

**FÁTIMA NEDER**

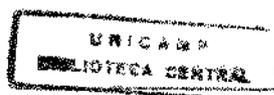
**REGIÕES ORGANIZADORAS DO NUCLÉOLO  
EM CARDIOMIÓCITOS DE RATO**

*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 Ciências  
na área de Anatomia Patológica*

Orientador: **Prof. Dr. Konradin Metze**

Campinas

1996



UNIDADE BC  
N.º CHAMADA:  
T/UNICAMP  
7.224  
V. E.  
TOMBO BC/30303  
PROC.281/97  
C  U   
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 21/05/97  
N.º CPDS 1.000 9.7490-9

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

Neder, Fátima

N284r Regiões organizadas do nucléolo em cardiomiócitos de rato/ Fátima Neder.  
Campinas, SP : [s.n.], 1996.

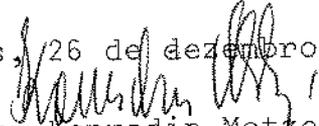
Orientador: Konradin Metze

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

1. Rato como animal de laboratório. 2. Miocárdio. 3. Região organizadora  
de nucléolos. 4. Células - proliferação. I. Konradin Metze. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Este exemplar corresponde à versão final da  
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Anatomia Patológica da  
Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, -  
para obtenção do Título de Mestre em Ciên-  
cias Área de Anatomia Patológica pela Biólo  
ga Fátima Neder.

Campinas, 26 de dezembro de 1996

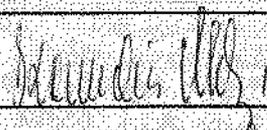
  
Prof. Dr. Konradin Metz - ORIENTADOR

# Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

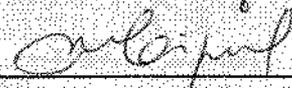
Orientador: Prof. Dr. Konradin Metzke

## Membros:

1. Prof. Dr. Konradin Metzke



2. Prof. Dra. Maria de Lourdes Higuachi



3. Prof. Dra. Albina Mesias de A.M. Altamami



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

Data: 26/12/1996

*Para Fernando, incondicionalmente*

*A meu pai, André Neder e à minha mãe,  
Doralice Ferraz da Silveira Neder, o berço do que  
hoje sou, pelo que conquistei e ainda tenho a  
conquistar.*

*A meus irmãos e sobrinhos.*

*A Lício Ferraz Neder, cuja saudade  
impulsionou-me a realizar este trabalho... pela  
conquista... (in memoriam)*

## **AGRADECIMENTOS**

---

*A todos os integrantes do Departamento de Anatomia Patológica.*

*Cada um, de alguma forma, direta ou indiretamente, prestou auxílio ou mesmo seu apoio, para a realização deste trabalho.*

*A meu orientador, Dr. Konradin Metze, pelo incentivo, amizade e confiança em mim depositados, na condução do meu trabalho, pela sua presença constante, firme e objetiva, tal qual um pai guiando seu filho, seja através de conselhos, sugestão do tema, análise estatística ou mesmo palavras amigas;*

*Ao Dr. Luciano de Souza Queiroz, pela sua consideração, pelas valiosas traduções e idéias, pela grande ajuda durante a execução do trabalho em computador, pelas técnicas e experiências transmitidas em microscopia, pelo seu lado humano sempre evidente;*

*Ao Dr. Athanase Billis, pela confiança em mim, como aluna e funcionária, pelo estímulo e grande auxílio no manuseio com o computador;*

*À Dr<sup>a</sup>. Albina M. A. M. Altemani, pelas sugestões, correções, conselhos, pela oportunidade;*

*À Dr<sup>a</sup>. Maria de Lourdes Higuchi, pelas sugestões e pela oportunidade;*

*Ao Dr. José Vassalo e a Dr<sup>a</sup>. Miriam A.S. Trevisan, pela oportunidade, sugestões e participação na banca de qualificação;*

*Às Dr<sup>as</sup>. Ilma Paschoal, Maria Leticia Cintra, Eliane M. Ingrid Amstalden, Liliana A. L. A. Andrade, e Prof. José Lopes de Faria, pelo, incentivo;*

*À Izilda Lourdes Passos Sene que lançou a semente, ensinando-me os primeiros passos na microscopia eletrônica;*

*À Geralda Domiciana Pádua e Marilucia Ruggiero Martins, pela colaboração técnica prestada, pela amizade, apoio, confiança e companheirismo de todas as horas, ofereço a oportunidade de conhecerem Noronha;*

*À Rosana Celestina Morandin, pelas brilhantes idéias, ajuda técnicas e preciosas referências bibliográficas;*

*A todos os amigos e famílias que vivem em Fernando de Noronha, pelo carinho e amor recebidos e, por Noronha, minha força inspiradora;*

*À Dr<sup>a</sup>. Cecília A. F. Escanhoela, pela ajuda na montagem e correção das tabelas, gráficos e legendas, ofereço mergulhos cristalinos em Fernando de Noronha;*

*Ao Marcos Fernando Santos Mello, pela capacidade de fluir Noronha, pela força e descontração, que permitiram não só neste trabalho, mas pela vida afora, minha determinação, meus limites, minha conquista;*

*Ao José Ozair S. de Oliveira, por trazer alegria, descontração e gratidão nos momentos das preciosas leituras e pelas correções em que me mostrava novos vocábulos. Pela paciência, sinceridade, ofereço a oportunidade de sentir Noronha;*

*A Alexandre Munhoz, amigo de todas as horas, pelo apoio constante, explicação no manuseio do computador, pela ajuda na execução deste trabalho;*

*À Maria Aparecida Francisco I, pelo auxílio na computação e Maria do Carmo Machado da Silva, pelo sorriso animador, paciência e pelas dicas sobre o manuseio do computador;*

*A Ernani Azevedo, pelas preciosas orientações sobre computador;*

*A Amilcar Castro de Mattos, pelo apoio e presença constantes nas horas difíceis na prática da computação;*

*Aos funcionários do Laboratório de Informática da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP;*

*Às colegas do Curso de Pós-Graduação, Christiane Pienna, Erni Cia, Terezinha Marques e Izilda Cardinalli, pela ajuda e companheirismo;*

*À seção de Apoio Didático da Faculdade de Ciências Médicas pela preciosa colaboração, em especial à Maria Elisabeth Dias Blois pela correção do Português; ao Emilton Barbosa de Oliveira pela montagem dos slides e à Renata Maia pelo trabalho de editoração.*

# SUMÁRIO

---

RESUMO.....	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVOS.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1. Animais de laboratório.....	12
2.2. Sacrifício.....	13
2.3. Preparação.....	13
2.4. Microscopia óptica.....	14
2.5. Análise qualitativa e quantitativa.....	15
2.6. Microscopia eletrônica.....	16
2.7. Análise estatística.....	18
3. RESULTADOS.....	20
4. DISCUSSÃO.....	47
5. CONCLUSÕES.....	57
6. SUMMARY.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8. ANEXOS.....	83

## LISTA DE FIGURAS E DIAGRAMAS

---

<b>Figura 1:</b> Cardiomiócito de rato com 16 dias i.u. Coloração para AgNORs. 1.250X...	29
<b>Figura 2:</b> Cardiomiócito de rato com 19 dias i.u. Coloração para AgNORs. 1.250X...	29
<b>Figura 3:</b> Cardiomiócito de rato com 21 dias i.u. Coloração para AgNORs. 1.250X....	30
<b>Figura 4:</b> Cardiomiócito de rato com 1,5 dias a.n. Coloração para AgNORs. 1.250X...	30
<b>Figura 5:</b> Cardiomiócito de rato com 8 dias a.n. Coloração para AgNORs. 1.250X.....	31
<b>Figura 6:</b> Cardiomiócito de rato com 21 dias a.n. Coloração para AgNORs. 1.250X...	31
<b>Figura 7:</b> Cardiomiócito de rato com 60 dias a.n. Coloração para AgNORs. 1.250X	32
<b>Figura 8:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 16 dias i.u., apresentando 3 nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 25.000X.....	32
<b>Figura 9:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 16 dias i.u., apresentando 3 “clusters” e 1 “dot”. Coloração para AgNORs. 25.000X.....	33
<b>Figura 10:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 19 dias i.u., apresentando 3 nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 50.000X.....	33
<b>Figura 11:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 19 dias i.u., apresentando 3 “clusters”. Coloração para AgNORs. 31.250X.....	34
<b>Figura 12:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 21 dias i.u., apresentando 2 nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 25.000X.....	34
<b>Figura 13:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 21 dias i.u., apresentando 4 “clusters”. Coloração para AgNORs. 12.000X.....	35
<b>Figura 14:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 1,5 dia a.n., apresentando 2 nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 25.000X.....	35
<b>Figura 15:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 1,5 dias a.n., apresentando 3 “clusters”. Coloração para AgNORs. 25.000X.....	36
<b>Figura 16:</b> Três núcleos de cardiomiócito de rato com 8 dias a.n., apresentando nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 10.000X.....	36

<b>Figura 17:</b> Dois núcleos de cardiomiócito de rato com 8 dias a.n., apresentando 2 “clusters” cada. Coloração para AgNORs. 10.000X.....	37
<b>Figura 18:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 21 dias a.n., apresentando 2 nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 12.500X.....	37
<b>Figura 19:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 21 dias a.n., apresentando 2 “clusters”. Coloração para AgNORs. 10.000X.....	38
<b>Figura 20:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 60 dias a.n., apresentando nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 10.000X.....	38
<b>Figura 21:</b> Núcleo de cardiomiócito de rato com 60 dias a.n., apresentando 3 “clusters”. Coloração para AgNORs. 12.500X.....	39
DIAGRAMA 1: médias das AgNORs medindo até 0,5 $\mu\text{m}$ .....	40
DIAGRAMA 2: médias das AgNORs medindo entre 0,6 e 1,0 $\mu\text{m}$ .....	40
DIAGRAMA 3: médias das AgNORs medindo entre 1,1 e 1,5 $\mu\text{m}$ .....	41
DIAGRAMA 4: médias das AgNORs medindo entre 1,6 e 2,0 $\mu\text{m}$ .....	41
DIAGRAMA 5: médias das AgNORs medindo entre 2,1 e 2,5 $\mu\text{m}$ .....	42
DIAGRAMA 6: médias das AgNORs medindo entre 2,6 e 3,0 $\mu\text{m}$ .....	42
DIAGRAMA 7: médias das AgNORs medindo entre 3,1 e 3,5 $\mu\text{m}$ .....	43
DIAGRAMA 8: médias das AgNORs maiores que 2,0 $\mu\text{m}$ .....	43
DIAGRAMA 9: médias dos núcleos com 2 AgNORs alinhadas.....	44
DIAGRAMA 10: médias dos núcleos com 3 ou mais AgNORs alinhadas.....	44
DIAGRAMA 11: médias dos núcleos com 3 ou mais AgNORs não alinhadas no eixo longitudinal.....	45
DIAGRAMA 12: médias dos núcleos com AgNORs alinhadas.....	45
DIAGRAMA 13: médias dos núcleos com AgNORs alinhadas (valores estandardizados).....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

RNA- ácido ribonucléico

rRNA- ácido ribonucléico ribossomal

mRNA- ácido ribonucléico mensageiro

DNA- ácido desoxirribonucléico

rDNA- ácido desoxirribonucléico ribossomal

RNP- ribonucleoprotéina

rRNP- ribonucleoprotéina ribossomal

M.O.- microscopia óptica

M.E.- microscopia eletrônica

nm- nanômetro

h- hora

s.- segundos

min- minutos

Ag<sup>0</sup>- prata metálica

Ag<sup>+</sup>- íons prata

PHA- fitoemaglutinina

g- grama

µm- micron

i.u.- intra-uterino

a.n.-após o nascimento

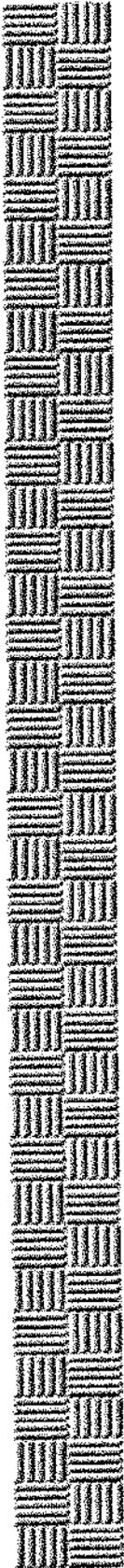
NORs- regiões organizadoras do nucléolo

AgNORs- regiões organizadoras do nucléolo argirófilicas

PCNA- antígeno nuclear de proliferação celular

Id mRNA- regulador negativo do gen de transcrição

K<sub>i-67</sub>- anticorpo monoclonal



## *Resumo*

As regiões organizadoras do nucléolo (NORs) são áreas de DNA extra ou intranucleolares, contendo genes que codificam o RNA ribossomal. Estas regiões têm grande afinidade com a prata, em virtude da presença de proteínas não- histonas associadas ao RNA ribossomal e, por isso, são chamadas de AgNORs.

O estudo das AgNORs tem sido utilizado predominantemente para avaliar proliferação celular, distinguir tumores malignos, de benignos, e como indicador prognóstico em neoplasias. Entretanto, a grande variedade de métodos utilizados para medir ou contar AgNORs, nos diferentes estudos, torna difícil a comparação de resultados.

A escassez de trabalhos que avaliem a morfologia e a evolução das AgNORs em tecidos normais em desenvolvimento, e a falta de estudos ultra-estruturais sobre estas regiões, que poderiam contribuir para uma padronização de sua contagem, estimulou-nos a essa pesquisa. O tecido escolhido para o estudo foi o do miocárdio de ratos em desenvolvimento intra e extra-uterino. Utilizamos o ventrículo esquerdo do coração de 95 ratos, entre o 16º dias após a concepção e 60º dias pós-parto, subdivididos em dois grupos: a) 16, 19 e 21 dias de vida pré-natal e b) 1,5, 8, 21 e 60 dias de vida pós-natal. Para o estudo em microscopia óptica (M.O.) utilizamos 74 animais e, para a microscopia eletrônica (M.E.), 21.

O material para M.O. foi fixado em formalina tamponada 10% durante 1 hora e incluído em parafina. Os cortes de 3µm foram desparafinados e corados pela técnica de AgNOR, descrita por CROCKER & NAR (1987). Como não encontramos na literatura uma técnica para evidenciar as estruturas das AgNORs em microscopia eletrônica, desenvolvemos um procedimento novo, empiricamente, no qual não utilizamos tetróxido de ósmio, acetato de uranila e citrato de chumbo, com o intuito de assegurarmos que qualquer precipitação elétron-densa poderia ser atribuída a prata.

As AgNORs foram subdivididas em "clusters" (que correspondem ao nucléolo) e pontos ("dots"). O estudo ultra-estrutural mostrou que, o "cluster" é constituído por um conjunto de precipitações de prata, interligadas entre si por faixas mais claras, dentro de uma matriz pouco elétron-densa. O "dot" é apenas uma precipitação escura, sem matriz. A partir destas observações, adotamos o critério de contar o cluster (nucléolo) como uma

unidade, visto que a contagem individual de precipitações de prata, dentro dele, pareceu-nos pouco reproduzível e arbitrária.

Os cardiomiócitos dos ratos fetais (16, 19 e 21 dias) e com 1,5 dias após o nascimento apresentaram um índice maior de “clusters” de AgNORs de grande tamanho, quando comparados com os de animais de 8, 21 e 60 dias após o nascimento. Esta diferença provavelmente está relacionada à atividade proliferativa da célula, que é maior na vida intra-uterina.

O aparecimento de maior quantidade de “dots”, nos animais com 60 dias de vida após o nascimento, foi interpretado como provável indicador de nova síntese protéica, necessária para o complexo miofibrilar.

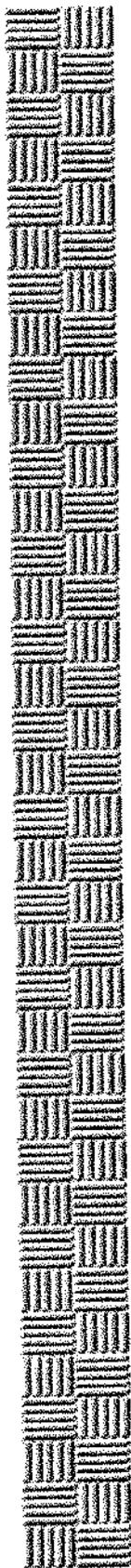
Qualitativamente, entre as idades de 16, 19 e 21 dias de vida intra-uterina e 1,5 dias pós-natal e entre 8, 21 e 60 dias após o nascimento, dificilmente conseguimos distinguir diferenças na estrutura morfológica dos “clusters” das AgNORs. Podemos observar diferenças em relação ao tamanho dos “clusters” das AgNORs, em todas as idades, com análise quantitativa.

Em determinados núcleos dos cardiomiócitos, encontramos duas, três ou mais AgNORs alinhadas, o que chamamos de fenômeno de alinhamento. Nas idades de 16, 19 e 21 dias de vida intra-uterina e 1,5 pós-natal foi encontrada uma baixa porcentagem das AgNORs alinhadas, enquanto nos núcleos dos animais com 8, 21 e 60 dias após o nascimento, o alinhamento das AgNORs apresentou maior frequência e quantidade.

A análise discriminante mostrou, para a separação das idades, que:

- a. os números dos núcleos com alinhamento das AgNORs, têm, em geral, importância maior que os números médios das AgNORs (57,3).
- b. dentro das variáveis que dependem do tamanho das AgNORs, as precipitações maiores que 2  $\mu\text{m}$  são as mais importantes (36,5).

Os dados morfométricos das AgNORs permitiram a determinação exata da idade do animal em 79,7% dos casos.



## ***1. Introdução***

O nucléolo é uma estrutura bem definida no núcleo da célula interfásica (DERENZINI, THIRY, GOESSENS, 1990c), tendo como principal função a síntese e o processamento do RNA ribossomal (DERENZINI *et al.*, 1983) além de estar envolvido na distribuição do RNA nuclear e citoplasmático (GOESSENS, 1984).

Ultra-estruturalmente é possível identificar em-se cinco componentes distintos no nucléolo: o centro fibrilar, o componente fibrilar denso, o componente granular, o interstício ou vácuolo nucleolar e a cromatina associada ao nucléolo (GOESSENS, 1984; DERENZINI *et al.*, 1983; DERENZINI *et al.*, 1990c; PLOTON *et al.*, 1987; RASKA, OCHS, MICHEL-SALAMANIN, 1990; UNDERWOOD, 1990).

- A) Os centros fibrilares são áreas elétrón-lúcidas, constituídas por filamentos com aproximadamente 2 nm de espessura, circundados pelo componente fibrilar. Grupos intranucleolares de cromatina condensada podem estar presentes em sua periferia. Os centros fibrilares são constituídos principalmente de proteína, ácido desoxirribonucléico (DNA) e, provavelmente, ácido ribonucléico (RNA). No núcleo interfásico estão os locais dos genes ribossomais nucleolares.
- B) O componente fibrilar denso é constituído por fibrilas de alta densidade, tendo aproximadamente 4 nm de diâmetro, contendo ribonucleoproteínas (RNP), as quais circundam o centro fibrilar, sugerindo uma relação funcional entre ambos. Estudos com auto-radiografias demonstraram que a transcrição de genes ácido desoxirribonucléico ribossomais (rDNA) ocorre no componente fibrilar e (ou) na periferia do centro fibrilar. O componente fibrilar denso é o local de síntese do pré-RNA ribossomal (rRNA). Quimicamente, contém DNA, RNA e proteínas.
- C) O componente granular é formado por grânulos com aproximadamente 15-20 nm de diâmetro, constituídos de partículas de RNP, as quais são encontradas na periferia do nucléolo, podendo representarem pré-ribossomos. Tais partículas são formadas nas proximidades do componente fibrilar, sendo posteriormente

liberadas como partículas pré-ribossomais e transportadas ao citoplasma como sub-unidades ribossomais.

D) O interstício ou vacúolos nucleolares são estruturas esféricas de baixa densidade que, freqüentemente, difundem-se por toda a região granular e normalmente estão em contato com o centro fibrilar e (ou) componente fibrilar. Provavelmente, funcionam como local de armazenamento e transporte de substâncias, como os precursores ribossomais.

E) A cromatina associada ao nucléolo está representada por pequenas extensões da cromatina perinuclear, as quais se conectam com grupos de cromatina intranucleolar, penetrando no interior do corpo nucleolar. Desta maneira, separa o corpo nucleolar do nucleoplasma, porém, mantém ligação com os centros e componentes fibrilares.

Segundo GOESSENS (1984), a morfologia ultra-estrutural nucleolar pode variar, dependendo do organismo, tipo celular e estado fisiológico das células. Nas células com alta atividade de síntese protéica, geralmente os nucléolos são maiores em relação às células menos ativas. A quantidade de síntese de DNA depende do número de nucléolos presente nas células (DERENZINI *et al.*, 1987).

A quantidade e o arranjo espacial dos componentes estruturais do nucléolo permitem classificá-lo em três principais tipos: nucléolo em forma de círculo, nucléolo tipo nucleolema e nucléolo compacto (SCHWARZACHER & WACHTLER, 1983; PLOTON *et al.*, 1987; GOESSENS, 1984; HERNANDEZ-VERDUN, 1986; DERENZINI & TRERÉ, 1991a).

A) Nucléolo em forma de círculo: possui um centro fibrilar único e localizado centralmente, circundado pelo componente fibrilar denso, estando, este último, envolto pelo componente granular, o qual pode variar morfologicamente, de acordo com a quantidade de ribonucleoproteína ribossomal (rRNP) processada. É de baixa atividade transcricional.

