness of morphometry and AgNOR counts to differetiate reactive and malignant mesothelial cells in pleural fluids. *Pathologica* **83**: 89-97, 1991.
16. COLECHIA M. & LEOPARDI, O. Evaluation of AgNOR count in distinguishing benign from malignat mesothelial cells in pleural fluids. *Pathol. Res. Pract.* **188**:541-4, 1992.
17. CROCKER, J. Nucleolar organizer regions. In *Current Topic in Pathol.* v. 82. UNDERWOOD, J.C.E. (ed). Pathology of the nucleus. Heidelberg. Springer Verlag. 1990; p. 91-149.
18. CROCKER, J. Nucleolar organizer regions in pathology. *Br. J. Cancer* **65**: 1-7, 1992.
19. CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J. Pathol.* **158**:185-8, 1989.
20. CROCKER, J.; & EGAN, M. Correlation between NOR sizes and numbers in non Hodgkin's lymphoma. *J. Pathol.* **156**: 223-39, 1989.

21. CROCKER, J. & McGOVERN, J. Nucleolar organizer regions in normal, cirrotic and carcinomatous livers. **J. Clin. Pathol.** **14**: 1044-8, 1988.
22. CROCKER, J. & NAR, P. Nucleolar Regions in Lymphomas. **J. Pathol.** **151**:111-8, 1987.
23. CROCKER, J. & SKILBECK, N. Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. **J. Clin. Pathol.** **40**: 885-9, 1987.
24. DELAHUNT, B.; RIBAS, J.; NANCEY, J. N.; BETHWAITE, P. B. Nucleolar organizer regions and prognosis in renal cell carcinoma. **J. Pathol.** **163**: 31-7, 1991.
25. DERENZINI, M.; BETTS, C.M.; CECCARELLI, C. & EUSEBI, V. Ultrastructural organisation of nucleoli in benign naevi and malignant melanomas. **Virchow's Arch. (B)** **52**: 343-52, 1986.
26. DERENZINI, M.; BETTS, C.; TRERÈ, D.; et al.. Diagnostic value of silver-stained interphasic nucleolar organizer regions in breast tumors. **Ultrastr. Pathol.** **14**:233-45, 1990a.
27. DERENZINI, M.; FARABEGOLI, F.; PESSION, A.; NOVELLO, F. Spacial redistribution of ribosomal chromatin in the fibrillar centres of human circulating lymphocytes after stimulation of transcription. **Experm. Cell. Res.** **170**: 31-41, 1987.
28. DERENZINI, M.; NARDI, F.; FARABEGOLI, F.; OTTINETTI, A.; RONCAROLI, F.; BUSSOLATI, G. Distribution of silver stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from nonneoplastic reactive cells in human effusions. **Acta Cytol.** **33**: 491-8, 1989.
29. DERENZINI, M.; ROMAGNOLI, T.; MINGAZINI, P.; MARINOZZI, V. Interphasic nucleolar region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. **Virchow's Arch. (B)** **54**: 334-40, 1988.

30. DERENZINI, M. & PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cell. **Int. Rev. Exp. Pathol.** **32**: 149-92, 1991.
31. DERENZINI, M. & TRERÈ, D. Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumor pathology. **Virchow's Arch. (B)** **61**:1-8, 1991.
32. DE VOOGT, H.J.; RATHERT, P.; BEYER-BOON, M.E. In: **Urinary Cytology**. Berlin. Springer-Verlag. 1977; 193 p.
33. DiBONITO, L.; MUSSE, M. M.; DUDINE, S.; FALCONIERI, G. Cytology of Transitional-cell of the Urinary Bladder: Diagnostic Yield and Histologic Basis. **Diagn. Cytopathol.** **8**: 124-7, 1992 .
34. DUNN, O.J. Multiple comparisons among means. **J. Amer. Statist. Assoc.** **56**: 52-64, 1961.
35. EGAN, M. & CROCKER, J. Nucleolar organizer regions in pathology. **Br. J. Cancer** **65**: 1-7, 1992.
36. EGAN, M.; RAAFAT, F.; CROCKER, J. & SMITH, K. Nucleolar organiser regions in small round cell tumors of childhood. **J. Pathol.** **153**:275-80, 1987.
37. ESPOTI, P.L. & ZAJICEK, J. Grading of transitional cell neoplasms of the urinary bladder from smears of bladder washings. A critical review of 326 tumors. **Acta Cytol.** **16**:529-37, 1972.
38. FARROW, G. Urine Cytology of Transitional Cell Carcinoma. Diagnostic Efficacy. In: **Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases**. 4.ed. Philadelphia J.B. Lippincott; p. 302-6, 1992.
39. FRANKS, L. M. Cancer of the bladder-an overview. In: **Bladder Cancer** Butterworths International Medical Reviews. SMITH, P.H. & PROUT Jr., G.R. (ed.). London. Butterworths & Co. 1984. p. 1-11.