B) Nucléolo tipo nucleolema: é formado principalmente por uma rede tridimensional de componente fibrilar denso. Podem estar presentes pequenos centros fibrilares e (ou) pouca quantidade de material granular, porque, provavelmente, o processamento e a formação de rRNP não tenham ainda sido completados. Tal fato indica o início de uma alta atividade transcricional. Os componentes fibrilares são muito pequenos ou ausentes, sugerindo que as proteínas em estoque sejam usadas para formar o nucleolema.

C) Nucléolo compacto: possui muitos centros fibrilares, circundados pelos componentes fibrilar e granular. É completamente ativo, tendo atingido um equilíbrio de transcrição de precursores de rRNA, processamento e transporte ao citoplasma.

A região fibrilar, circundada pelo material denso fibrilar, corresponde à uma alta atividade transcricional. Grande área com material granular, margeando o local de transcrição, pode indicar produção e armazenamento de grânulos de rRNP.

Os diferentes tipos de nucléolo nunca são encontrados ao mesmo tempo em uma única célula. Diferentes tipos de nucléolo podem refletir diferentes formas de atividade funcional (GOESSENS, 1984). Durante o ciclo celular (mitose e interfase) ocorrem variações na morfologia ultra-estrutural nucleolar (GOESSENS, 1984; HERNANDEZ-VERDUN *et al.*, 1980; PLOTON, MENAGER, ADNET, 1985; PLOTON *et al.*, 1987; CROCKER, 1990):

Durante a mitose inicia-se o processo de condensação cromossômica e, proporcionalmente, ocorre diminuição da síntese de RNA, a qual é novamente sintetizada no final da telófase.

Na profase, os componentes nucleolares começam a se segmentar e desagregam-se; concomitantemente ocorre uma diminuição gradual no tamanho do nucléolo. A dispersão do componente fibrilar pode, morfologicamente, indicar cessação de síntese de DNA.

Nas fases de metáfase e anáfase existe pouca quantidade de proteínas argirófilicas, as quais podem ser visíveis sobre os cromossomos na metáfase; durante a anáfase, encontram-se na periferia. Devido à pequena quantidade de depósito de prata, dificilmente é possível distinguirem-se o centro fibrilar e o componente fibrilar denso.

Na telófase, geralmente num *locus* específico da constrição secundária do cromossoma, reaparece o nucléolo e torna-se possível distinguir os componentes nucleolares. Inicia-se o processo de nucleogênese e o nucléolo interfásico adquire sua constituição típica, a qual varia de um tipo celular para outro, provavelmente como resultado de vários graus de produção, processamento e exportação das partículas pré-ribossomais.

Durante a interfase, a célula é metabolicamente mais ativa, estando os seus componentes mais descondensados. É justamente nessa fase que ocorre o período de síntese e de intenso metabolismo da célula, sendo que tais atividades diminuem na mitose. A maior parte do ciclo celular ocorre na interfase, enquanto a mitose é um processo relativamente rápido.

As mudanças dos componentes nucleolares de uma célula para outra, e no mesmo tipo de célula, do repouso para o estado proliferativo, induzem uma variação na imagem e no tamanho nucleolar (GOESSENS, 1984). No nucléolo encontramos as regiões organizadoras do nucléolo (NORS), que são áreas de DNA extra ou intranucleolares, possuindo genes que codificam o rRNA (BROWN & SHAPIRRO, 1982 ; ALBERTS *et al.*, 1994 ; PERRY, 1976; BOQUIST, 1992).

No cariótipo humano, os genes ribossomais estão localizados na região organizadora do nucléolo (NOR) nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos de números 13, 14, 15, 21 e 22 (LEWIN, 1989; ZAKHAROV *et al.*, 1987; HOWELL, 1982).

A argirofilia da região organizadora do nucléolo deve-se à presença de proteínas não-histonas, associadas ao rRNA recentemente transcrito do DNA (HUBELL, ROTHBLUM, HSU, 1979; ANGELIER, HERNANDEZ-VERDUN, BOUTEILLE, 1982;

HERNANDEZ-VERDUN, DERENZINI, BOUTEILLE, 1982; HOWELL, 1982; HERNANDEZ-VERDUN & DERENZINI, 1983). As NORs estão associadas com proteínas argirófilicas, principalmente C<sub>23</sub> (nucleolina), B<sub>23</sub> (numatrina) e RNA-polimerase (CROCKER & EGAN, 1988; CROCKER, MACARTNEY & SMITH, 1988). Outras proteínas isoladas do nucléolo são: proteínas 100 KD, 90 KD e 80 KD e fosfoproteínas pp135 e pp105 (PFEIFLE, BOLLER, ANDERER, 1986; SPECTOR, OCHS, BUSCH, 1984; FAKAN & HERNANDEZ-VERDUN, 1986), cujas funções e estruturas exatas são desconhecidas. Estas proteínas, ultra-estruturalmente, durante a interfase, estão localizadas na proximidade do rDNA, principalmente no centro fibrilar (HERNANDEZ-VERDUN *et al.*, 1980; TRÖSTER *et al.*, 1985) e, em menor quantidade, no componente fibrilar denso (HERNANDEZ-VERDUN & DERENZINI, 1983; DERENZINI *et al.*, 1983).

Os centros fibrilares são considerados a duplicação interfásica da NOR e, durante os estágios de nucleologênese, mostram grandes depósitos impregnados pela prata, enquanto nos centros fibrilares densos, são pouco encontrados.

Há possibilidade de variação da estrutura morfológica das proteínas AgNORs e, dependendo do comportamento das NORs, a atividade transcricional apresenta-se baixa, podendo estar no início de uma atividade alta, ou, ainda, ser alta (CROCKER, BOLDY, EGAN, 1989; SCHWARZACHER, MIKESAAR, SCHNEDL, 1978).

Provavelmente, o grupo carboxi das proteínas ácidas envolvidas no processo da transcrição do RNAr, seja o responsável pela redução dos íons Ag<sup>+</sup> em prata metálica Ag<sup>0</sup> (SMITH & CROCKER, 1988).

CROCKER & NAR (1987) demonstraram que, as AgNORs podem ser visualizadas em cortes histológicos, as quais foram chamadas de regiões organizadoras do nucléolo argirófilicas (AgNORs) por PLOTON *et al.* (1986). A localização das NORs pode também ser visualizada por hibridização “*in situ*” com rRNA marcado (GOODPASTURE & BLOOM, 1974; WACHTLER *et al.*, 1986; HAMILTON, 1995; HOWELL & BLACK, 1980; HSU, SPIRITO, PARDUE, 1975).

Os dois métodos têm sido usados na citogenética para identificar NORs em células metafásicas, porém, o número de AgNORs nas células em interfase é menor que aquele das NORs detectáveis com hibridização “*in situ*”. Por isso, WACHTLER *et al.* (1986) concluíram que, somente NORs em atividade transcricional podem ser visualizadas com prata.

DERENZINI *et al.* (1983) demonstraram ultra-estruturalmente, que a distribuição espacial das NORs interfásicas, no corpo nucleolar, é responsável pela morfologia nucleolar, e que, diferenças entre tumores malignos e benignos, podem ser avaliadas ao se considerar o número e tamanho das NORs interfásicas (DERENZINI *et al.*, 1986).

Um experimento realizado por CROCKER (1990) em linfócitos humanos, mostrou que somente uma NOR é visível na interfase quando a célula está em repouso ( $G_0$ ). Após estimulação com PHA, SCHWARZACHER & WACHTLER (1983) e DERENZINI *et al.* (1987) detectaram aumento na atividade de transcrição e, conseqüentemente, maior número de NORs na fase  $G_1$ , persistindo nas fases S e  $G_2$  (PESSION *et al.*, 1991); porém, DERENZINI *et al.* (1987) observaram que o aumento ocorre antes de se iniciar a síntese de DNA.

SCHWARZACHER & WACHTLER (1983), também estudando a proliferação de linfócitos concluíram que, estas células em repouso no sangue periférico, possuem, em sua maioria, apenas um nucléolo em forma de círculo, o que corresponde a somente uma NOR positiva pela prata, em preparações cromossômicas condensadas. Poucas horas após a estimulação com fitoemaglutinina (PHA), vários pequenos nucléolos AgNOR-positivos aparecem, o que pode ser interpretado como ativação adicional de NORs. Depois, encontramos células com um ou, no máximo, dois grandes nucléolos com nucleolema, o que significa que as NORs ativadas transformam-se em confluentes e, 36 horas depois da estimulação, os nucléolos com nucleolema tornam-se compactos.

FIELD, FITZGERALD, SIN (1984) demonstraram que, os linfócitos após estimulação com PHA contêm mais AgNORs do que os não-estimulados.

DAS *et al.* (1986) encontraram em linfócitos no período neonatal, um maior número de AgNORs do que em linfócitos adultos. Então, de acordo com a idade, ocorreria uma diminuição na atividade de rRNA transcricional, evidenciando que as NORs estão relacionadas com a atividade celular.

GROTTO, LORAND-METZE, METZE (1990) e SMETANA & LIKOVSKY (1984), mostraram perda de sítios de AgNORs em estágios de maturação avançados de células granulocíticas e eritróides, em relação às fases de desenvolvimento. Ocorreu maior número de AgNORs nos estágios primários de células eritróides e mielóides, sendo que nas células maduras o número de AgNORs desaparece. O número de NORs, portanto, parece estar relacionado com a idade.

Ultimamente, a contagem de Ag-NORs tem sido usada como parâmetro de proliferação celular para diferenciar tumores malignos de benignos (DERENZINI *et al.*, 1988, 1989, 1991; SMITH & CROCKER, 1988; HOWAT *et al.*, 1988; SINN *et al.*, 1989; BOLDY, CROCKER, AYRES, 1989; MOHAMED *et al.*, 1989; MURRAY *et al.*, 1989; CROCKER *et al.*, 1988; CROCKER & EGAN, 1988; DERENZINI *et al.*, 1988; KHATTECH *et al.*, 1992). Porém, há divergências quanto à forma de avaliação das AgNORs, o que dificulta a comparação dos resultados. A maioria dos autores conta o número absoluto de precipitações de prata no núcleo (NAKAMURA *et al.*, 1992; SACKS *et al.*, 1992; KANITAKIS *et al.*, 1992; NIWA *et al.*, 1991, 1992); alguns autores fazem a contagem das AgNORs através do sistema de análise da imagem automática (DERENZINI & TRERÈ, 1991b; RÜSCHOFF *et al.*, 1990b; COLECCHIA & LEOPARDI, 1992; RIBOTTA *et al.*, 1992; EUSEBI *et al.*, 1991; DERENZINI, FARABEGOLI, TRERÈ, 1992; TRERÈ *et al.*, 1991). Há ainda, aqueles que dão ênfase à importância de critérios adicionais, subdividindo as AgNORs de acordo com suas diferenças morfológicas (OOMS & VELDHUIZEN, 1989; HANSEN & OSTERGARD, 1990; NIKICICZ & NORBACK, 1990; HANSEN & ANDERSEN, 1992). Outros autores usam dois métodos de contagem

de AgNORs: um, mais simples, que conta os “clusters” e AgNORs satélites e outro, que conta todas as AgNORs (“dots” e “clusters”), concluindo que o método mais simples foi o mais adequado (ALTEMANI *et al.*, 1995). Alguns autores valorizam a topografia, e separam as AgNORs de acordo com sua localização intra ou extranucleolar (EVANS, ORRELL, GRANT, 1991; RAYTER *et al.*, 1992). Há pesquisadores que diferenciam um ponto, que representa uma única precipitação em forma de pequeno ponto extranucleolar (TREVISAN, SOUZA, MAGNA, 1993; TREVISAN, 1995; CIA, TREVISAN, METZE, 1996) de um “cluster”, que é composto por um conjunto de precipitações de prata dentro de uma matriz, no nucléolo (CROCKER & NAR, 1987; CROCKER *et al.*, 1989), porém, poucos valorizam estes aspectos na análise quantitativa (RÜSCHOFF *et al.*, 1989; 1992). Esta diferenciação revelou-se útil na análise de células da hematopoiese normal e patológica (GROTTO *et al.*, 1990; GROTTO, LORAND-METZE, METZE, 1991; METZE & LORAND-METZE, 1991, 1992, 1993; GROTTO, METZE, LORAND-METZE, 1993).

Em trabalhos passados, vários autores conseguiram demonstrar que o padrão de AgNORs pode documentar alterações de proliferação e diferenciação celular e, por isso, concluíram que o estudo de AgNORs pode fornecer informações adicionais sobre a cinética celular (METZE & LORAND-METZE, 1991, 1993; LORAND-METZE, GROTTO, METZE, 1991; GILBERTI *et al.*, 1993; GILBERTI, METZE, LORAND-METZE, 1994, 1995; LORAND-METZE & METZE, 1995; CIA *et al.*, 1996; DERENZINI & TRERÈ, 1991a; DERENZINI, PESSION, TRERÈ, 1990b).

Há escassos estudos relativos às AgNORs em tecido cardíaco, embora os trabalhos com outros tecidos indiquem que as AgNORs poderiam dar informações importantes sobre a cinética celular. Conhecemos um único trabalho, no qual a técnica de AgNORs foi utilizada para demonstrar alterações em núcleos de cardiomiócitos, após aplicação de antraciclinas. Neste estudo, somente células atriais foram examinadas, através de microscopia óptica (LEBLANC *et al.*, 1993).

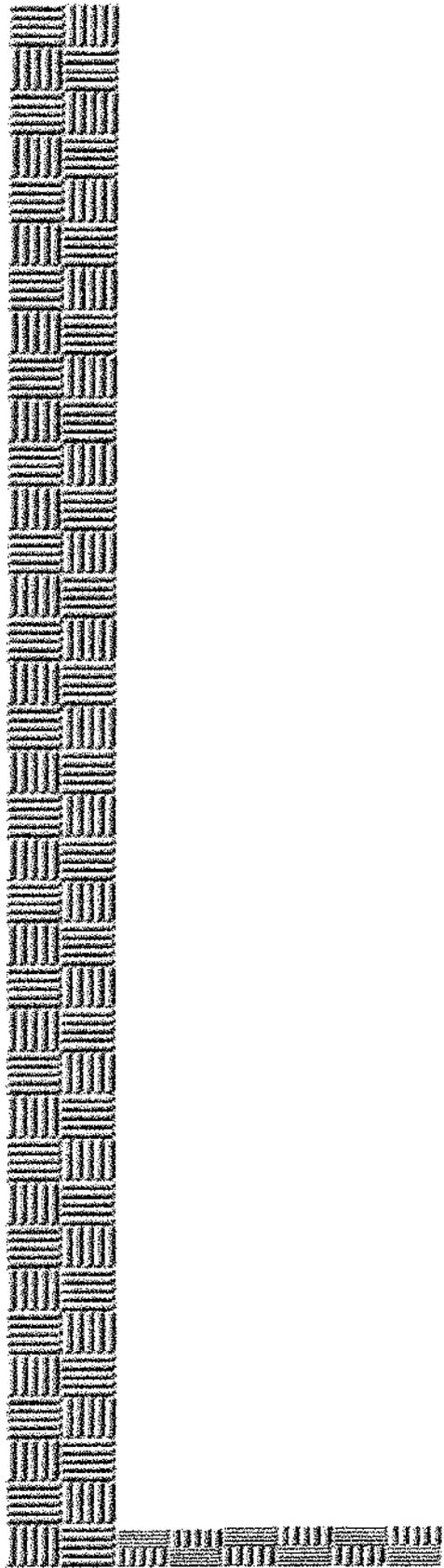
Na tentativa de definirem-se critérios para medir ou contar AgNORs em microscopia óptica, desenvolvemos uma técnica para o exame das regiões organizadoras do

nucléolo em microscopia eletrônica, já que não existem trabalhos sobre AgNORs em cardiomiócitos, e tampouco sobre as suas alterações, observadas por meio da microscopia eletrônica, durante o desenvolvimento fisiológico do coração.

## 1.1. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1 - Adaptar as técnicas, descritas na literatura, para visualização de AgNORs em cortes de parafina em coração de rato.
- 2 - Mostrar as diferenças morfológicas, caracterizando qualitativa e quantitativamente as AgNORs em cardiomiócitos do ventrículo esquerdo de rato, em diferentes idades da vida pré e pós-natal, em microscopia óptica.
- 3 - Desenvolver uma técnica para visualizar AgNORs de cardiomiócitos, em microscopia eletrônica.
- 4 - Definir critérios, a partir da morfologia de AgNORs em microscopia eletrônica e da morfologia em microscopia óptica, tendo por finalidade melhorar a forma de medir ou contar AgNORs.
- 5 - Com a caracterização do padrão "normal" em ratos, desenvolver a base para futuros experimentos com diversos modelos de doença.



## ***2. Material e Métodos***

## 2.1. ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Os animais utilizados neste trabalho foram fêmeas e machos da linhagem "Wistar", heterogêneos, ambos com idades entre 3 e 4 meses. As fêmeas, com peso variando de 200 a 250g e os machos, de 250 a 300g. Os animais foram fornecidos pelo centro multiinstitucional de Biotérios (CEMB), UNICAMP.

Os ratos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, em condições ambientais convencionais, com controle de 12 horas-luz e 12 horas-escuro. O tempo de adaptação ao biotério ficou estabelecido em 30 dias e não houve controle de temperatura e umidade relativa do ar.

Os animais foram alimentados com ração para ratos, obtida comercialmente (labina, purina) e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados durante as quatro estações do ano e, para se evitar a influência da variação diária sob a síntese de DNA, todos os animais foram sacrificados entre 9:00 e 12:00 horas, diariamente.

Para o cruzamento, foi realizada a sincronização dos ciclos estrais das fêmeas de uma mesma gaiola, tratando-as com urina dos machos, dois dias antes do acasalamento. O acasalamento foi feito pelo sistema de harém, com um macho e duas ou três fêmeas em cada gaiola. A ovulação, assim como o comportamento de aceitação durante o acasalamento com o macho, ocorrem no período do estro que, normalmente, acontece nas primeiras horas do dia, coincidindo com o comportamento noturno do animal (DONELLY, 1987).

Os animais foram acasalados uma a duas horas antes do final do período de 12 horas-luz (no final da tarde do primeiro dia). Na manhã do segundo dia (2 a 3 horas após o término do período de 12 horas-escuro), foram realizados os esfregaços vaginais das fêmeas e observada a presença ou não de espermatozóides (BACKER, 1979). Nas fêmeas em que se encontraram espermatozóides, este dia foi, então, considerado o dia zero, para fins de contagem do tempo de gestação e desenvolvimento embrionário (THEILER, 1972).

As ratas grávidas foram separadas em gaiolas, por sua vez, datadas e etiquetadas. Conforme os animais completavam as idades necessárias para o desenvolvimento do trabalho, foram sendo sacrificados.

## 2.2. SACRIFÍCIO

Os animais foram anestesiados com éter etílico e sacrificados com uma superdose do anestésico. O tempo de gestação das ratas variou de 20 até 23 dias e o número de fetos encontrados por fêmea variou entre 7 e 14.

RAKUSAN *et al.* (1978) em trabalho experimental, mostraram que o grau de proliferação celular cardíaca pode ser influenciado pelo grau de desenvolvimento do coração e, ainda relativamente independente da idade, durante o período pós-natal.

O grau de desenvolvimento do coração do rato pode ser alterado de acordo com o número de animais por ninhada. Assim sendo, o peso do coração pode variar entre os animais de pequenas ninhadas (4 ratos) e aqueles de grandes ninhadas (16 ratos), quando do desmame, em torno de 21 dias de idade.

Como o número de animais por ninhada pode afetar o peso do coração ou o número total de miócitos no ventrículo esquerdo, e considerando-se, também, que animais de pequenas ninhadas crescem mais rapidamente do que os de grandes (Rakusan *et al.*, 1978), não usamos ratas com menos de 6 filhotes.

## 2.3. PREPARAÇÃO

O trabalho foi realizado com o ventrículo esquerdo de corações de ratos com 16, 19 e 21 dias de vida intra-uterina (i.u.) e 1,5, 8, 21 e 60 dias de vida após o nascimento (a.n.). Usamos para o experimento um total de 95 animais, sendo que 74 foram utilizados no estudo em microscopia óptica (M.O.) e 21, em microscopia eletrônica (M.E.)

O quadro a seguir, mostra o número total de animais analisados em cada idade em M.O. e em M.E.

Idade dos animais	Número de animais	
	M. O.	M.E.
16 dias i.u.	10	3
19 dias i.u.	10	3
21 dias i.u.	10	3
1,5 dias a.n.	11	3
8 dias a.n.	11	3
21 dias a.n.	12	3
60 dias a.n.	10	3

## 2.4. MICROSCOPIA ÓPTICA

A técnica AgNOR usada para o desenvolvimento do trabalho em M.O. foi a descrita por CROCKER & NAR (1987), com modificações para o cardiomiócito.

### Técnica AgNOR :

A solução para a coloração das proteínas AgNORs foi preparada dissolvendo-se 1 volume de gelatina a 2% em solução de ácido fórmico a 1% e, 2 volumes de nitrato de prata a 50%.

A solução foi preparada sempre na hora do uso e filtrada com filtro millipore; a reação foi conduzida em temperatura ambiente e câmara escura.

Testamos, para a padronização do método, as seguintes variáveis:

- A) tempo de fixação em formalina tamponada 10%: 30', 40', 1h, 2h e 4h.
- B) tempo de reação com nitrato de prata: 25, 30, 35, 40 e 60 minutos.
- C) temperatura: ambiente, 40 e 60°C.
- D) pós-fixação em etanol-ácido acético (3:1): segundos até 30 minutos.

Após perfusão com formalina tamponada 10%, as amostras foram recortadas em pequenos fragmentos e fixadas em formalina durante 1 hora. Os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 2 absolutos) durante 15 minutos cada, e diafanizados em xilol, em temperatura de 37° C. Em seguida, foram realizados 2 banhos de parafina a 60° C e inclusão em parafina. Com a finalidade de se evitar que a temperatura interferisse nas proteínas, todo o experimento foi processado manualmente.

Cortes de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ , depois de passados pelo xilol-álcool, foram pós-fixados em etanol-ácido acético, na proporção 3:1, durante 30 minutos. Em seguida, foi efetuada, na hora do uso, a solução de impregnação com a prata, com 30 minutos de incubação no tecido. Os cortes foram lavados com ácido acético a 1%, desidratados em álcool-xilol, e montados com resina (entellan) e laminula. A pós-fixação com etanol-ácido acético (3:1) forneceu um fundo mais claro e as AgNORs ficaram bem visíveis, na cor marrom-preto.

## 2.5. ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Para a avaliação quantitativa em cortes de parafina, classificamos as AgNORs, de acordo com o seu tamanho (maior diâmetro), em 8 categorias:

- A)  $\leq 0,5 \mu\text{m}$ ;
- B) 0,6 - 1,0  $\mu\text{m}$ ;
- C) 1,1 - 1,5  $\mu\text{m}$ ;
- D) 1,6 - 2,0  $\mu\text{m}$ ;
- E) 2,1 - 2,5  $\mu\text{m}$ ;
- F) 2,6 - 3,0  $\mu\text{m}$ ;
- G) 3,1 - 3,5  $\mu\text{m}$ ;
- H)  $\geq 3,6 \mu\text{m}$ .

Após padronização da técnica e análise quantitativa das AgNORs, contamos 200 células por animal.

A contagem das AgNORs foi feita em M.O. sob objetiva de imersão e com o auxílio do micrômetro ocular, tendo sido, efetuada ainda, a medida do maior diâmetro de cada AgNOR (agrupamento em classes) e contagem do número, por classe e por núcleo, individualmente.

A análise qualitativa foi realizada em M.O., sob objetiva de imersão. Contamos 100 células por animal, de acordo com a morfologia e o número das AgNORs alinhadas, respeitando-se os seguintes parâmetros:

- a) disposição da orientação das AgNORs por núcleo: longitudinal, equatorial ou fora do eixo;
- b) número das AgNORs orientadas por núcleo: 2, 3 ou mais AgNORs;

Os resultados foram tabulados, calculando-se a média de AgNORs para cada caso, assim como a média para cada grupo.

## **2.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA**

### **A. Técnica AgNOR**

Testamos, para a padronização do método, as seguintes variáveis:

- A) Tempo de fixação em solução de Karnovsky: 30, 45, 60 e 120 minutos;
- B) Tempo de reação com nitrato de prata: 30, 45 e 60 minutos;
- C) Interferência da lavagem em etanol-ácido acético (3:1): segundos até minutos;
- D) Influência da contracoloração com citrato de chumbo em 10, 15 e 30 minutos;
- E) Influência da pós-fixação com tetróxido de ósmio a 4%;
- F) Influência da contra-coloração com acetato de uranila 0,5% em 10, 15 e 30 minutos;
- G) Influência da temperatura: ambiente, 40 e 60°C.

Os animais foram perfundidos com solução de Karnovsky (pH=7,2) (KARNOVSK, 1965) por um período de aproximadamente 10 minutos. Com o auxílio de uma lupa, o coração foi retirado e colocado numa placa de Petri. Foram, então, recortados pequenos fragmentos do ventrículo esquerdo, usados para o experimento.

Uma parte de cada amostra foi processada em microscopia eletrônica convencional, e o restante, processado fazendo-se a impregnação com nitrato de prata.

Os pequenos fragmentos obtidos foram fixados durante 1 hora em solução de Karnovsky (pH=7,2); em seguida, sofreram lavagem rápida em etanol-ácido acético (3:1), sendo incubados durante 30 minutos em solução composta por 1 volume de nitrato de prata (50%) e 1 volume de gelatina 2% dissolvida em ácido fórmico 1%.

A solução foi feita sempre na hora do uso e colocada nos fragmentos depois de filtrada com filtro millipore, sendo, a reação, realizada em câmara escura e temperatura ambiente, durante 30 minutos. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de álcool (30%, 50%, 70%, e 90%) durante 15 minutos cada, e incluídos em "Araldite", permanecendo na estufa a 60°C para polimerização dos blocos, durante 48 horas.

Depois de trimados e desbastados os blocos, efetuaram-se os cortes semifinos com navalhas de vidro, numa espessura em torno de 300 nm; posteriormente foram corados com azul de toluidina 2%, para uma melhor seleção de área com fibras longitudinais.

Os cortes ultrafinos foram executados com navalha de diamante (Diatome), no ultramicrotomo MT 6000 XL, com uma espessura de aproximadamente 90 nm; colocados em telas de cobre e diretamente examinados com o microscópio eletrônico EM 10 Zeiss.

Para obter-se maior segurança em relação à variação de espessura dos cortes, foram colocados nas telas de cobre somente aqueles que apresentaram a cor amarelo-ouro.

Para uma identificação segura das AgNORs, não usamos nenhuma contracoloração.

## **B. Técnica convencional**

Os fragmentos processados em microscopia eletrônica convencional, depois de fixados em solução de Karnovsky (pH= 7,2) durante 1 hora, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 4%, durante 2 horas. Em seguida, lavados com tampão cacodilato de sódio (pH=7,2) e “overnight” em solução de acetato de uranila 0.5%. A desidratação foi realizada em uma série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, e 90%), durante 15 minutos cada. As amostras foram colocadas em uma mistura de resina “Araldite” e acetona pura (1:1) e permaneceram no rotor por 2 horas. Após permanência em resina “Araldite”, na estufa a 60°C, por 1 hora, foram incluídas em resina “Araldite” pura e conservadas na estufa durante 48 horas, para polimerização dos blocos.

O procedimento usado até a obtenção dos cortes ultrafinos, foi o mesmo utilizado para aqueles impregnados com a prata (descrito anteriormente); porém, para a microscopia eletrônica convencional, foram corados com citrato de chumbo durante 10 minutos.

## **2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os métodos utilizados basearam-se no programa WINSTAT (1994).

### **Hipótese a ser testada:**

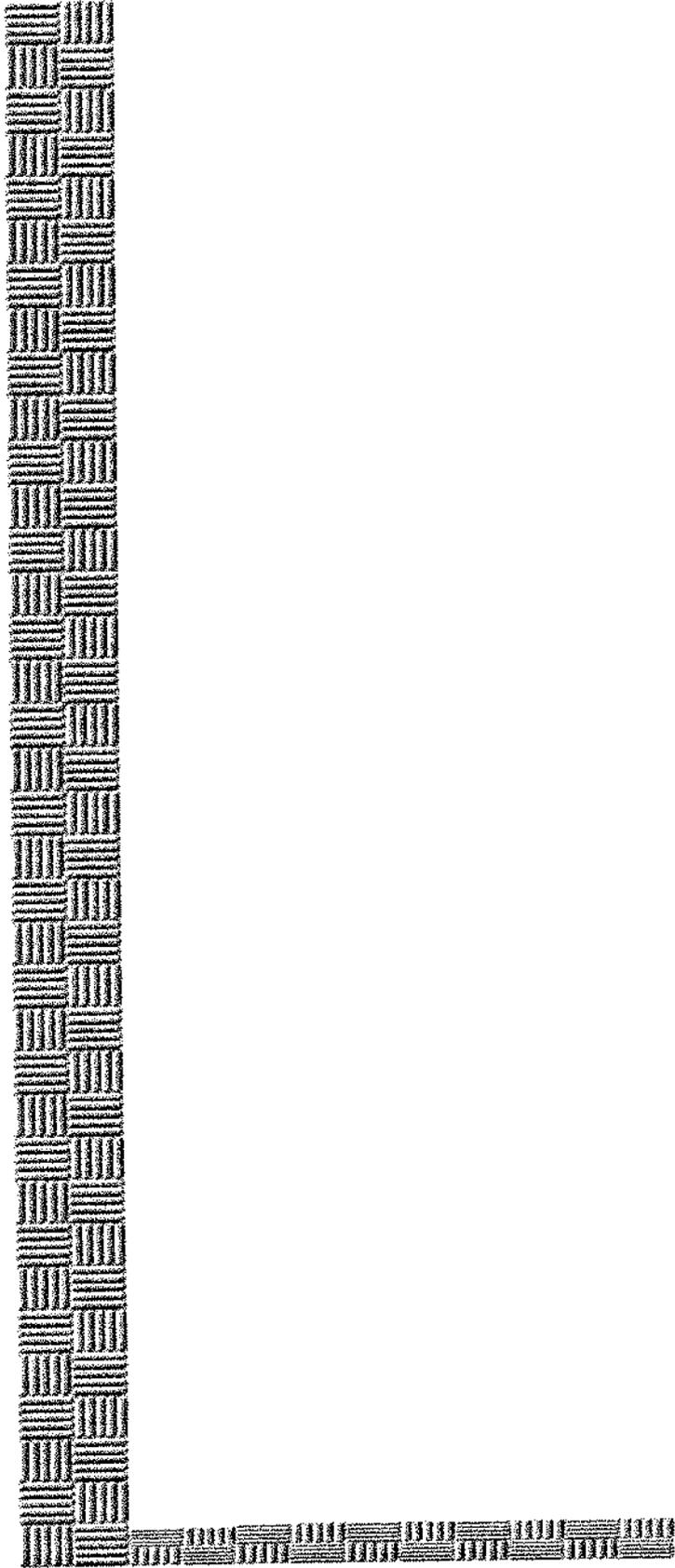
O perfil qualitativo e quantitativo das AgNORs em cardiomiócitos, num caso individual, permite, sem conhecimento de outros dados, a determinação da idade do animal.

Comparação das diversas classes das AgNORs entre os grupos de diferentes idades com o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn para comparações múltiplas.

Análise discriminante (análise multivariada) com as seguintes variáveis:

- variáveis independentes: média das AgNORs por classe e animal.
- variáveis dependentes: idade do animal.
- procedimento: “jackknife” e cálculo da matriz discriminatória.

Avaliação da porcentagem, corretamente classificada pela análise discriminatória.



### ***3. Resultados***

No desenvolvimento do trabalho, os melhores resultados em microscopia óptica foram obtidos com o seguinte protocolo:

- tempo de fixação em formalina tamponada 10%: 1 hora;
- pós-fixação em etanol-ácido acético (3:1): 30 minutos;
- tempo de impregnação com nitrato de prata: 30 minutos;
- temperatura: ambiente.

Não recomendamos o uso da mesma bateria por mais de oito vezes (aproximadamente) nas reações.

A pós-fixação com etanol-ácido acético (3:1) fornece um fundo mais claro e as AgNORs ficam bem visíveis, apresentando a cor marrom-preto.

As proteínas NORs de cardiomiócitos de ratos, fixadas com formalina 10%, foram preservadas, uma vez que foi possível a identificação das diferenças entre pontos e “clusters” e o estudo das mudanças do comportamento estrutural das AgNORs, de acordo com as diferentes idades, durante a vida intra-uterina e pós-natal, em microscopia óptica.

Todas as precipitações de prata com diâmetro maior que 0,6  $\mu\text{m}$  e que são formadas por pontos escuros e estão dentro de uma matriz, foram consideradas um “cluster”. Precipitações isoladas, não apresentando matriz circundando a periferia e com diâmetro medindo até 0,5  $\mu\text{m}$ , foram classificadas como ponto.

Em relação a análise qualitativa, a aparência morfológica dos “clusters” foi extremamente similar, quase que indistinguível, para as idades de 16, 19 e 21 dias pré-natal e 1,5 dias pós-natal. O mesmo ocorreu com o grupo formado pelos animais com idades de 8, 21 e 60 dias pós-natal. Entre estes dois grupos, porém, foi possível distinguir claramente a morfologia do “cluster” sozinho.

Dentro de cada grupo, a análise quantitativa mostrou diferenças significantes entre todas as idades (Diagramas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7).

As precipitações de prata apresentam forma variada, maior número e tamanho irregular, em todas as idades de vida intra-uterina (16, 19 e 21 dias) e 1,5 dias pós-natal. As AgNORs aparecem localizadas mais centralmente; poucas se encontram na periferia.

A estrutura dos "clusters" das AgNORs para as idades supracitadas é formada por um aglomerado de precipitações muito heterogêneo, sendo facilmente identificáveis os pontos dentro dos "clusters". Demonstramos aspectos característicos, através da coloração por impregnação pela prata (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Com o desenvolvimento dos animais nas idades de 8, 21 e 60 dias após o nascimento, as precipitações apresentam tamanho mais regular, menor número e forma menos variada. As AgNORs aparecem localizadas desde a periferia, direcionando-se para a região central. Nessas idades, as precipitações confluem (mais homogêneas) e torna-se difícil distinguir pontos individuais dentro de um determinado "cluster". A técnica de coloração por impregnação pela prata mostra aspectos característicos, conforme as idades mencionadas (Figuras 5, 6 e 7).

Durante o desenvolvimento, de acordo com as idades estudadas, ocorrem alterações morfológicas diferentes entre os números de pontos e "clusters". Nas idades de vida intra-uterina (16, 19 e 21 dias) e 1,5 após o nascimento, encontramos maior quantidade de "clusters" de AgNORs e, conforme ocorre a maturação do cardiomiócito, com o crescimento dos animais, (8, 21 e 60 dias), a quantidade dessas estruturas diminui.

Em virtude do escasso número de casos, todas as classes das AgNORs de maior tamanho (acima de 2,0  $\mu\text{m}$ ), foram agrupadas numa única classe. Tal procedimento foi realizado para todos os núcleos dos miócitos de todas as idades (Diagrama 8).

Observamos maior número de AgNORs com média 0,5  $\mu\text{m}$  (ponto) na idade de 21 dias de vida intra-uterina. Ocorreu redução no número médio das AgNORs com esse tamanho, nos animais com 21 dias pós-natal; porém, tal número eleva-se nos cardiomiócitos dos animais com 60 dias após o nascimento.

Os números médios das AgNORs, medindo acima de 0,6  $\mu\text{m}$  ("clusters"), mostraram um índice maior na idade de 21 dias de vida intra-uterina e um menor, na idade de 21 dias após o nascimento.

A soma do tamanho das AgNORs (pontos e "clusters"), para todas as idades, apresentou maior porcentagem na idade de 21 dias de vida intra-uterina e menor, na idade de 21 dias após o nascimento.

Nos núcleos dos miócitos dos animais de todas as idades, as AgNORs, por vezes, se localizam mais centralmente. Normalmente estão na mesma direção, obedecendo a um sentido equatorial, oblíquo ou longitudinal. Encontramos núcleos com duas, três ou mais AgNORs alinhadas, obedecendo a mesma direção, seja no eixo longitudinal ou não, o que chamamos de fenômeno de alinhamento.

Núcleos com duas, três ou mais AgNORs alinhadas no eixo longitudinal, apresentaram frequência relativamente baixa nas idades de vida intra-uterina (16, 19 e 21 dias) e 1,5 pós-natal. Ao contrário, as idades de 8, 21 e 60 dias após o nascimento, apresentaram aumento na frequência de núcleos com duas, três ou mais AgNORs alinhadas; porém, encontramos maior frequência de núcleos com duas AgNORs alinhadas, na idade de 21 dias de vida pós-natal. A maior frequência, com três AgNORs alinhadas, foi observada nos animais com 60 dias pós-natal (Diagramas 9, 10 e 11).

Nos núcleos de cardiomiócito de animais com 16, 19 e 21 dias de vida intra-uterina e 1,5 pós-natal, inicia-se o fenômeno de alinhamento, sendo encontrado, nestas idades, um baixo índice de AgNORs alinhadas. Este índice aumenta com o desenvolvimento e maturação dos miócitos, de acordo com as idades após o nascimento (8, 21 e 60 dias) (Diagrama 12).

Podemos observar, para todas as idades, a frequência dos núcleos com AgNORs alinhadas (valores standardizados) no Diagrama 13.

O maior coeficiente do alinhamento foi encontrado nos núcleos contendo duas AgNORs alinhadas no eixo longitudinal (57,3), ocorrendo diminuição do coeficiente nos núcleos com três ou mais AgNORs no eixo longitudinal (38,8); o menor coeficiente foi observado nos núcleos com três ou mais AgNORs alinhadas fora do eixo longitudinal (32,2).

Com base em exames de microscopia eletrônica, a definição de AgNOR foi obtida com a seguinte padronização:

- fixação em solução de Karnovsky por 1 hora;
- lavagem rápida com etanol-ácido acético (3 a 5 segundos);
- tempo de incubação com nitrato de prata por 30 minutos;
- sem contracoloração com acetato de uranila e (ou) citrato de chumbo;
- ausência de pós-fixação com tetróxido de ósmio a 4%.

Contudo, no que se refere às dificuldades encontradas para a padronização da técnica, torna-se importante salientar os seguintes parâmetros:

- 1- Foi necessário processar em-se os fragmentos no mesmo dia em que foram realizados os sacrifícios dos animais;
- 2- A padronização ideal foi obtida com tempo curto de pós-fixação com o etanol-ácido acético (3:1), sendo que, em tempos maiores, os cortes finos esfarelaram. O tempo foi reduzido em 30 minutos, chegando-se até a alguns segundos apenas;
- 3- Um maior tempo de fixação em solução de Karnovsky torna mais difícil a impregnação pela prata (as NORs apresentam-se mais opacas). Com tempo de fixação muito reduzido, os fragmentos ficam moles, o que inviabiliza a confecção dos cortes;
- 4- Quanto maior o tempo de impregnação com a prata, maior a área de precipitados, e com redução do tempo, as NORs aparecem fracamente elétrôn-densas.

A microscopia eletrônica mostra que um "cluster" é formado por um conjunto de precipitações, interligadas entre si por faixas mais claras, dentro de uma matriz pouco elétron-densa. Um "dot" significa um único ponto escuro.

No núcleo de miócitos em desenvolvimento, provenientes de animais com idades de 16, 19 e 21 dias de vida intra-uterina e 1,5 dia após o nascimento, as AgNORs localizam-se aleatoriamente. As precipitações de prata dentro dos "clusters" estão distribuídas irregularmente, com muita variação na forma e tamanho. Os "clusters" não apresentam uniformidade, adquirindo um padrão heterogêneo (Figuras 9, 11, 13 e 15).

Núcleos de cardiomiócitos de ratos, com 8, 21 e 60 dias após o nascimento, apresentam as AgNORs localizadas mais centralmente. As precipitações de prata dentro dos "clusters" apresentam-se mais regulares, com pouca variação na forma e tamanho. O comportamento ultra-estrutural dos "clusters" é mais uniforme, de padrão homogêneo (Figuras 17, 19 e 21).

Tentamos reconstruir, em três dimensões, em cortes ultrafinos, a ultra-estrutura das AgNORs. Confeccionamos um seriado de 60 cortes do ventrículo esquerdo de rato com 16 dias de vida intra-uterina. Pela dificuldade, apesar de inúmeras tentativas de seguir-se um núcleo em vários níveis, abandonamos, por enquanto, este processo.

Foi impossível visualizar o mesmo núcleo em mais de 3 cortes do seriado. Nossa metodologia não permitiu uma reconstrução tridimensional no mesmo núcleo, o qual ficava oculto na grade da tela.

Para a realização deste experimento estudamos, também, a morfologia ultra-estrutural dos cardiomiócitos dos animais com 16, 19 e 21 dias de vida intra-uterina e com 1,5, 8, 21 e 60 dias de vida pós-natal. Os cardiomiócitos foram processados em microscopia eletrônica convencional.

Os núcleos dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo dos animais de vida intra-uterina (16, 19 e 21 dias) e de 1,5 dias pós-natal apresentam formas variadas e

contornos irregulares, com pequenas invaginações. É comum que nucléolos proeminentes estejam presentes e localizados em regiões não específicas no núcleo (Figuras 8, 10, 12 e 14).

Nos animais com 8, 21 e 60 dias de vida após o nascimento, os núcleos adquirem forma mais alongada, apresentando contorno mais regular. Os nucléolos geralmente estão localizados na região central e a maioria encontra-se na mesma direção (Figuras 16, 18 e 20).

### **Análise Estatística dos Resultados**

A) Teste de comparação entre as várias classes das AgNORs e os grupos de diferentes idades.

a) Para a comparação simultânea entre os grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7; um contra o outro e entre as diversas classes das AgNORs (a: até 0,5  $\mu\text{m}$ ; b: 0,6-1,0  $\mu\text{m}$ ; c: 1,1-1,5  $\mu\text{m}$ ; d: 1,6-2,0  $\mu\text{m}$ ; e: acima de 2,0  $\mu\text{m}$ ), usou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual demonstrou diferença nas médias das AgNORs entre os sete diferentes grupos e as diversas classes das AgNORs (Anexos).

b) Comparação entre os grupos, dois a dois:

Os resultados do teste Dunn (1961) - para comparações múltiplas dois a dois, entre os diferentes grupos do estudo encontram-se em anexo.

### **B) Análise discriminante**

Com a finalidade de testar a utilidade da contagem das AgNORs para a classificação (correta) de um tecido normal em diferentes estádios de desenvolvimento, aplicamos a análise discriminatória do programa WINSTAT (1994).

Como variáveis independentes, escolhemos a média dos números de AgNORs de cada tamanho e a média dos números de AgNORs, alinhadas no núcleo.

Os coeficientes das médias estandardizadas das funções discriminantes, foram os seguintes:

AgNORs com até 0,5 $\mu\text{m}$	10,2
AgNORs entre 0,6 $\mu\text{m}$ e 1,0 $\mu\text{m}$	22,8
AgNORs entre 1,1 $\mu\text{m}$ e 1,5 $\mu\text{m}$	09,5
AgNORs entre 1,6 $\mu\text{m}$ e 2,0 $\mu\text{m}$	12,4
AgNORs maiores que 2,0 $\mu\text{m}$	36,5
núcleos com 2 AgNORs no eixo longitudinal	57,3
núcleos com 3 ou mais AgNORs no eixo longitudinal	38,8
núcleos com 3 ou mais AgNORs fora do eixo longitudinal	32,2

Como a importância dos coeficientes está relacionada com o valor absoluto dos coeficientes médios estandardizados das funções discriminantes, podemos concluir, para a separação das idades, que:

- os números dos núcleos com alinhamento das AgNORs têm, em geral, importância maior que os números médios das AgNORs.
- dentro das variáveis que dependem do tamanho das AgNORs, as precipitações maiores que 2  $\mu\text{m}$  são as mais importantes.