40. GIRI, D.D.; NOTTINGHAM, J.F.; LAWRY, J.; DUNDAS, S.A.C., UNDERWOOD, J.C.E. Silver binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. **J. Pathol.** **157**:307-13, 1989.
41. GLANTZ, S.A. **Primer of Biostatistics**. 2nd ed. New York. McGraw-Hill. 1987.
42. GOESSENS; G. Nucleolar struture. **Int. Rev. Cytol.** **87**, 107-58, 1984.
43. GOESSENS; G.; THIRY, M.; & LEPONT, A. Relations between nucleoli and nucleolus organising regions during the cell cycle. In: **Chromosomes Today**. STAHL, A. LUCINI, J.M. & VAGNER CAPODANO, A.M. (eds). v 9. London. Allen and Unwin, pp 261-71. 1987.
44. GOODPASTURE, C. & BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma** **53**: 37-50, 1975.
45. GRIFFITHS, A.P.; BUTLER, C. W.; ROBERTS, P.; DIXON, M.F. & QUIRKE, P. Silver stained structures (AgNORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. **J. Pathol.** **159** 121-7, 1989.
46. HANSEN, A.B.; BJERREGAARD, B.; OVESEN, H., HORN, T. AgNOR counts and histological grade in stage pTa bladder tumors : reproducibility and relation to recurrence pattern. **Histopathol.** **20**: 257-62, 1992.
47. HELPAP, B. & LOSEVITZ, L. Significance of AgNOR Analyses of Urothelial Carcinoma. **Versch. Dtsch. Ges. Path.** **77**: 222-5, 1993.
48. HERNANDEZ-VERDUN, D.; DERENZINI, M.; BOUTEILLE, M. Relationship between the AgNOR proteins and ribosomal chromatin *in situ* during-induced RNA synthesis inhibition. **J. Ultrastr. Res.** **88**: 55-65; 1984.

49. HERNANDEZ-VERDUN, D; HUBERT, J. ; BOURGEOIS, C. A.; BOUTEILLE, M.
Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. **Chromosoma (Berl)** 79:349-62, 1980.
50. HOWELL, W.M.; DENTON, T.E.; DIAMOND, J.R. Differential staining of satellite regions of human acrocentric chromosomes. **Experientia** 31:260-2, 1975.
51. HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. **Experientia** 36:1014-5, 1980.
52. HOWELL, W.M. Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). New York. Nucleus Academic Press. **The Cell** 11:89-142, 1982.
53. HSU, T.C.; SPIRITO, S.E. & PARDUE, M.L. Distribution of 18 + 28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromosoma** 53: 25-36, 1975.
54. JEWETT, H.J. & STRONG, G.H. Infiltrating carcinoma of bladder: Relation of depth of penetration of bladder wall to incidence of local extension and metastases. **J. Urol.** 55: 366-72, 1946 In: MARSHALL, V.F. 1962.
55. KANANN, V. & BOSE, S. Low Grade Transitional and Instrument Artifacts. A Challenge in Urinary Cytology. **Acta Cytol.** 37:899-902, 1993.
56. KODOUSEK, R. & DUSEK, J. Demonstration of the nucleolar region by silver staining (AgNOR method) in research and histopathological practice. **Acta Univ. Palacki Olomuc. Fac. Med.** 131: 9-37, 1991.
57. KOSS, L.G. **Tumors of the urinary bladder.** Atlas of Tumor Pathology. 2nd series, fascicle 11. Washington, D.C. Armed Forces Institute of Pathology. 1975. 120 p.
58. KOSS, L.G. **Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases.** 4.ed. Philadelphia J.B. Lippincott, 1992.
59. KOSS, L.G.; DIETCH, D.; RAMANATHAN, R.; SHERMAN, A.B. Diagnostic value of cytology of voided urine. **Acta Cytol.** 29:810-6, 1985.