Como as distribuições destas variáveis não são semelhantes a uma curva de distribuição normal, foi necessário transformá-las em curvas com boa aproximação à 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-Smirnov (WINSTAT, 1994).

Como variáveis dependentes (classificadoras), escolhemos a idade dos animais, que definiu os grupos estudados e foi usada como padrão, com 16, 19 e 21 dias de vida intra-uterina e 1,5, 8, 21 e 60 dias após o nascimento.

Com a finalidade de se avaliar o grau de predição da análise discriminante, pelo método Jackknife (LACHENBRUCH, 1975), calculamos para cada um dos 74 animais, a suposta idade, com a função “ausência do valor y” (missing y value), a partir dos dados dos setenta e três casos restantes e os valores da média, a partir dos valores independentes dos setenta e três casos restantes.

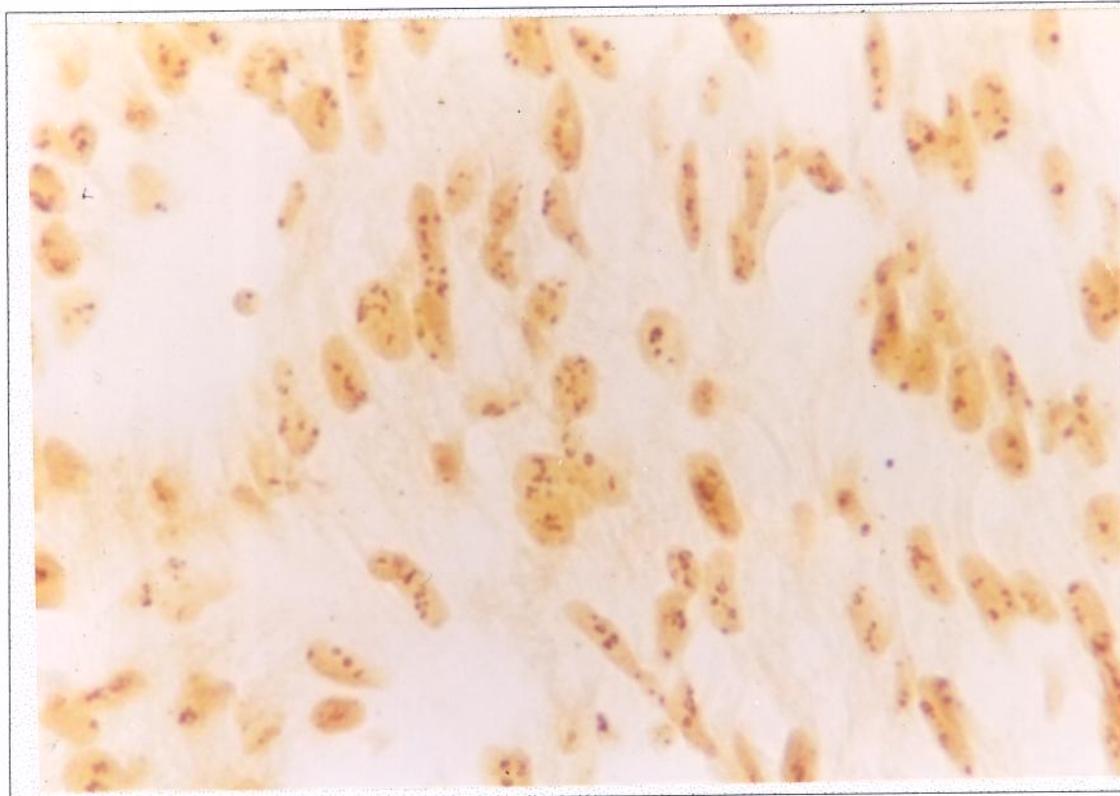
Obtivemos 59 animais, de um total de 74, corretamente classificados (79,7%).

O erro total foi de 15/74 animais, distribuídos da seguinte forma:

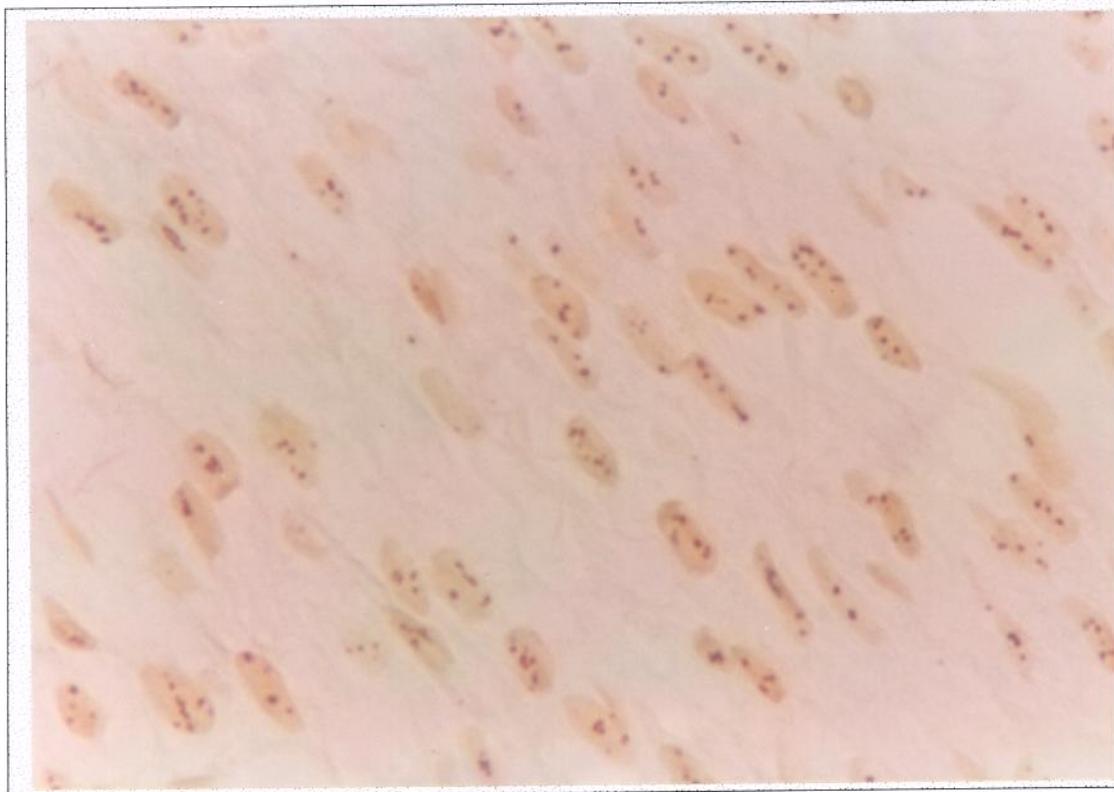
- 2 na idade de 16 dias i.u., erroneamente classificados na idade de 19 dias i.u.;
- 3 na idade de 19 dias i.u., sendo 2 erroneamente classificados na idade de 16 dias i.u. e 1 classificado na idade 21 a.n.
- 4 na idade de 21 dias i.u., sendo 3 erroneamente classificados na idade de 1,5 dias a.n. e 1 classificado na idade de 19 dias i.u.
- 5 na idade de 1,5 dias a.n., sendo 4 erroneamente classificados na idade de 21 dias i.u., e 1 classificado na idade de 19 dias i.u.
- 1 na idade de 21 dias a.n., sendo erroneamente classificado na idade de 8 dias a.n.

### Matriz classificatória após procedimento “jackknife”

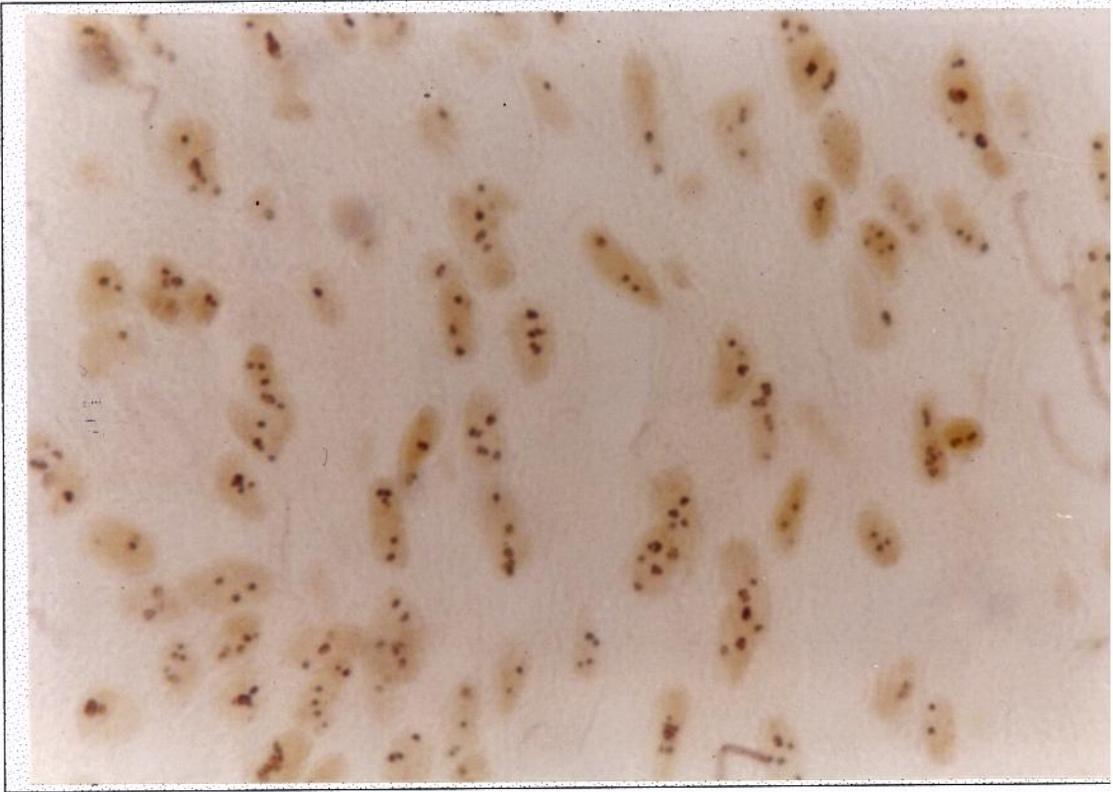
Idade real	Idade calculada por computação eletrônica						
	16 i.u.	19 i.u.	21 i.u.	1,5 a.n.	8 a.n.	21 a.n.	60 a.n.
16 i.u.	8	2	0	0	0	0	0
19 i.u.	2	7	1	0	0	0	0
21 i.u.	0	1	6	3	0	0	0
1,5 a.n.	0	1	4	6	0	0	0
8 a.n.	0	0	0	0	11	0	0
21 a.n.	0	0	0	0	1	11	0
60 a.n.	0	0	0	0	0	0	10



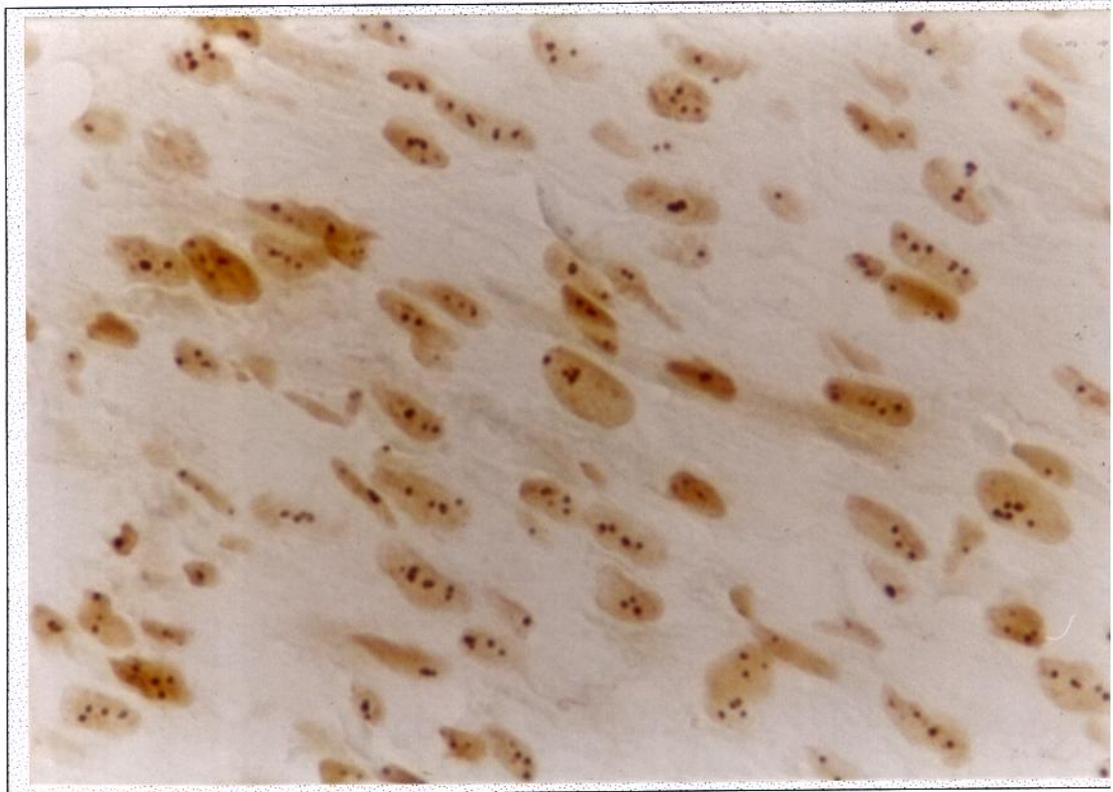
**Figura 1:** Cardiomiócito de rato com 16 dias i.u. Coloração para AgNORs. 1.250X



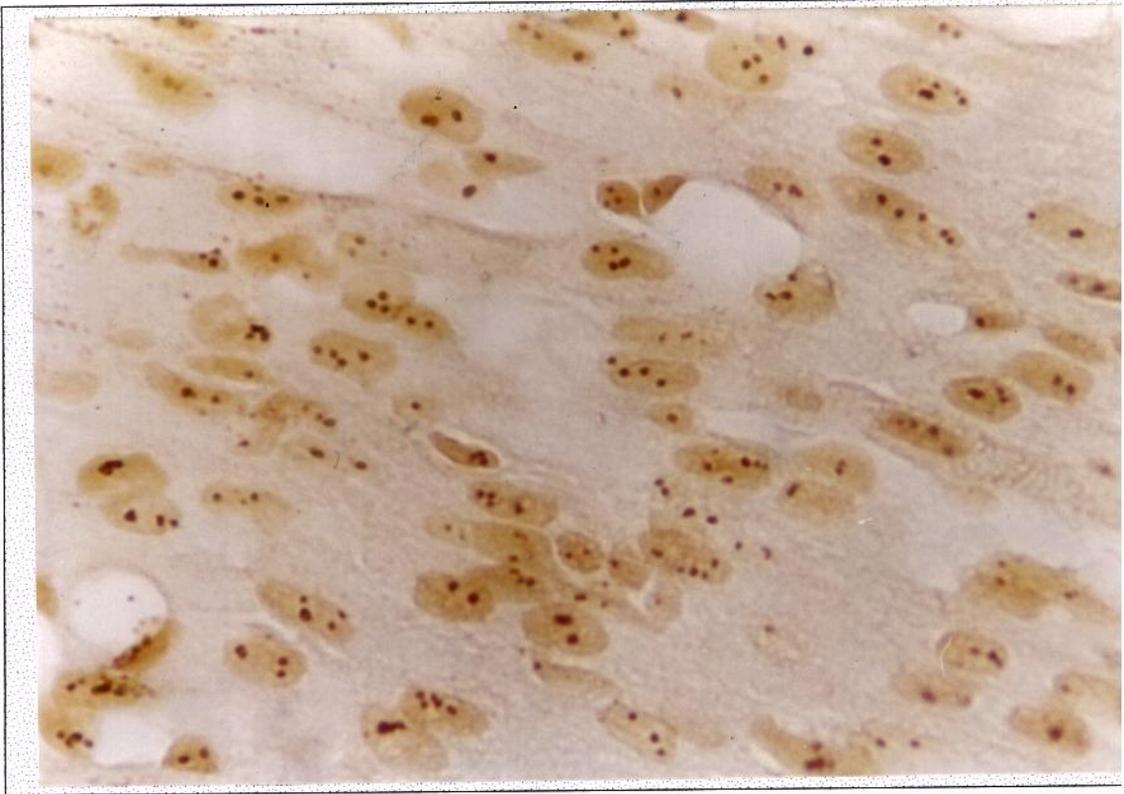
**Figura 2:** Cardiomiócito de rato com 19 dias i.u. Coloração para AgNORs. 1.250X.



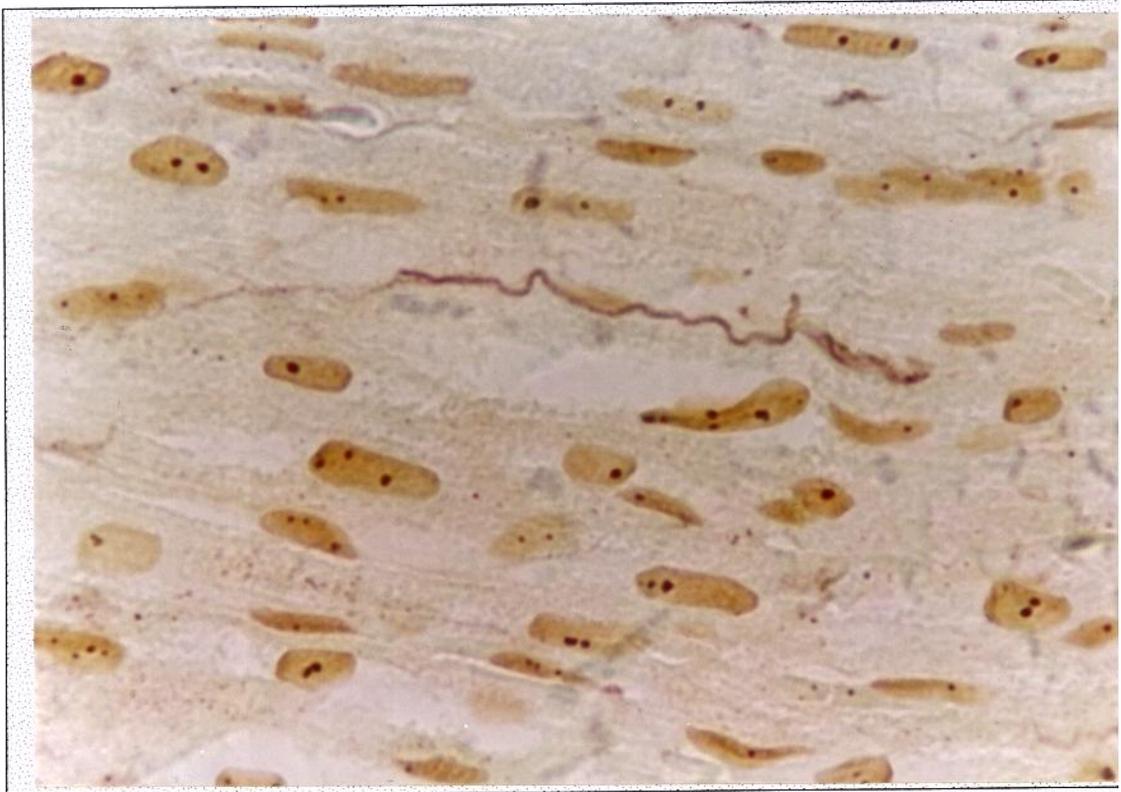
**Figura 3:** Cardiomiócito de rato com 21 dias i.u. Coloração para AgNORs. 1.250X.



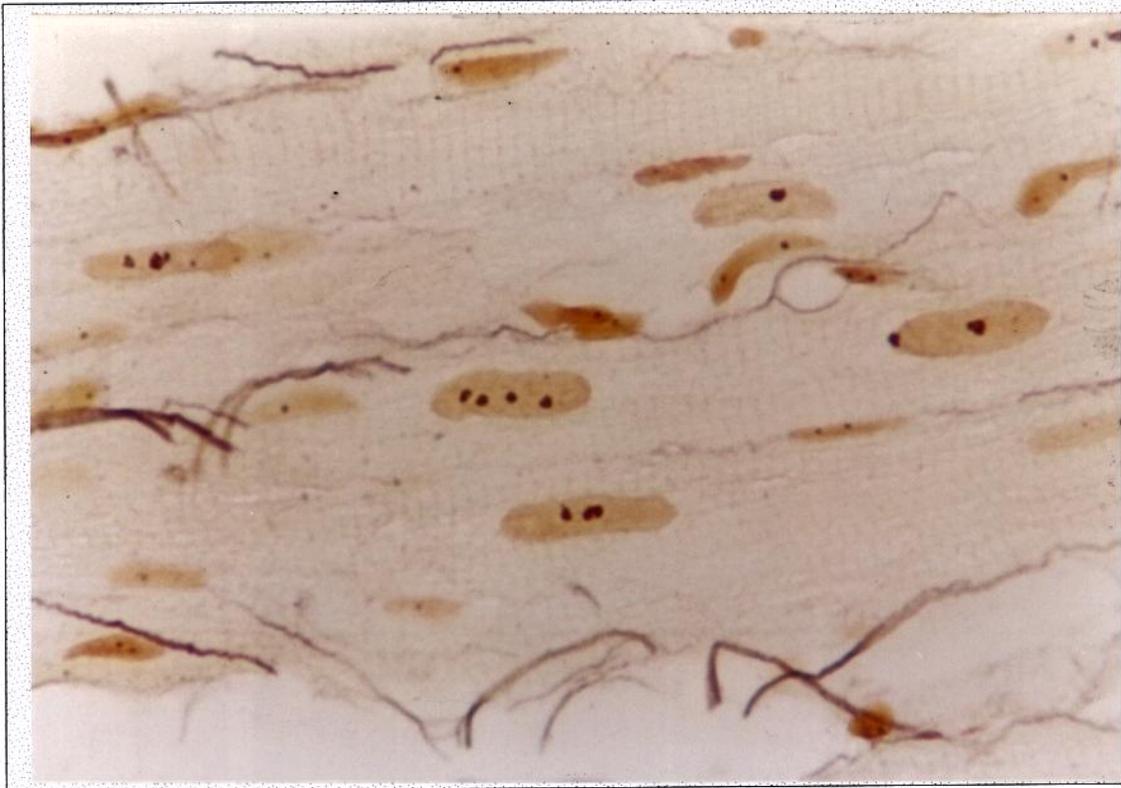
**Figura 4:** Cardiomiócito de rato com 1,5 dia a.n. Coloração para AgNORs. 1.250X.



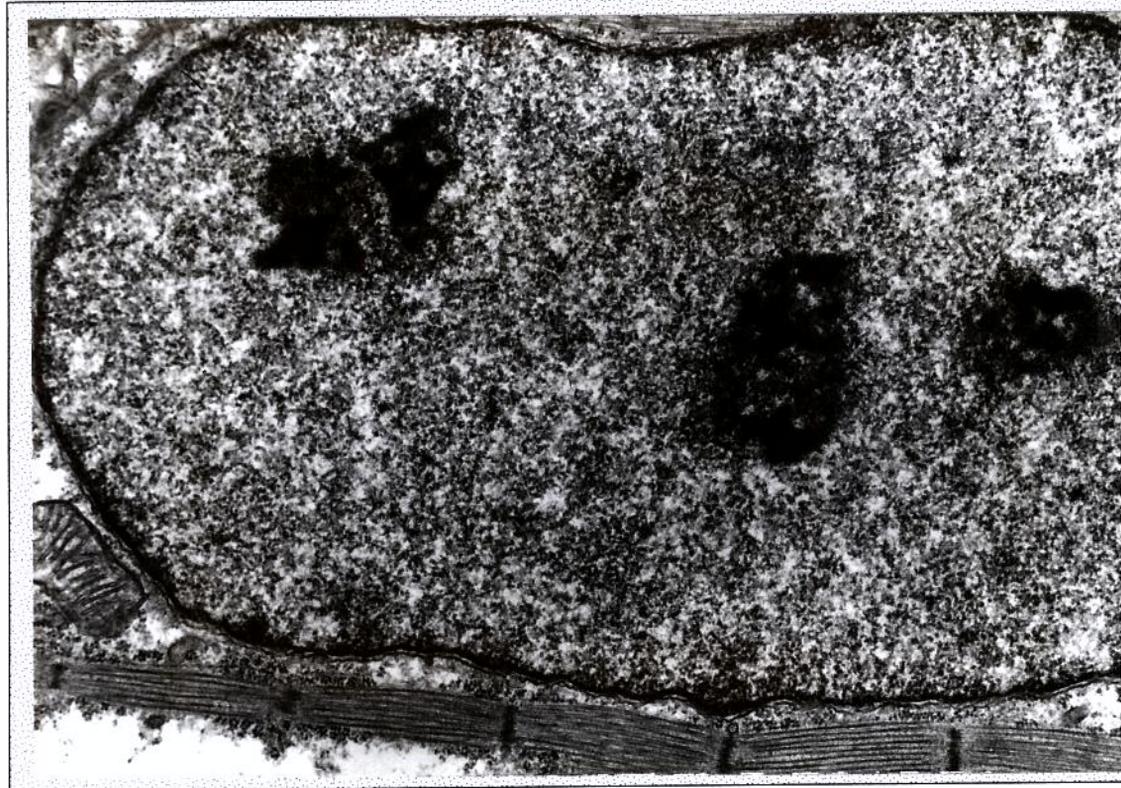
**Figura 5:** Cardiomiócito de rato com 8 dias a.n. Coloração para AgNORs. 1.250X.



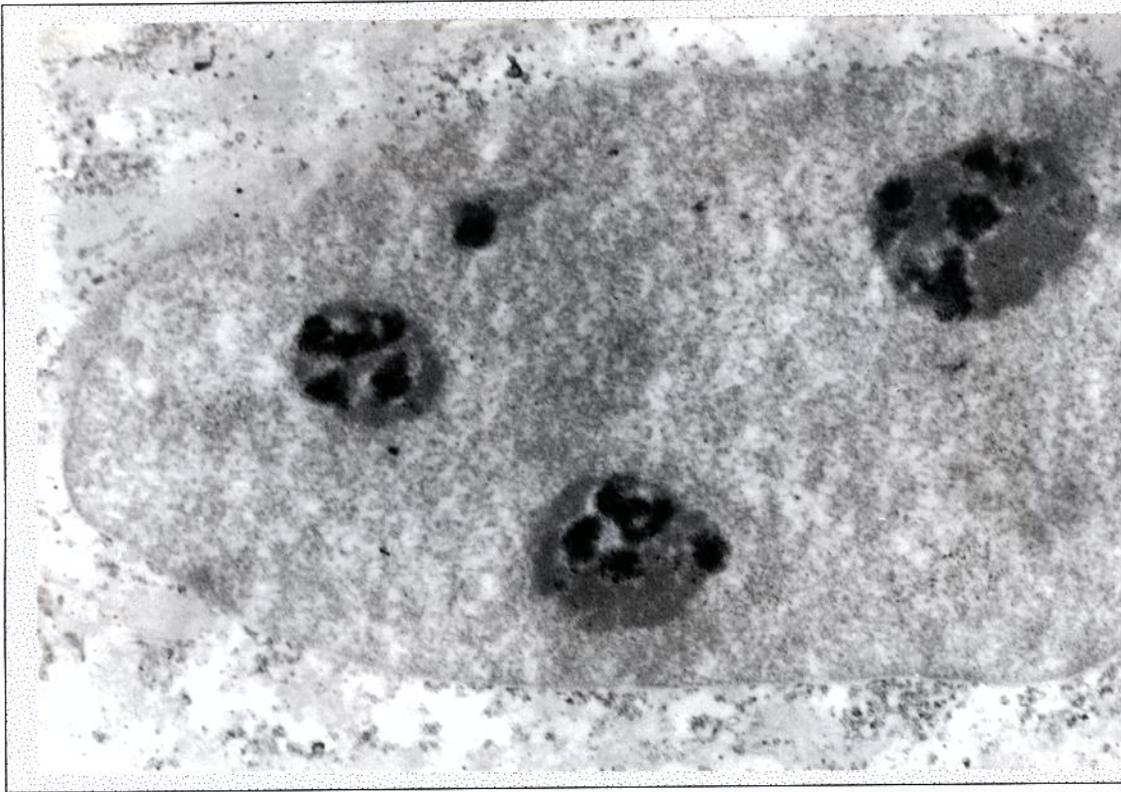
**Figura 6:** Cardiomiócito de rato com 21 dias a.n. Coloração para AgNORs. 1.250X



**Figura 7:** Cardiomiócito de rato com 60 dias a.n. Coloração para AgNORs. 1.250X.



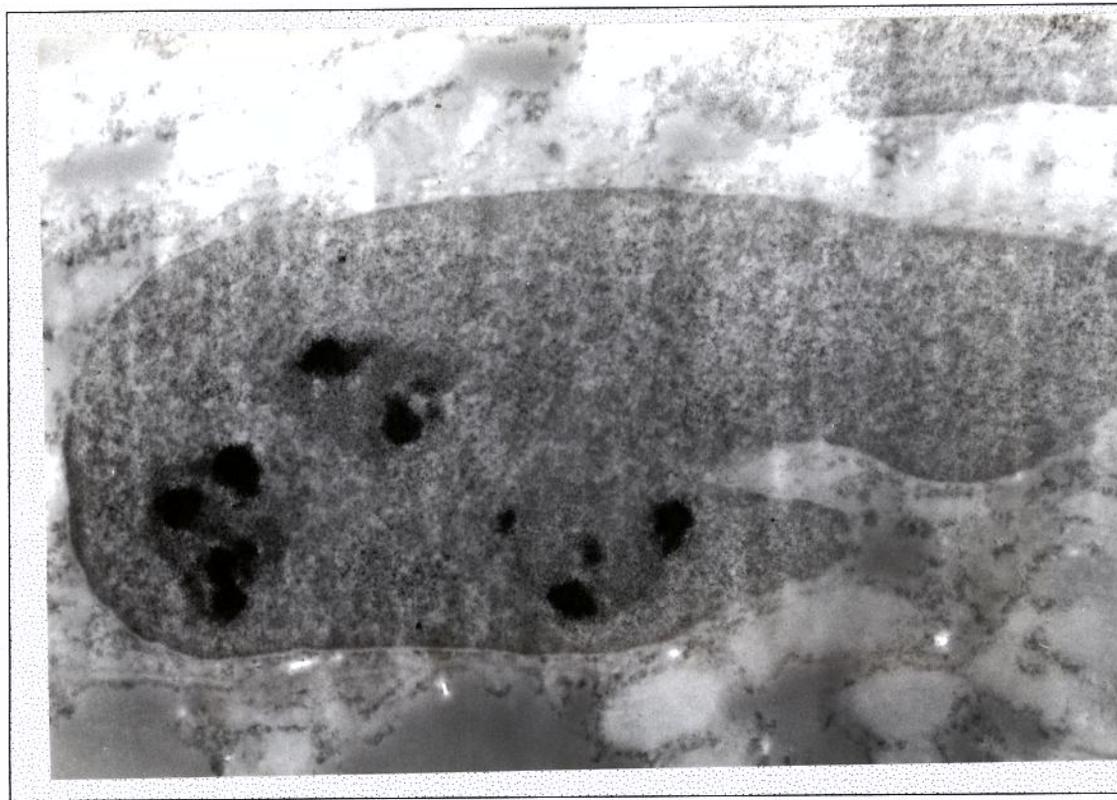
**Figura 8:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 16 dias i.u., apresentando 3 nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 25.000X.



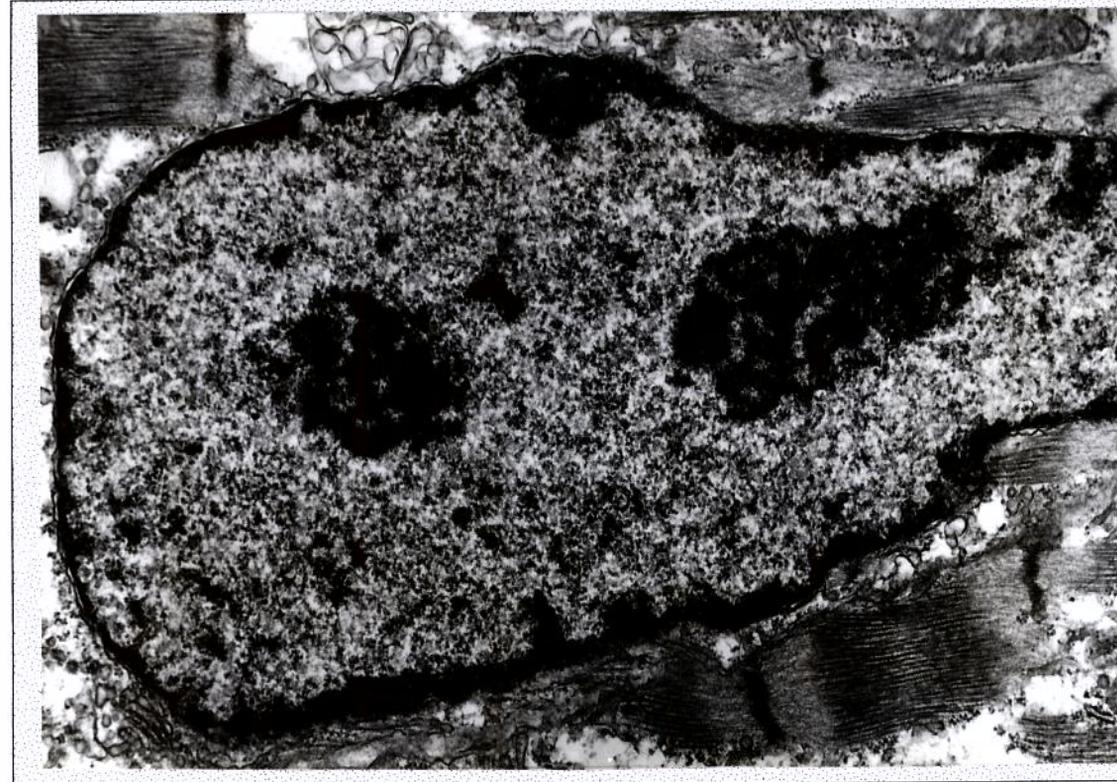
**Figura 9:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 16 dias i.u., apresentando 3 “clusters” e 1 “dot”. Coloração AgNORs. 25.000X.



**Figura 10:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 19 dias i.u., apresentando 3 nucléolos. Coloração com acetovanilina e citrato de chumbo. 50.000X.



**Figura 11:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 19 dias i.u., apresentando 3 “clusters”. Coloração para AgNO<sub>3</sub>. 31.250X.



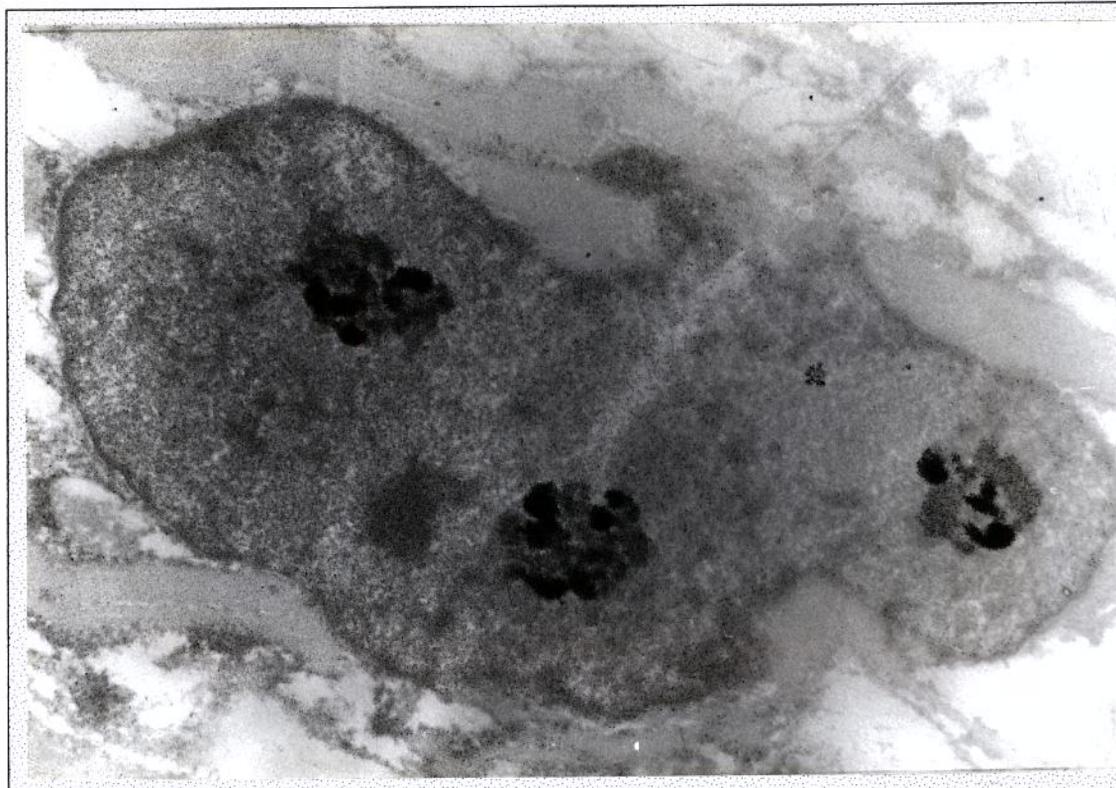
**Figura 12:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 21 dias i.u., apresentando 2 nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 25.000X.



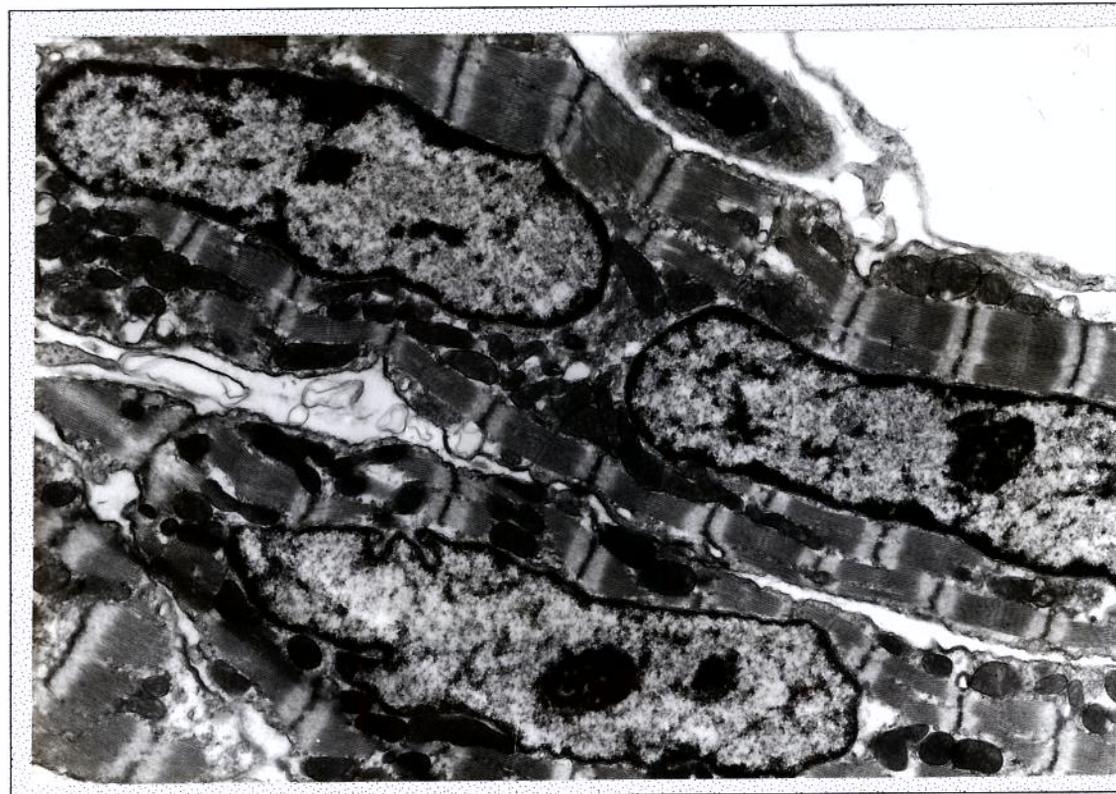
**Figura 13:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 21 dias i.u., apresentando 4 “clusters”. Coloração para AgNO<sub>3</sub>. 12.000X.



**Figura 14:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 1,5 dia a.n., apresentando 2 nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 25.000X.



**Figura 15:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 1,5 dia a.n., apresentando 3 “clusters”. Coloração para AgNO<sub>3</sub>. 25.000X.



**Figura 16:** Três núcleos de cardiomiócito de rato com 8 dias a.n., apresentando nucléolos. Coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo. 10.000X.



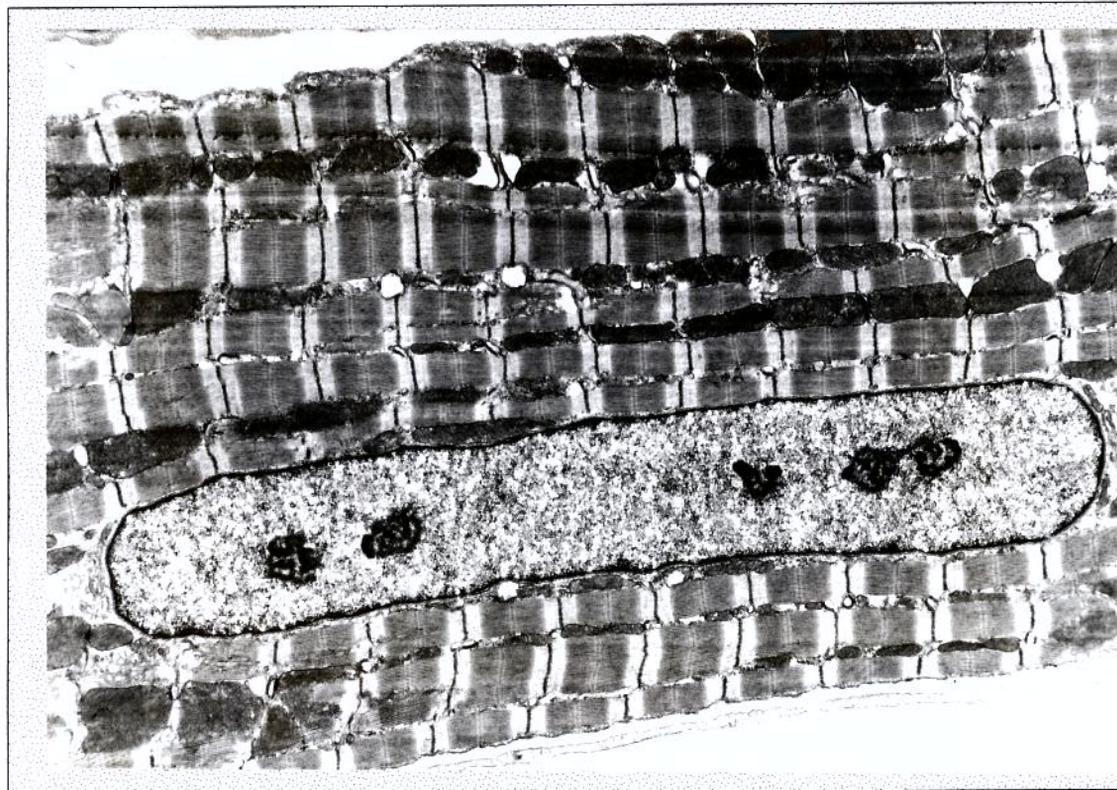
**Figura 17:** Dois núcleos de cardiomiócito de rato com 8 dias a.n., apresentando 2 “clusters” cada. Coloração p AgNORs. 10.000X.