60. LACHENBRUCH, P.A. **Discriminant analysis**. New York. Hafner Press. 1975.
61. LEEK, R.D.; ALISON, M.R.; SARRAF, C.E.. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. **J. Pathol.** **165**: 43-51, 1991.
62. LIM, S.M.; DUGGAR, M.A.; RUFF, M.; RABIM, S.; McGREGOR, E.; GREEN, F.H.Y. Morphometric analysis of nucleolar organizer regions in benign and malignant peritoneal effusions using back-scattered electron microscopy. **J. Pathol.** **166**: 53-60, 1992.
63. LIMAS, C.; BIGLER, A.; BAIR, R.; BERNHART, P.; REDDY, P. Proliferative activity of urothelial neoplasms: comparison of BrdU incorporation, Ki 67 expression and nucleolar organizer regions. **J. Clin. Pathol.** **46**: 159-65, 1993.
64. LIPPONEN, P.K. Image analysis of Ag-NOR protein in transitional cell bladder cancer. **J. Pathol.** **171**:279-83, 1993.
65. LIPPONEN, P.K. & ESKELINEN, M.J. Nucleolar organizer regions (NORs) in bladder cancer; relation to histological grade, clinical stage and prognosis. **Anticancer Res.** **11**:75-80, 1991.
66. LIPPONEN, P.K. & ESKELINEN, M.J. Argyrophilic nucleolar organizer in transitional cell bladder tumors related to established prognostic factors, progression and independent prognostic value. **Oncol.** **49**: 133-8, 1992.
67. LIPPONEN, P.K.; ESKELINEN, M.J.; NORDLING, S. Nucleolar organizer regions (AgNORs) as predictor in transitional cell bladder cancer. **Br. J. Cancer** **64**:1139-44, 1991.
68. MANSOUR, P.; CROCKER, J.; NEWMAN, J. Lack of prognostic value of nucleolar organizer region enumeration in transitional cell carcinoma of the bladder. **Arch. Pathol. Lab. Med.** **114**:1261, 1990.

69. MARANDOLA, P.; LARDENNOIS, B.; PLOTON, D.; DERENZINI, M.; TRERÉ, D.; CAMPO, B.; VALENTINO, V.; TRONCI, A.; ROGGIA, A.; BROGGINI, P.; VICINI, D.; RUGGIERI, M.; MIRANDO, P.; IWEHA, C.; SPERONI, A. A New Marker for Early Detection and Indicator of Progression of Cancer of the Bladder. *Eur. Urol.* **21**:31-3, 1992.
70. MARSHALL, V.F. The relation of the preoperative estimate to the pathologic demonstration of the extent of vesicle neoplasm. *J. Urol.* **68**:714-23, 1962.
71. MARTIN, H.; HUGNAGL, P.; BEIL, M.; WENZELIDES, K.; GOTTCALK, J.; RAHN, W. Nucleolar organizer region-associated proteins in cancer cells. Quantitative investigations on gliomas, meningiomas, urinary bladder carcinomas and pleural lesions. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **14**: 312-9, 1992.
72. MASUDA, M.; NAGAMOTO, A.; HIROKAWA, M.; TAKANO, Y.; SHUIN, T. Nucleolar Organizer regions in bladder cancer: application to urinary cytology. *Urology* **44**: 194-8, 1994.
73. MELLO, M.L.S. Nucléolo-Estrutura-Ultra-Estrutura e Composição. A Biogênese de ribossomos e outras funções . In: *Biologia Celular*. VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. (ed.). São Paulo. Atheneu. 1987. p.184-95.
74. MURPHY, W.M; SOLOWAY, M. S.; JUKKOLA, A. F.; GRABTREE, W.N. AND FORD, K.S. Urinary cytology and bladder cancer. The cellular features of transitional cell neoplasms. *Cancer* **53**: 1555-65, 1984.
75. OOMS, E.C.M. & VELDHWIZEN, R.W. Argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region in bladder-tumors. *Virchow's Arch. (A)* **414**: 365-9, 1989
76. PIATON, E.; RAVIGNEAUX, M.H.; BERGER, N.; PELLET, H PERRIN, P. A study of falsely negative results of urinary cytology in follow-up of bladder tumors. *Acta Cytol.* **37**:614, 1993.

77. PIATON, E.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J.J. Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem. J.** **18**:5-14, 1986.
78. RIFE, C.C., FARROW, G.M., UTZ, D.C. Urine cytology of transitional cell neoplasm. **Urol. Clin. North Am.** **6**: 599-612, 1979.
79. RÜSCHOFF, J.; BITTINGER, A.; NEUMANN, K.; & SCHMITZ-MOOR-MANN, P. Prognostic significance of nucleolar organizer regions (NORs) in carcinoma of sigmoid and rectum. **Pathol. Res. Pract.** **186**: 85-91, 1990a.
80. RÜSCHOFF, J.; NEUMANN, K.; CONTRACTOR, H.; PLATE, K.; THOMAS, C. Nucleolar Organizer Regions (NORs). Basic Concepts and Practical Application in Tumor Pathology. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** **116**: 480-5, 1990b.
81. RÜSCHOFF, J.; PLATE, K. H.; BITTINGER, A. & THOMAS, C. Nucleolar Organizer Regions (NORs). Basic Concepts and Practical Application in Tumor Pathology. **Path. Res. Pract.** **185**: 878-85, 1989.
82. RÜSCHOFF, J.; PLATE, K. H.; CONTRACTOR, H.; KERN, S.; ZIMMERMAN, R. & THOMAS, C.. Evaluation of nucleolar organiser (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standartisation. **J. Pathol.** **161**: 113, 1990c.
83. RÜSCHOFF, J.; PLATE, K.H., MÜLLER, R., MAASBERG, M., THOMAS, C. Nucleolar Organizer Region-Associated proteins: A Diagnostic Tool in Cytology? In: **Recent results in Cancer Research.** V 133. Berlin. Springer-Verlag. 1993; p 81-89.
84. RÜSCHOFF, J.; ZIMMERMANN, R.; USHÖFER, B., THOMAS, C. Silver-Stained Nucleolar Organizer Proteins in Urothelial Bladder Lesions. A Morphometric Study. **Path. Res. Pract.** **188**: 593-8, 1992.
85. SACK, M. J.; ARTYMYSHYN, R. L.; TOMASZEWSKI, J. E.; GUPTA, P. K. Diagnostic Value Bladder Wash Cytology, with Special Reference to Low Grade Urothelial Neoplasms. **Acta Cytol.** **39**: 187-94, 1995.

86. SCHWARZACHER, H.G. & WACHTER, F. The nucleolus. In: **Anatomy and Embriology**. Berlin. Springer-Verlag; 1993; p 515-35.
87. SIEGEL, S. In: **Estatística não-paramétrica. Para as ciências do Comportamento**. São Paulo. Makron Books do Brasil. 1975. p 131-144; 228-51,
88. SKOPELITOU, A.; KORKOLOPOULOU, P.; PAPANICOLAOU, A.; CHRISTODOULOU, P.; THOMAS-TSAGLI, E.; PAVLAKIS, K. Comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organizer region staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. Correlation within other conventional pathologic parameters. **Eur. Urol.** **22** : 235-40, 1992.
89. SMITH, P.; SKILBECK, N.; HARRISON, A. & CROCKER, J. Effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. **J. Pathol.** **155**:109-12, 1988.
90. SPIEGEL, M. R. In: **Estatística**. 3. ed. São Paulo. Makron Books do Brasil Ltda. 1994. p304.
91. STEVENSON, W. In: **Estatística aplicada a administração**. São Paulo. Harbra Ltda. 1986. 495 p.
92. TAKEUCHI, T.; TANAKA, T.; OHNO, T.; YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, S. KURIYAMA, M.; KAWADA, Y.; MORI, H. Nucleolar organizer regions in rat urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxylbutyl) nitrosamine. **Virchow's Arch. (B)** **58**: 383-7, 1990.
93. TAKEUCHI, T.; NAGATANI, Y.; SUGIYAMA, S.; KOIDE, T.; SAKAI, S.; TANAKA, T., MORI, YAMAMOTO, N. KOBAYASHI, S. et al.. Application of the nucleolar organizer regions to urinary cytology and its computer-assisted image analysis. **Nippon-Hinyokika-Gakkai-Zasshi** **82**: 1494-503, 1991.
94. TORLONI, H. & BRUMINI, R. **Registro Nacional de Tumores**. Ministério da Saúde, 1978. 142p.