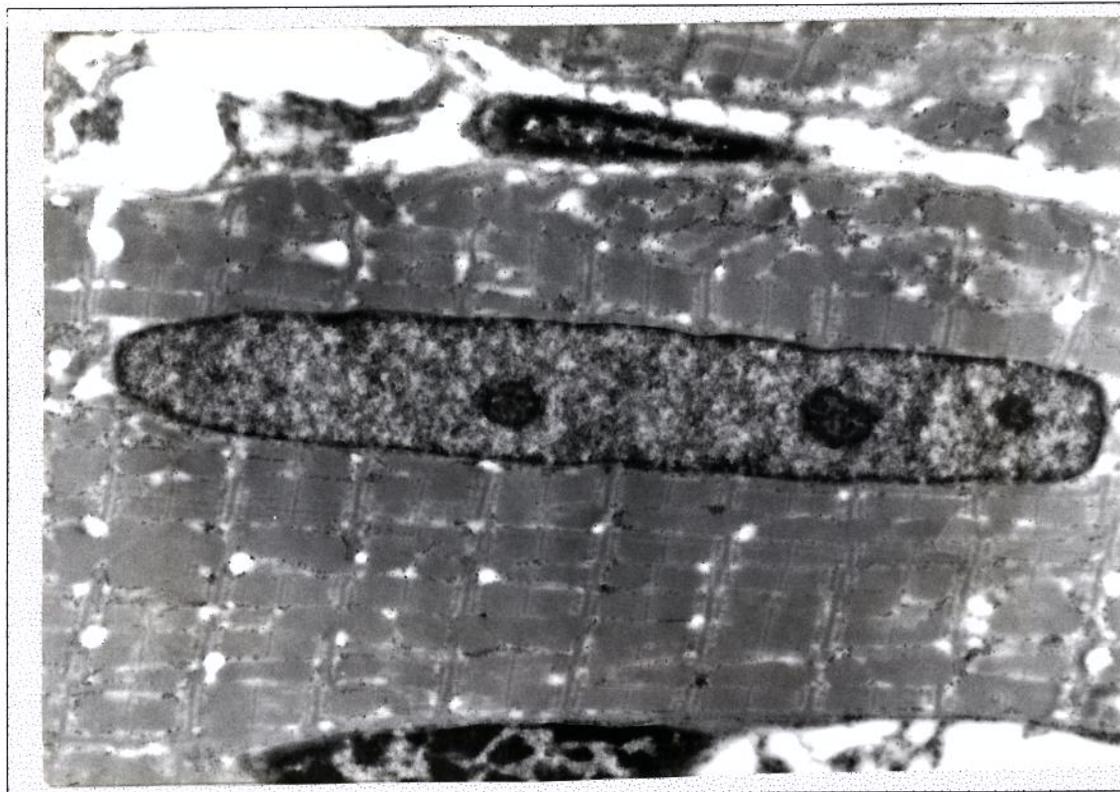
**Figura 18:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 21 dias a.n., apresentando 2 nucléolos. Coloração com acet uranila e citrato de chumbo. 12.500X.



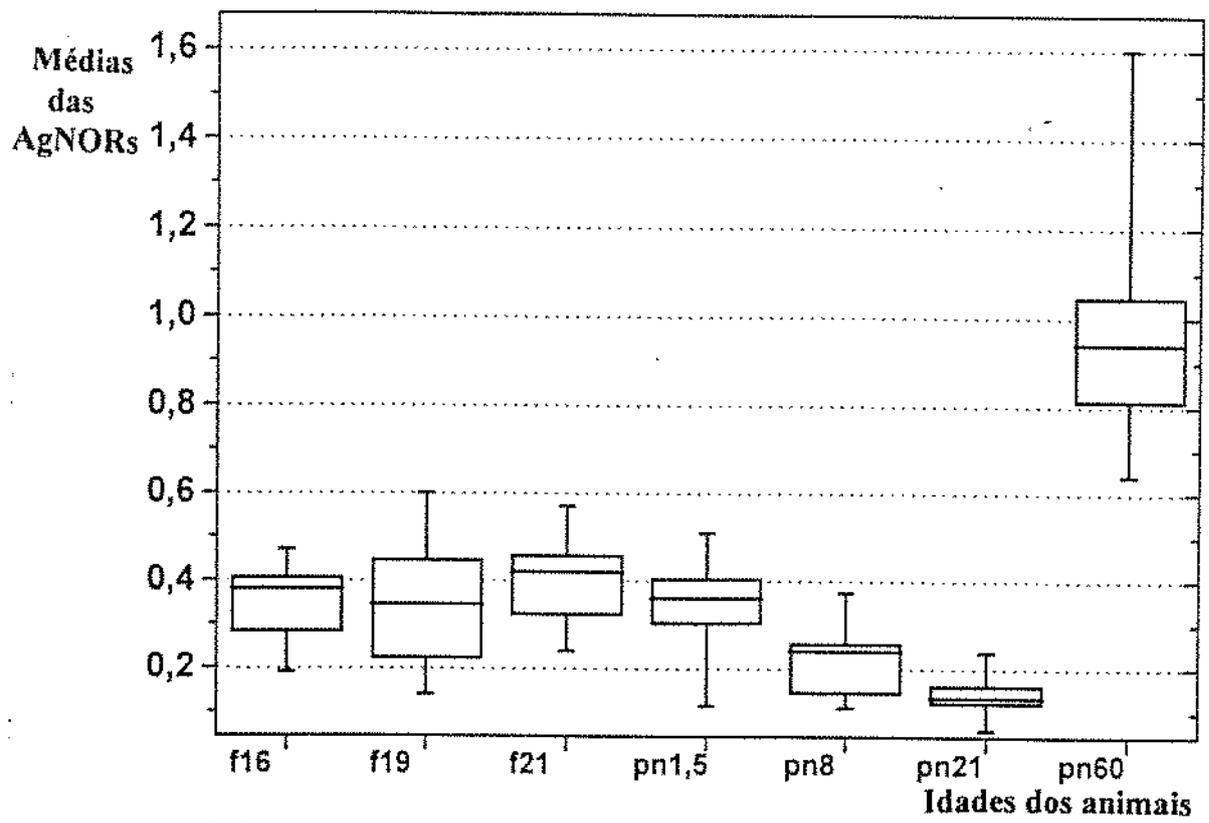
**Figura 19:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 21 dias a.n., apresentando 2 “clusters”. Coloração para AgNO<sub>3</sub>. 10.000X.



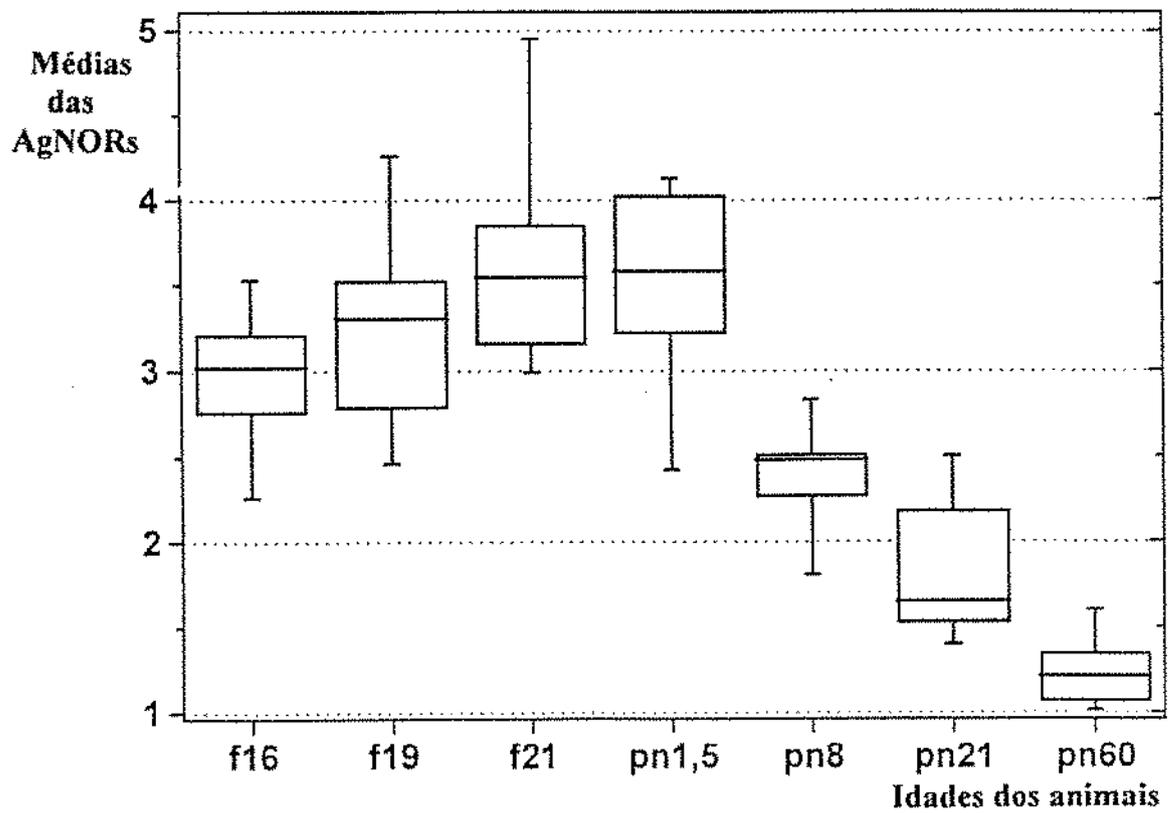
**Figura 20:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 60 dias a.n., apresentando 4 nucléolos. Coloração com acetovanilina e citrato de chumbo. 10.000X.



**Figura 21:** Núcleo de cardiomiócito de rato com 60 dias a.n., apresentando 3 "clusters". Coloração para AgNC 12.500X.



**Diagrama 1:** Valores médios das AgNORs até 0.5 µm.



**Diagrama 2:** Valores médios das AgNORs entre 0.6 e 1.0 µm.

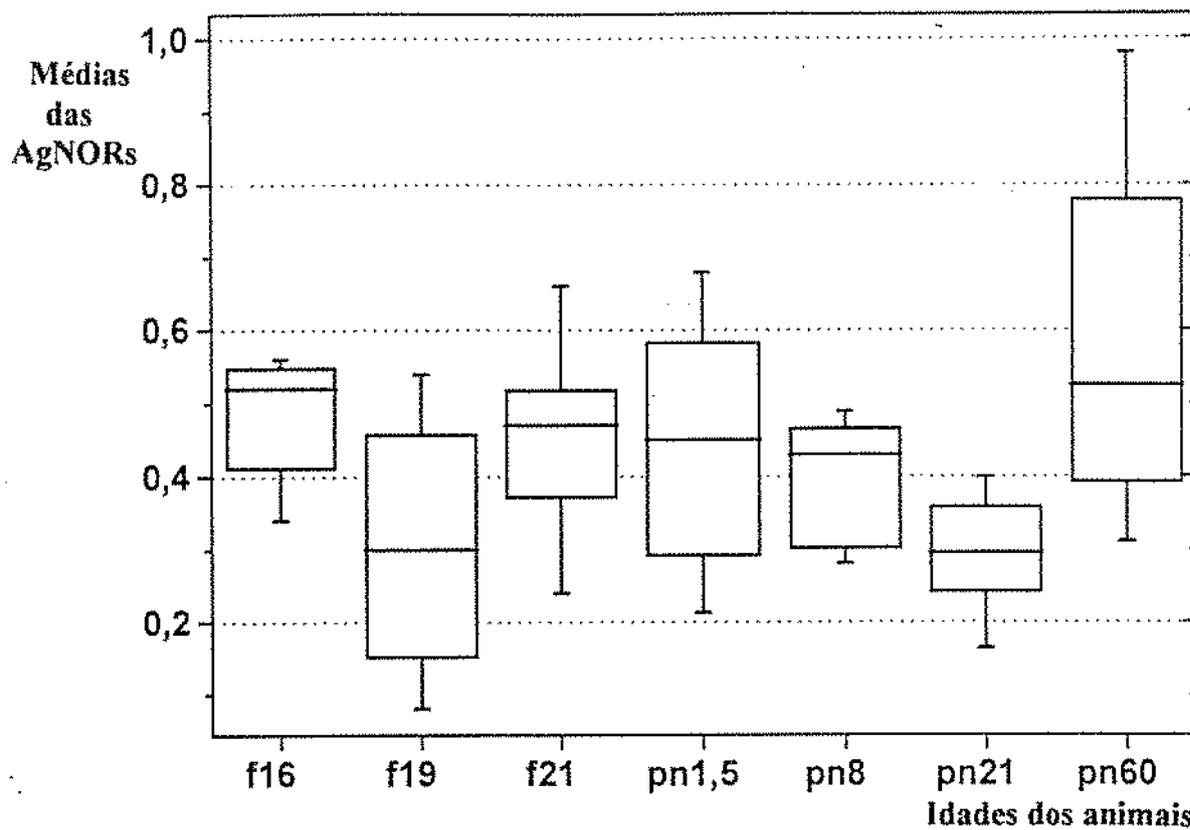


Diagrama 3: Valores médios das AgNORs entre 1.1 e 1.5  $\mu\text{m}$ .

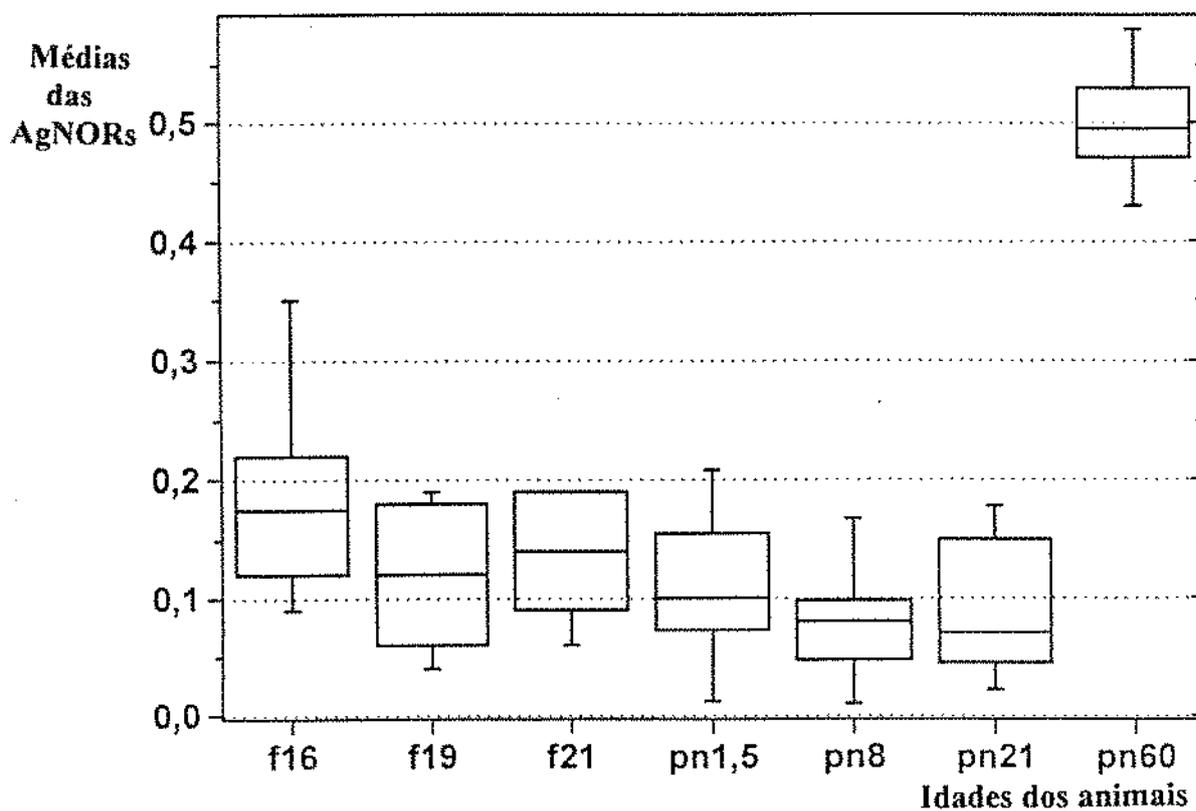


Diagrama 4: Valores médios das AgNORs entre 1.6 e 2.0  $\mu\text{m}$ .

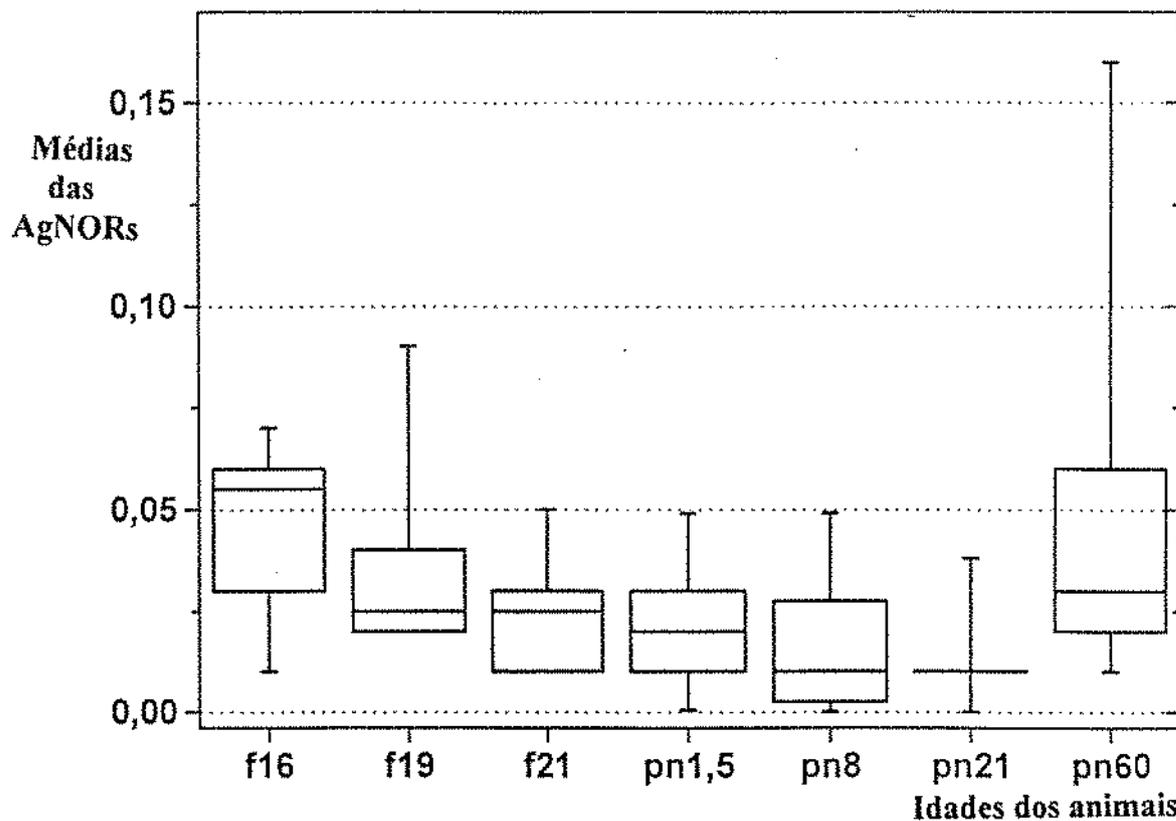


Diagrama 5: Valores médios das AgNORs entre 2.1 e 2.5  $\mu\text{m}$ .

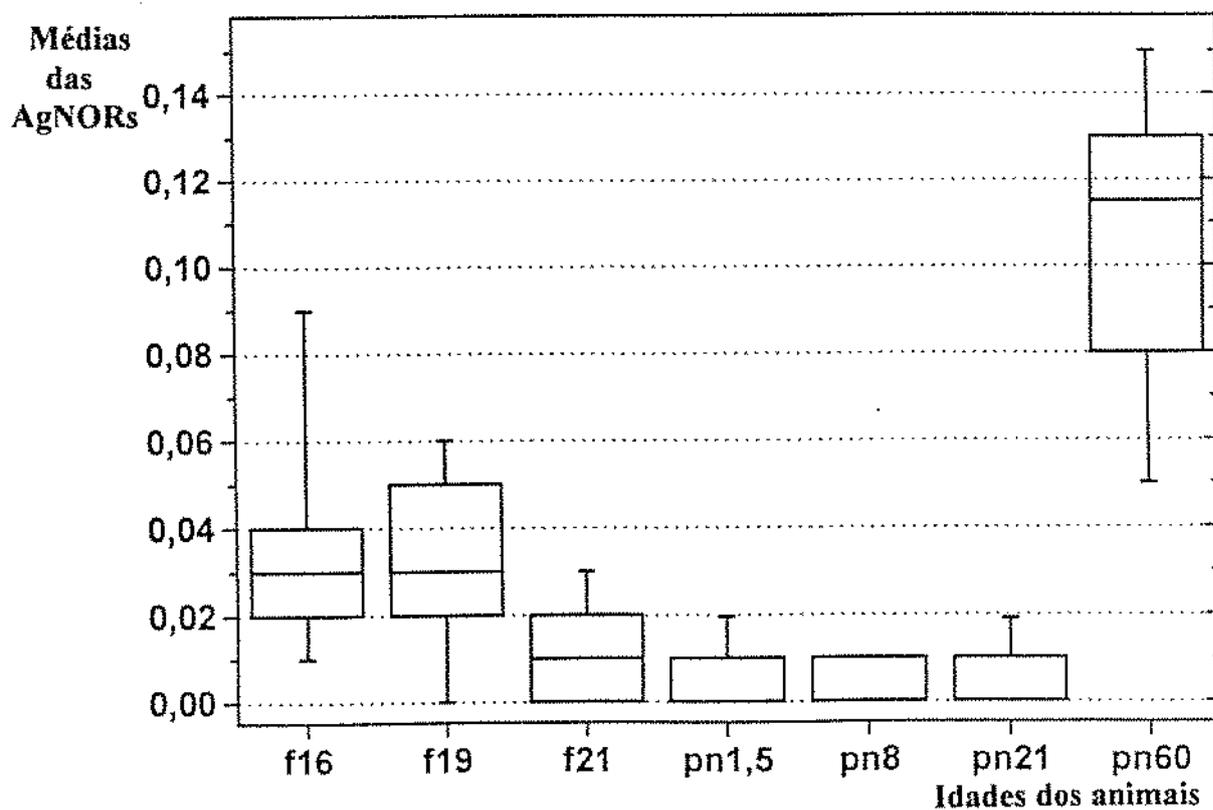


Diagrama 6: Valores médios das AgNORs entre 2.6 e 3.0  $\mu\text{m}$ .

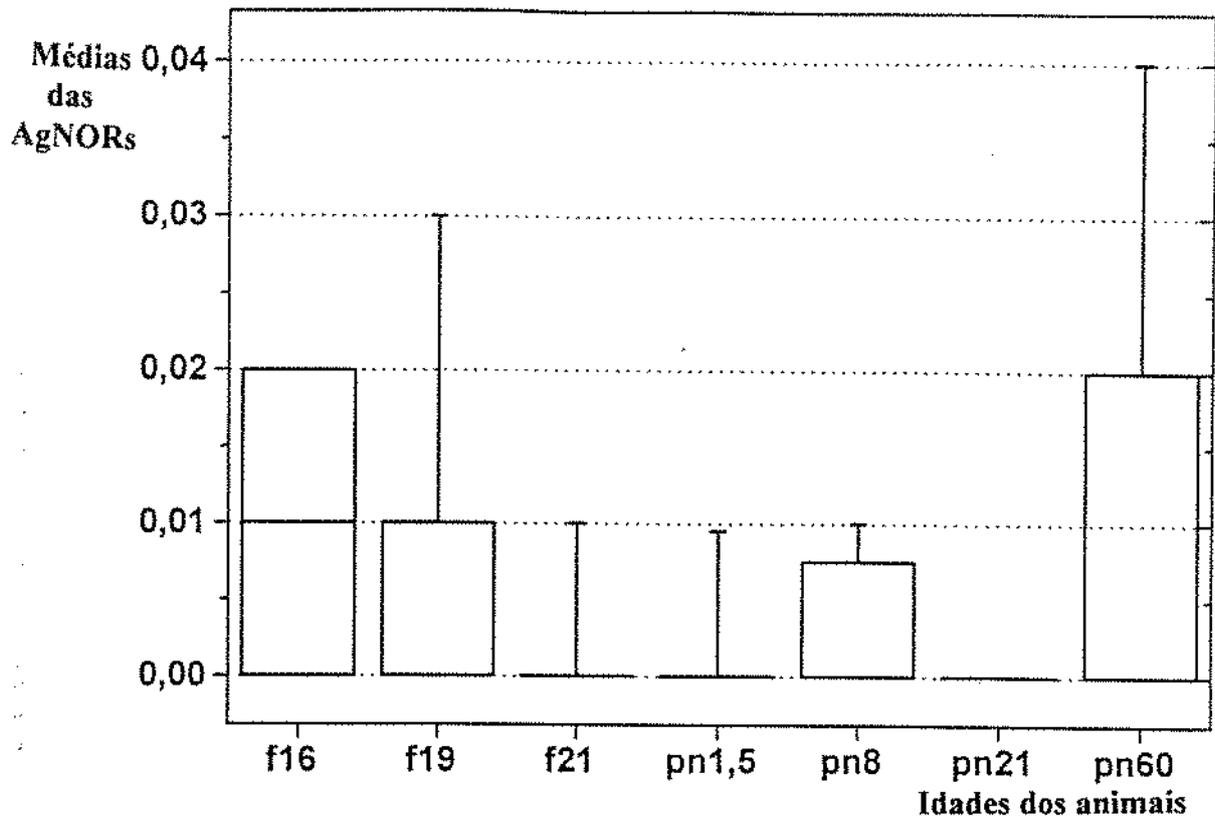


Diagrama 7: Valores médios das AgNORs entre 3.1 e 3.5  $\mu\text{m}$ .

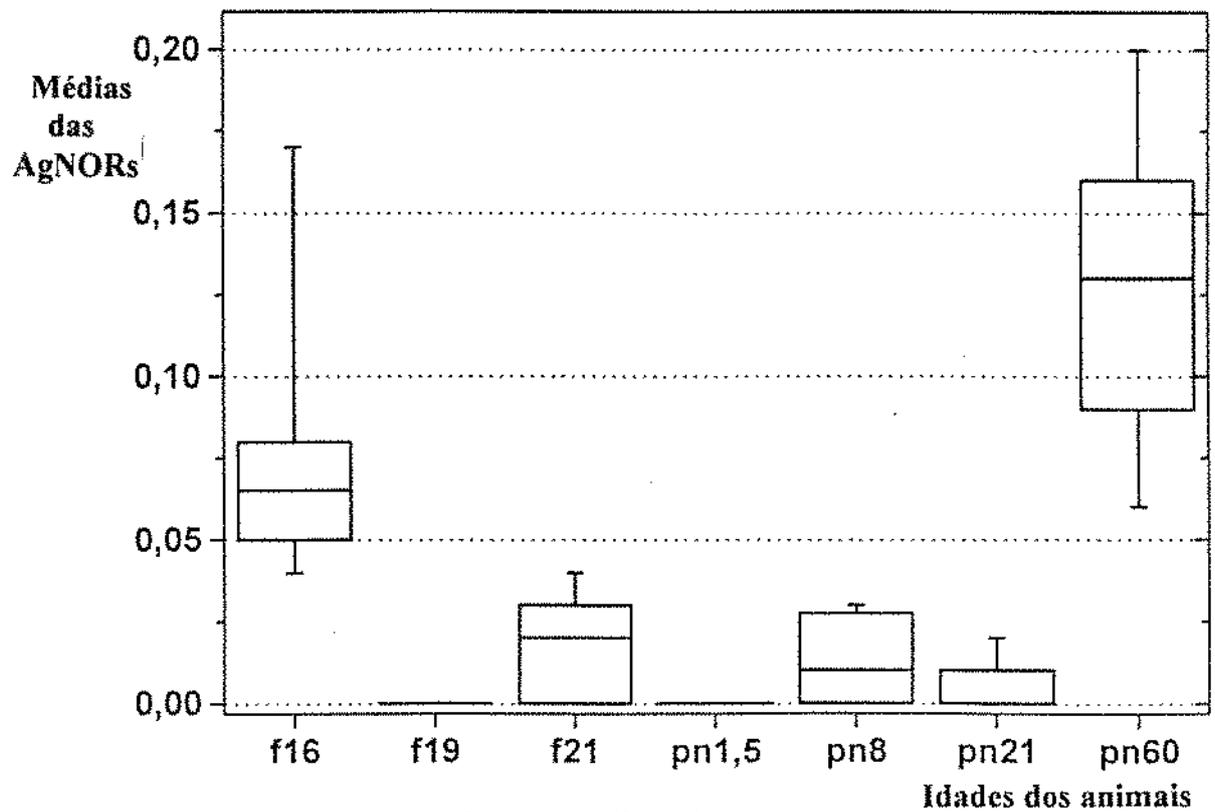


Diagrama 8: Valores médios das AgNORs maiores que 2.0  $\mu\text{m}$ .

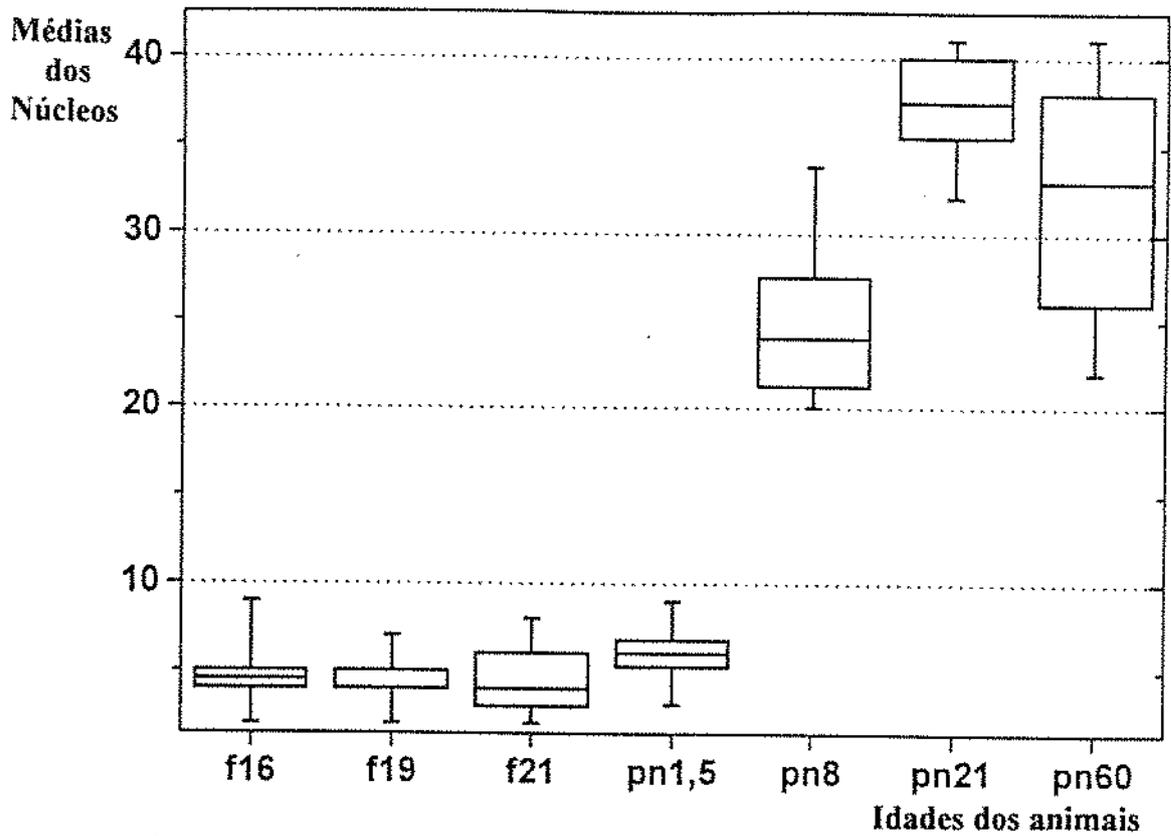


Diagrama 9: Núcleos com 2 AgNORs no eixo longitudinal (%).

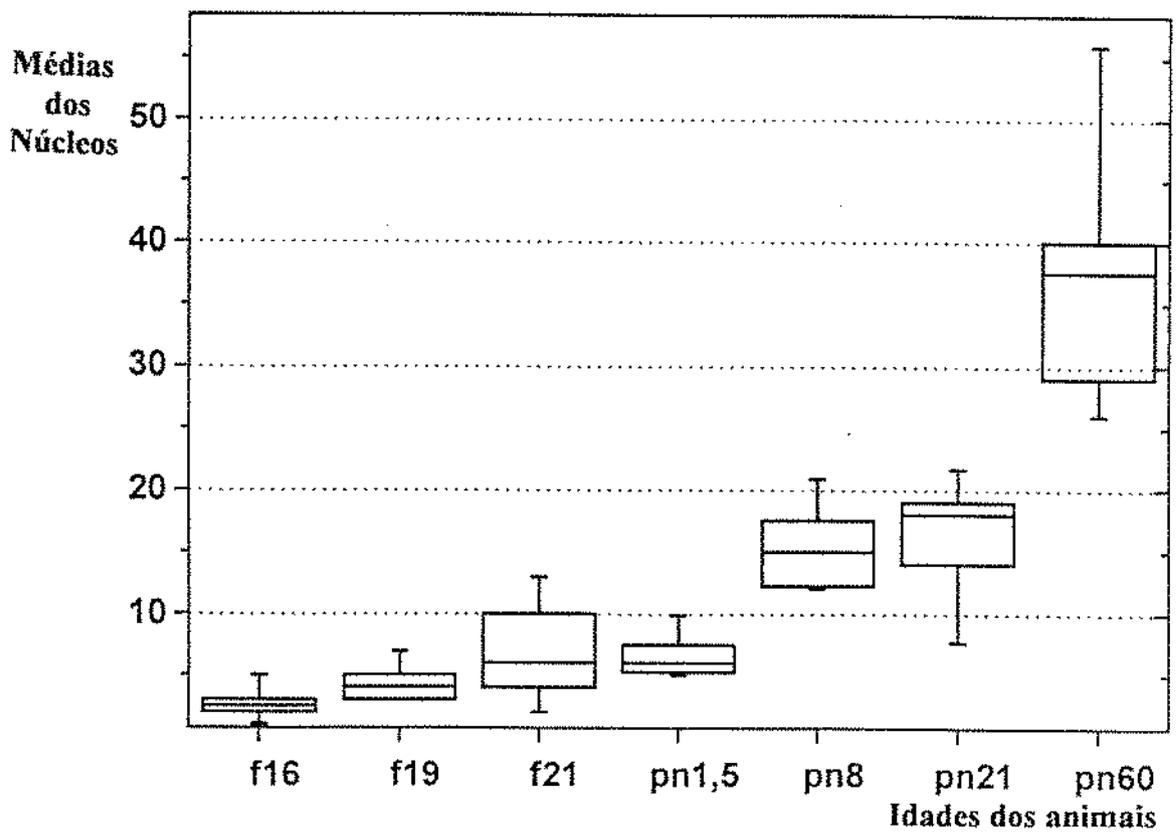
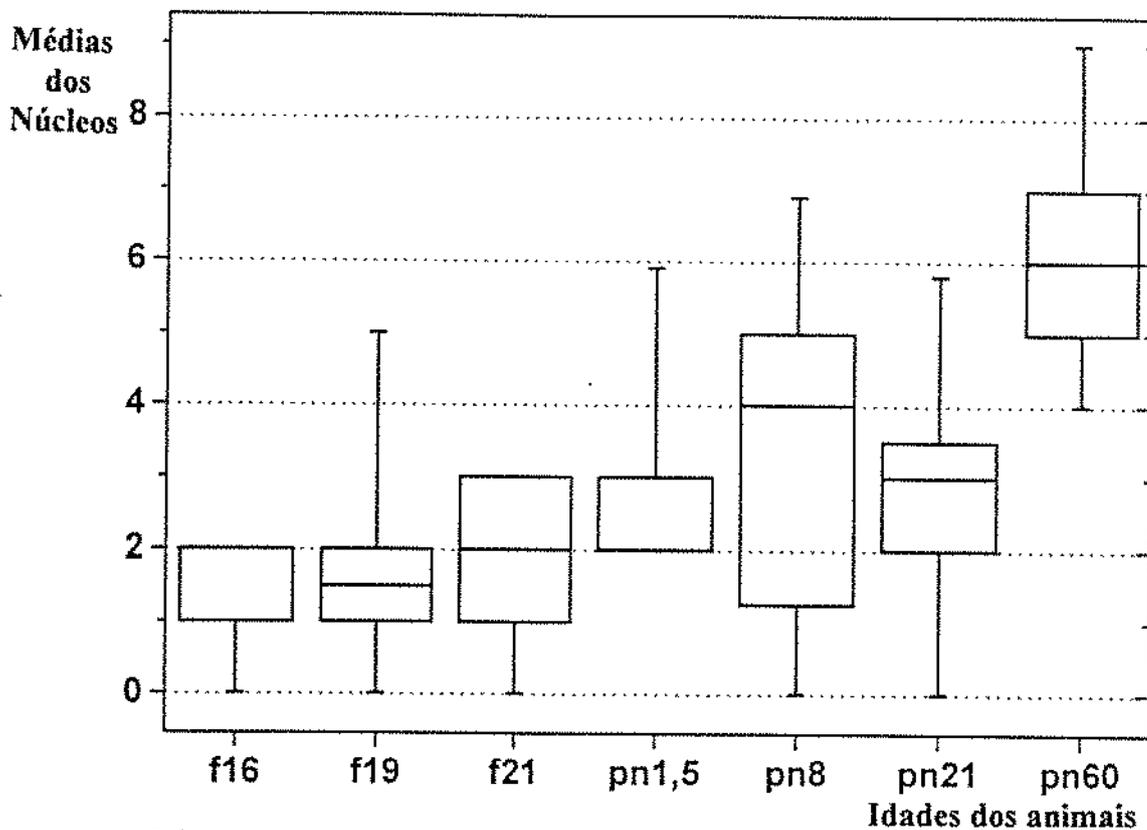
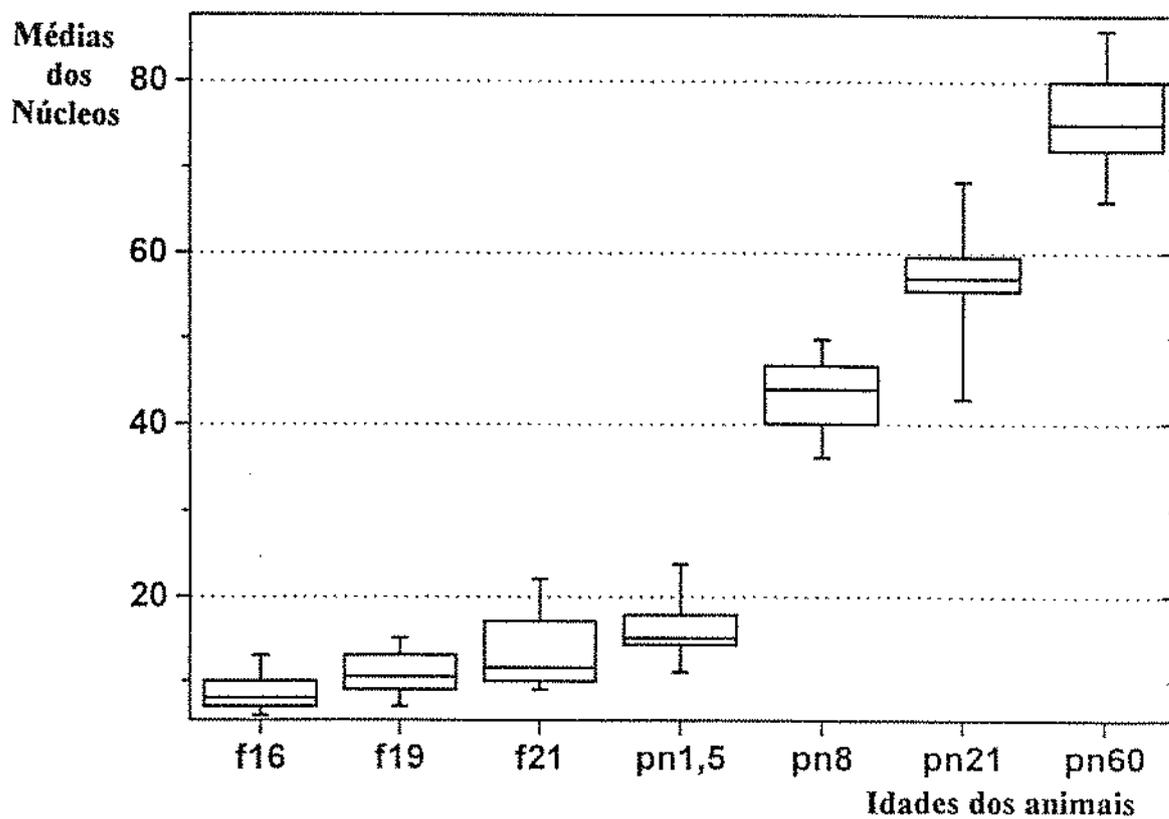


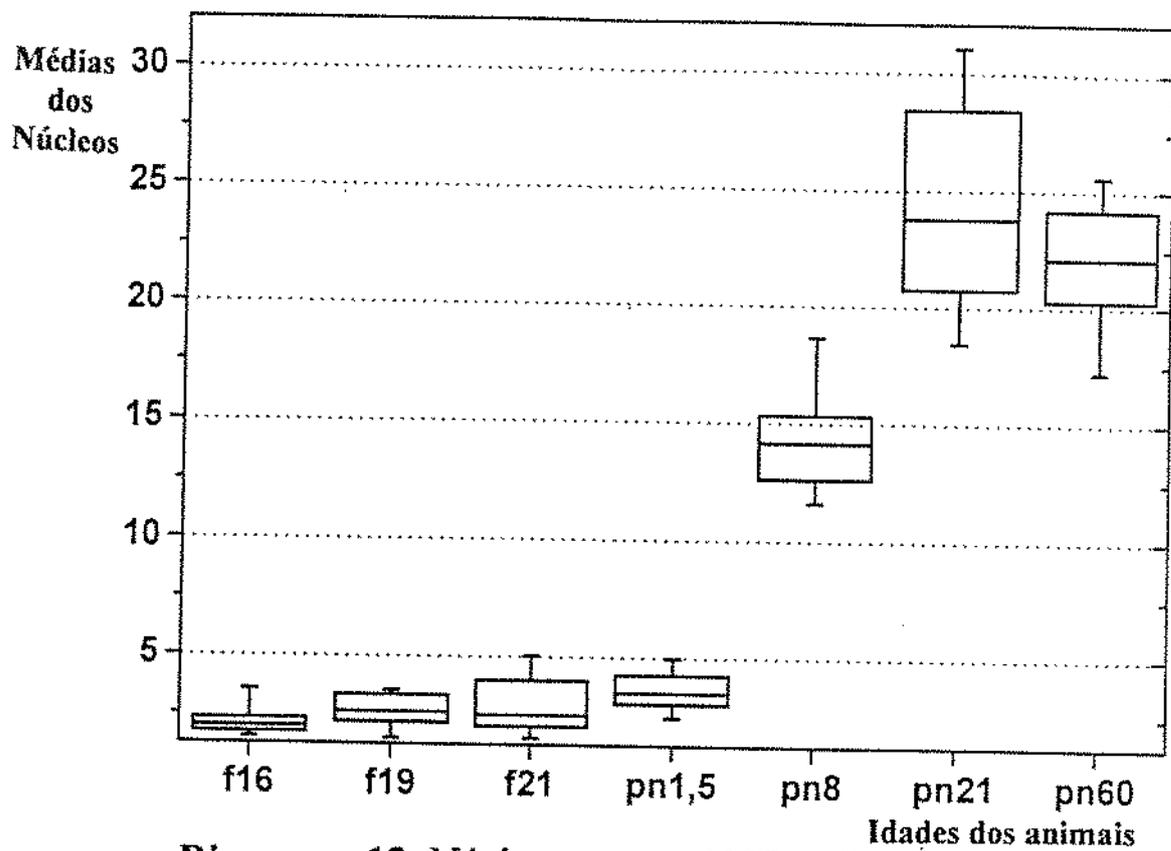
Diagrama 10: Núcleos com 3 ou mais AgNORs no eixo longitudinal (%).