95. TREVISAN, M.S. **A técnica AgNOR no diagnóstico do câncer da mucosa col-retal: aplicação em exames citológicos.** Campinas, 1995. [Tese de Livre Docência-Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP]. 60p.
96. TREVISAN, M.S.; SOUZA, M.I.; MAGNA, L.A. Nucleolar Organiser Regions of Mesothelial and Carcinomatous Cells in Effusions. **Diagn. Cytopathol.** 9: 492-97, 1993.
97. UMIKER, W. Accuracy of cytologic diagnosis of cancer of urinary tract. **Acta Cytol.** 8: 183-93, 1964.
98. UNDERWOOD, D.C.E. In: **The Nucleus.** Berlin. Springer-Verlag, 1990.
99. UNDERWOOD, D.C.E. & GIRI, D.D. Editorial: nucleolar organizer regions as a diagnostic discriminants for malignancy. **J. Pathol.** 155: 95-6, 1988.
100. UNION INTERNATIONALE CONTRE LE CANCER (UICC). **TNM Classification of Malignant Tumors.** Geneva: UICC, 1978.
101. VURAL, G.; RYD, W.; WARLEBY, B. Diagnostic value of urine cytology of low-grade transitional cell carcinoma. **Acta Cytol.** 37:633, 1993.
102. WALKER, R.A. Commentary: The histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. **Histopathology** 12:221-3, 1988.
103. WEBB, J.N. The pathology of bladder cancer. In: **Bladder Cancer** Butterworths International Medical Reviews. SMITH, P.H. & PROUT Jr., G.R. (ed.). London. Butterworths & Co. 1984. p. 104-24.
104. WIENER, H.G.; VOOIJS, G.P.; HOF-GROOTENBOER, B. VAN'T. Accuracy of Urinary Cytology in the Diagnosis of Primary and Recurrent Bladder Cancer. **Acta Cytol.** 37:163-9, 1993.

BIBLIOGRAFIA

1. ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas - Normas para publicação de dissertações e teses. 1989.
2. FERREIRA. A.B. de H. Novo Dicionário da Língua Portuguesa. 2ed. Rio de Janeiro. Ed. Nova Fronteira. 1994. 1838p.
3. GOMIER, M. & DELAMARE, V. Dicionário de Termos de Medicina. 20.ed. São Paulo. Organização Andrei Editora Ltda. 1984. 1114p.
4. OSOL; A. et al. Dicionário Médico Blakiston. 2ed. São Paulo. Organização Andrei Editora Ltda. s/data. 1169p.
5. Programas de Computadores de bioestatística: GLANTZ- Microsoft of biostatstics, 1987. WINSTAT-Microsoft de estatísticas para Windows, 1994.



9. ANEXOS

ANEXO 1

8.1. CASUÍSTICA E MÉTODOS- MODELO DE PROTOCOLO

EXAME UROCITOLÓGICO	
Paciente:
HC.....	idade:..... sexo:..... cor:.....
Ocupação:.....	fumante: () sim () não
História urológica pregressa:
História urológica atual:
() Radioterapia da pélvis, há quanto tempo ?
() Quimioterapia - citar droga:
() BCG intravesical.	
() Medicamentos em uso (citar):

Exame cistoscópico:

Diagnóstico clínico:

Material enviado:- () urina espontânea () urina sondada	
() lavado vesical () escovado () urina de ureter () D () E	
Biópsia concomitante () sim () não. Local

Resultado(s) anterior(es) de citologia ou
biópsia

8.2. ANEXO-RESULTADOS QUANTO AO ESTÁDIO

Frequência quanto ao estágio, segundo a classificação de JEWETT, STRONG e modificada por MARSHALL (1962), (baseada no exame das evidências histológicas de extensão tumoral), que segue: **0**- o tumor está limitado ao urotélio, não havendo infiltração para a lâmina própria; corresponde a um carcinoma papilífero *in situ*; **A**- infiltra a lâmina própria da mucosa vesical ou o próprio conjuntivo da haste papilífera; **B1**- infiltra a camada muscular superficial; **B2**- há infiltração da muscular profunda; **C**- o tecido adiposo perivesical está infiltrado; **D**- há metástases e **M**- metástases distantes presentes.

Obtivemos a seguinte frequência de casos citológicos tumorais: Estádio- 0=15, A=16, B=11, C=02, totalizando quarenta e quatro (44) casos. Os Ca *in situ* (E0) e os superficialmente infiltrativos (EA) foram n= 31, correspondendo a 70,4% dos casos. Os infiltrativos na parede muscular (EB) e na gordura perivesical (EC) foram n=13, que correspondem a 29,6% da amostra estudada.

ANEXO 2 - TABELA 7 - FREQUÊNCIA da DISTRIBUIÇÃO DO ESTÁDIO (JEWETT-STRONG e MARSHALL, 1962) NOS GRUPOS TUMORAIS: 2 (TU de BAIXO GRAU) e 3 (TU de ALTO GRAU).

GRUPOS	EST.0	EST.A	EST.B	EST.C	TOTAL
2	13	06	00	00	19
3	02	10	11	02	25
TOTAL	15	16	11	02	44

teste de Spearman: $r=0,16306$ e $p=0,29$, com $n=44$.

ANÁLISE ESTATÍSTICA: - pelo teste de Spearman, não foi observada correlação significante entre os valores de AgNORs e o estágio tumoral (histologicamente determinado), obtendo-se $r=0,16306$ e $p=0,29$, com $n=44$ (programa WINSTAT, 1994).

8.3. ANEXO- COMPARAÇÃO CITO-HISTOLÓGICA

1 - QUANTO AO GRAU :

Os resultados citológicos em material corado pela hematoxilina-eosina, classificados em três grupos: negativo, tumor de baixo grau e tumor de alto grau (KOSS, 1992) foram comparados com os da graduação histológica (KOSS, 1975). Excluíram-se cinco (5) casos citológicos de resultados positivos para neoplasia, porém não graduados em alto ou baixo grau. Destes n=3 eram tumores de baixo grau e n=2, tumores de alto grau, na histologia.

ANEXO 3.1. - TABELA 8 - GRADUAÇÃO CITOLOGICA (KOSS, 1992) versus GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA (KOSS, 1975) nos GRUPOS 1 (CONTROLE), 2 (TU de BAIXO GRAU), 3 (TU de ALTO GRAU).

GRADUAÇÃO CITOLÓGICA	GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA TUMORAL de KOSS			TOTAL
	1- NEG	2-BG	3-AG	
1-Negativa	26	--	--	26
2- Tu Baixo Grau	--	12	04	16
3-Tu Alto Grau	--	07	16	23
Total	26	19	20	65

Tu B. G.= tumor urotelial de baixo grau de malignidade (G1 e G 1-2).

Tu A. G.= tumor urotelial de alto grau de malignidade (G 2 a G 3).

Correlação Kappa-ponderada, de concordância de acerto (n=65)

K=0,8835

p<0,05

ANÁLISE ESTATÍSTICA: - há uma boa concordância de acerto, pelo teste "Kappa-ponderada" (COHEN, 1968), com n=65, K=0,8835 e p<0,05, na comparação da graduação citológica versus graduação histológica, que consta na tabela acima.

2 - QUANTO AO ESTÁDIO TUMORAL :

Um teste de correlação por postos Kendall T (tau) (SIEGEL, 1975) foi aplicado para correlacionar os resultados citológicos com os do estágio histológico tumoral, onde se consideraram todos os casos citológicos estudados (n=70). Obtivemos o $T(\text{tau})=0,87343$, $p<0,001$ ($p=1,1 \times 10^{-26}$) (WINSTAT, 1994) e concluímos que existe uma boa correlação positiva entre estes resultados, conforme tabela abaixo.

Convém observar que os casos citológicos de baixo grau tumoral estão mais concentrados nos estádios histológicos: 0 (*in situ*) e A (limitado à lâmina própria da mucosa). Respectivamente, os de alto grau citológico correspondem a piores estádios tumorais (B e C). Há uma área elipsóide oblíqua, da esquerda para a direita, de tendência central, na tabela 9, portanto, com a piora do grau citológico, há uma piora do estágio tumoral.

ANEXO 3.2 - TABELA 9 - CORRELAÇÃO dos RESULTADOS CITOLÓGICOS (KOSS, 1992) versus ESTÁDIO HISTOLÓGICO (J-S/M, 1962)

CITOLOGIA	ESTÁDIO HISTOLÓGICO					Total
	NEG.	0	A	B	C	
Negativa	26	--	--	--	--	26
Baixo grau	--	12	08	02	--	22
Alto grau	--	03	08	09	02	22
TOTAL	26	15	16	11	02	70

Teste de correlação de Kendall T (tau) (n=70)

$T(\text{tau})=0.87343$ $p<0,001$ ($p=1,1 \times 10^{-26}$) (programa WINSTAT, 1994).

ANÁLISE ESTATÍSTICA: - demonstrou-se existir uma boa correlação positiva entre os resultados citológicos *versus* estágio histológico ($p<0,001$), no nosso grupo de estudo.