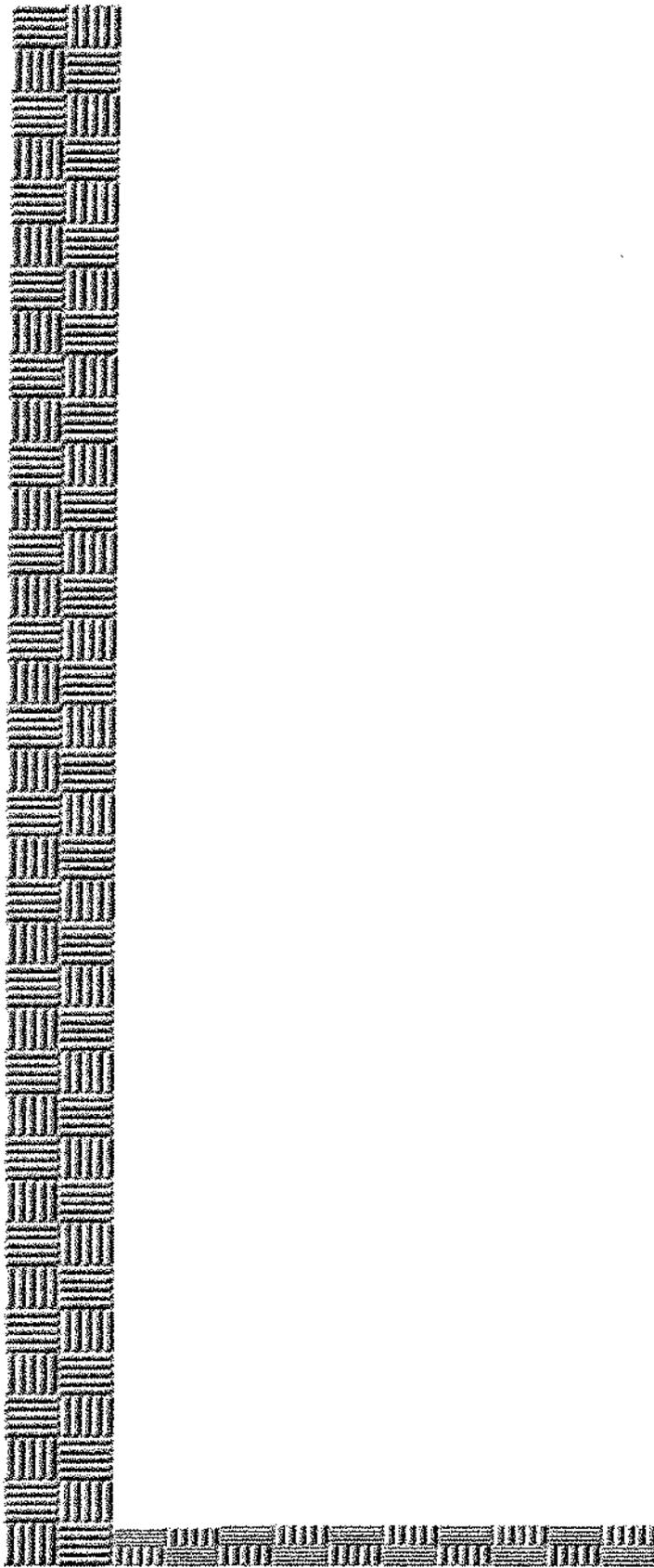
**Diagrama 11:** Núcleos com 3 ou mais AgNORs fora do eixo longitudinal (%).



**Diagrama 12:** Núcleos com AgNORs alinhadas (%).



**Diagrama 13:** Núcleos com AgNORs alinhadas (valores estandardizados).



## ***4. Discussão***

Na maioria dos trabalhos sobre AgNORs em microscopia eletrônica, a pós-fixação é feita com tetróxido de ósmio, e as contracolorações com acetato de uranila e citrato de chumbo (HERNANDEZ-VERDUN *et al.*, 1980; SCHWARZACHER & WACHTLER, 1983; RASKA *et al.*, 1990; PLOTON *et al.*, 1985, 1987; DERENZINI *et al.*, 1983, 1989, 1990a, 1990c; DERENZINI & TRERÈ, 1991a)

Há controvérsias quanto ao critério para medir ou contar AgNORs, tornando, freqüentemente, difícil a comparação de resultados de diferentes autores. Como não encontramos, na literatura, uma técnica para essas estruturas em microscopia eletrônica, desenvolvemos um procedimento, empiricamente.

Inicialmente obtivemos bons resultados do ponto de vista citológico, mas a integridade estrutural não foi garantida porque os blocos se esfarelavam. Após testarmos diferentes parâmetros (diferentes tempos de fixação; pós-fixação, ou não, com ósmio; diferentes tempos de impregnação com prata, com variações de temperatura; lavagem com diferentes tempos de etanol-ácido acético; contracolorações, ou não, com acetato de uranila e (ou) citrato de chumbo), chegamos à uma técnica reproduzível.

A não utilização do tetróxido de ósmio, acetato de uranila e (ou) citrato de chumbo, deveu-se a uma razão histoquímica, evitando-se assim, maior influência de artefatos (precipitados) das AgNORs. Desta forma, trabalhamos com maior certeza de que as precipitações das AgNORs eram realmente só da prata.

Através da impregnação pela prata, conseguimos definir a melhor maneira de contagem das AgNORs em microscopia eletrônica ou seja, um "cluster" AgNOR é formado por um grupo de precipitações de prata, por sua vez, interligado com faixas mais claras e contido em uma matriz elétron-lúcida. Um "dot" AgNOR é uma precipitação única e escura, não contendo a matriz.

Para o estudo em microscopia óptica, a técnica AgNOR por nós utilizada, foi a seguida por CROCKER & NAR (1987) com modificações (alteração do tempo de fixação, lavagem com etanol-ácido acético, precedendo a impregnação com a prata). Esta mostrou-

se adequada, pois obtivemos valores muito similares para cada grupo de idades analisado, justificando nossa metodologia.

É importante salientar que, diferentes tipos de fixadores, variações de temperatura, tempos de impregnação com a prata, contato dos cortes com a luz, bem como a espessura dos cortes, podem originar artefatos (UNDERWOOD & GIRI, 1988; SOONRO & WHINSTER, 1990; DERENZINI & TRERÈ, 1991a; GRIFFITHS *et al.*, 1989; RÜSCHOFF *et al.*, 1990a; SMITH *et al.*, 1988).

LEEK, ALISON, SARRAF (1991) verificaram que em tecidos, tais como como intestino de rato, camundongo e homem, o número de “clusters” por núcleo não demonstra nível aumentado de proliferação, mas o tamanho dos “clusters” de AgNORs, representado pelo seu maior diâmetro, está relacionado com o estado proliferativo da célula. Os autores concluíram que, a capacidade proliferativa está mais relacionada ao tamanho do diâmetro dos “clusters” das AgNORs, do que com sua quantidade, e que a atividade proliferativa é um indicador de maior atividade transcricional.

Cardiomiócitos de ratos fetais possuem uma alta atividade proliferativa (CLAYCOMB, 1973, 1975). Esta afirmativa foi comprovada através de nossos dados, pois encontramos um índice aumentado dos “clusters” de AgNORs nos animais de vida intra-uterina com 16, 19 e 21 dias e 1,5 dias de vida pós-natal. Nos corações dos animais com 8, 21 e 60 dias após o nascimento, a atividade proliferativa diminui com a maturação dos miócitos e, como consequência, encontramos menor índice na porcentagem de grandes “clusters” de AgNORs. Portanto, devido à redução da atividade proliferativa, na ordem crescente das idades dos animais, verificamos diminuição na porcentagem das AgNORs de tamanho maior.

O músculo cardíaco de rato possui pelo menos duas espécies de DNA polimerase: o nuclear 3.5S e o citoplasmático 6 para 8S. Nas células de músculo cardíaco diferenciadas, somente a atividade do DNA polimerase citoplasmático 6 para 8S está relacionada com o grau de síntese de DNA e proliferação celular. A atividade do DNA

polimerase nuclear 3.5S permanece relativamente constante por todo o desenvolvimento pós-natal (CLAYCOMB, 1973).

Em miocárdio de rato em desenvolvimento, CLAYCOMB (1973, 1975) verificou, através de dados auto-radiográficos, que ocorre diminuição na atividade do DNA polimerase 6 para 8S, quando praticamente todos os miócitos cessam o ciclo mitótico.

CLAYCOMB & BRADSHAW (1983) mostraram, em células de cultura de rato adulto, que a replicação do DNA semiconservativa reinicia e readquire as atividades das enzimas necessárias para replicar DNA. Mudanças na atividade do DNA polimerase têm certo papel na regulação de reprodução das células eucariotas e a protooncogênese está envolvida com a regulação da hipertrofia do músculo cardíaco (CLAYCOMB & LANSON, 1987).

Durante o desenvolvimento fetal, as células musculares cardíacas de rato têm alta atividade proliferativa. Logo após o nascimento, a divisão das células do músculo cardíaco cessa, enquanto a síntese de DNA continua por aproximadamente duas semanas e depois, progressivamente, diminui (CLAYCOMB, 1973, 1975; ZAK, 1973, 1974; RUMYANTSEV, 1977; SASAKI, MORISHITA, YAMAGATA, 1968; PETERSON & BASERGA, 1965). Em 3 a 4 semanas após o nascimento, o número total de células cardíacas pode ser o mesmo do animal adulto (ZAK, 1973). Pouca síntese de DNA ou divisão celular ocorrem em cardiomiócitos adultos (CLUBB & BISHOP, 1984).

A síntese de DNA no coração de rato, que ocorre após o nascimento, é parte do processo durante o qual as células musculares tornam-se binucleadas (CLUBB & BISHOP, 1984; RUMYANTSEV, 1977)

Em corações de crianças com até três anos de idade, até 85% das células possuem núcleos diplóides e 15% são tetraplóides. Entre três e oito anos ocorre uma poliploidização (FISCHER *et al.*, 1970). Em corações de ratos adultos aproximadamente 85% dos miócitos são binucleados (BISHOP, 1971; KORECKY, SWEET, RAKUSAN., 1979; GRIMM, DE LA TORRE, LA PORTA, 1970), sendo indicadores de

desenvolvimento hipertrófico em ratos neonatais (CLUBB & BISHOP, 1984). Miócitos de coração de rato recém-nascido são mononucleados, enquanto de ratos adultos, são predominantemente binucleados (KATZBERG, FARMER, HARRIS, 1974).

Poliploidia parece ser uma ocorrência rara no miocárdio de ratos. A porcentagem de núcleos poliplóides em células miocárdicas de ratos adultos é menor que 4% (GROVE, NAIR, ZAK, 1969a; BRODSKY, AREFLYEVA, URYVAEVA, 1980; GROVE *et al.*, 1969b; KUHN, PFITZER, STOEPPEL, 1977).

Em tecido trofoblástico não neoplásico, foi evidenciado que contagem de AgNOR reflete ploidia, melhor que proliferação celular (SURESH *et al.*, 1990).

Nossos dados, no entanto, mostraram que o tamanho dos “clusters” das AgNORs refletem proliferação celular, melhor que ploidia.

Cardiomiócitos de ratos, na vida intra-uterina, possuem células com alta atividade proliferativa e, conseqüentemente, ocorre uma elevação no índice da atividade mitótica e síntese de DNA (CLAYCOMB, 1973, 1975; ZAK, 1973, 1974; RUMYANTSEV, 1977).

De acordo com o estágio de maturação das células em hematopoiese normal, temos um número diferente de “clusters”. Células em proliferação apresentaram somente “clusters”. Nas maduras não proliferativas, foram detectados apenas “dots” (GROTTO *et al.*, 1990). NIKICICZ & NORBACK (1990) estudaram a medula óssea e encontraram nas células hematopoiéticas imaturas uma porcentagem mais alta de grandes “clusters” de AgNORs, em relação às células mais maduras. Esses resultados sugerem alta atividade transcricional e proliferativa para células imaturas, que vai diminuindo com a maturação.

NIWA *et al.* (1991), em células glandulares do endométrio, encontraram o número médio das AgNORs mais alto na fase proliferativa do que na fase secretora.

O nucléolo tem um importante papel no processo da síntese intracelular, sendo o local inicial para a formação do rRNA; está, portanto, ativamente envolvido na síntese e

distribuição do RNA nuclear e citoplasmático. O número de nucléolos em uma determinada célula pode variar, dependendo de seu estado funcional, mas é possível existir alguma uniformidade entre células do mesmo tipo (GOESSENS, 1984).

Células malignas têm número mais alto de AgNORs interfásicas do que células benignas. Esta característica poderia refletir uma atividade metabólica aumentada, produzindo maior quantidade de ribossomos em células proliferantes. Em linfócitos circulantes e hepatócitos estimulados, o nucléolo torna-se hipertrófico, com um número aumentado de NORs interfásicas (DERENZINI & TRERÉ, 1991a).

O número aumentado de NORs interfásicas, observado em células estimuladas para proliferação, pode ser explicado pelo fato que na fase G<sub>1</sub> ocorre nova síntese das proteínas AgNORs (PESSION *et al.*, 1991). Estas proteínas sintetizadas novamente acumulam-se no nucléolo, onde associam-se com os genes ribossomais localizados no compartimento extranucleolar, originando novas NORs interfásicas (WACHTLER *et al.*, 1986).

DERENZINI *et al.* (1988) descrevem que, devido à alta atividade mitótica, maior atividade proliferativa e provavelmente em virtude da ploidia, células malignas possuem maior número de AgNORs, o que está relacionado à sua maior atividade transcricional.

O tamanho dos "clusters" das AgNORs está relacionado com o estado proliferativo da célula (LEEK *et al.*, 1991; GROTTTO *et al.*, 1991; NAKAMURA *et al.*, 1992; NIKICICZ & NORBACK, 1990; GHAZIZADEH *et al.*, 1991; MOURAD *et al.*, 1992; OGURA *et al.*, 1992). A proliferação das células do músculo cardíaco de rato decai rapidamente durante os últimos estágios da vida fetal e nos primeiros dias de desenvolvimento pós-natal (ZAK *et al.*, 1973; CLAYCOMB *et al.*, 1973, 1975). Portanto, de acordo com estes dados, conseguimos justificar o aparecimento máximo dos "clusters" na idade de 21 dias de vida intra-uterina e, talvez devido à estabilização no metabolismo

celular, encontramos um índice mínimo dos “clusters” para a idade de 21 dias de vida pós-natal.

Nos trabalhos sobre AgNORs, a maioria dos autores encontrou um padrão morfológico diferente entre células tumorais malignas e benignas. Células malignas normalmente apresentaram AgNORs com tamanho maior e distribuição irregular e, ao contrário, AgNORs com tamanho menor e distribuição regular, eram características das células benignas (DERENZINI *et al.*, 1989; RÜSCHOFF *et al.*, 1989; DERENZINI & TRERÈ, 1991a; DERVAN *et al.*, 1989).

Tais semelhanças existem em relação aos núcleos dos cardiomiócitos dos animais de vida intra-uterina e àqueles com desenvolvimento pós-natal. Nos animais de vida intra-uterina, as AgNORs são distribuídas de maneira irregular e com maior tamanho, apresentando um padrão morfológico similar ao encontrado nos tumores malignos. Já nas células dos animais após o nascimento (8, 21 e 60 dias), o tamanho das AgNORs encontradas foi menor, com formato mais regular, sendo morfológicamente semelhante ao padrão verificado nos tumores benignos.

Em determinados núcleos de animais com 16, 19 e 21 dias de vida intra-uterina e 1,5 dias pós-natal, as AgNORs alinhadas apresentaram baixa porcentagem. Encontramos, do mesmo modo, o alinhamento das AgNORs nos núcleos dos animais com 8, 21 e 60 dias após o nascimento, porém, com maior frequência e quantidade, conforme ocorre o desenvolvimento e maturação dos miócitos.

Nos animais com 21 dias após o nascimento, o maior índice de núcleos alinhados esteve constituído por duas AgNORs, enquanto nos animais com 60 dias encontrou-se maior porcentagem de núcleos alinhados, apresentando mais que duas AgNORs.

Os mecanismos bioquímico e celular, responsáveis pelo novo comportamento de adaptação estrutural das AgNORs no músculo cardíaco de ratos, merecem futuras investigações. Devido a fatores técnicos, foi impossível estudar-se a estrutura

tridimensional das AgNORs nos cortes ultrafinos. Sabemos que novos métodos já foram descritos na literatura, utilizando-se o microscópio de laser confocal, sendo possível reconstruírem-se as AgNORs tridimensionalmente no núcleo (ROUSSEL *et al.*, 1993; ROBERT-FORTELE *et al.*, 1993; PARAZZA *et al.*, 1995; PLOTON *et al.*, 1994). Acreditamos que, futuramente, uma análise com o microscópio laser confocal poderá esclarecer, com maiores detalhes, as estruturas das AgNORs no núcleo de cardiomiócito.

Durante o desenvolvimento embrionário, ambas as células não diferenciadas e aquelas contendo proteínas miofibrilares se dividem. Quando o coração se desenvolve e atinge a maturidade, suas células musculares progressivamente diminuem a atividade mitótica (ANVERSA *et al.*, 1989).

A adaptação miocárdica pós-natal, necessária para a alteração do trabalho dos ventrículos, que ocorre rapidamente depois do nascimento, resulta em mudanças morfológicas transitórias em ratos na faixa de cinco dias de idade (OLIVETTI, ANVERSA, LOUD, 1980) e, devido às mudanças circulatórias, que acontecem logo após o nascimento (ANVERSA *et al.*, 1989), o desenvolvimento ventricular esquerdo apresenta uma combinação de hipertrofia excêntrica e concêntrica (ANVERSA, OLIVETTI, LOUD, 1980; ANVERSA, RICCI, OLIVETTI 1986). A maturação gradual de miócitos cardíacos é acompanhada por um prolongamento de todas as fases do ciclo mitótico, incluindo a fase "S" (RUMYANTESEV, 1977).

A soma das AgNORs foi máxima para ratos com a idade de 21 dias de vida intra-uterina, provavelmente devido a um maior aumento relacionado à atividade proliferativa. Nos animais com 21 dias de desenvolvimento pós-natal, a soma das AgNORs foi mínima, o que ocorreu talvez em virtude de uma estabilização no metabolismo celular.

As mudanças cíclicas na ultra-estrutura miofibrilar do miócito cardíaco do rato são acompanhadas pela nova síntese de proteínas contráteis durante a interfase. Esta nova síntese é necessária para um aumento gradual no conteúdo miofibrilar (RUMYANTSEV, 1977).

Nos cardiomiócitos de animais de 60 dias de desenvolvimento pós-natal, a porcentagem de pontos começa novamente a subir, possivelmente devido a uma nova síntese proteica, necessária para o complexo miofibrilar.

A análise de diversas idades demonstrou que, o tamanho e o formato dos “clusters” variam, obviamente, de acordo com a idade do animal, o que poderia ser usado como parâmetro quantitativo para documentação do desenvolvimento do coração.

Durante o desenvolvimento pós-natal dos miócitos ventriculares de rato, a expressão do Id mRNA (regulador negativo do gen de transcrição) é regulada, atingindo um pico no período de transição do desenvolvimento hiperplástico para hipertrófico, decaindo ao redor do 17<sup>o</sup> dia após o nascimento; tem um nível estável em miócitos adultos (SPRINGHORN *et al.*, 1992).

Em células musculares esqueléticas de ratos, a imobilização diminui e a remobilização, aumenta a síntese proteica intracelular (JOZSA *et al.*, 1993).

A concentração de RNA e síntese proteica aumentam no ventrículo após cinco dias de hipertensão, induzida pela constrição aórtica. A diminuição no conteúdo total do DNA confirma que não ocorreu proliferação (SIDDIQ *et al.*, 1992).

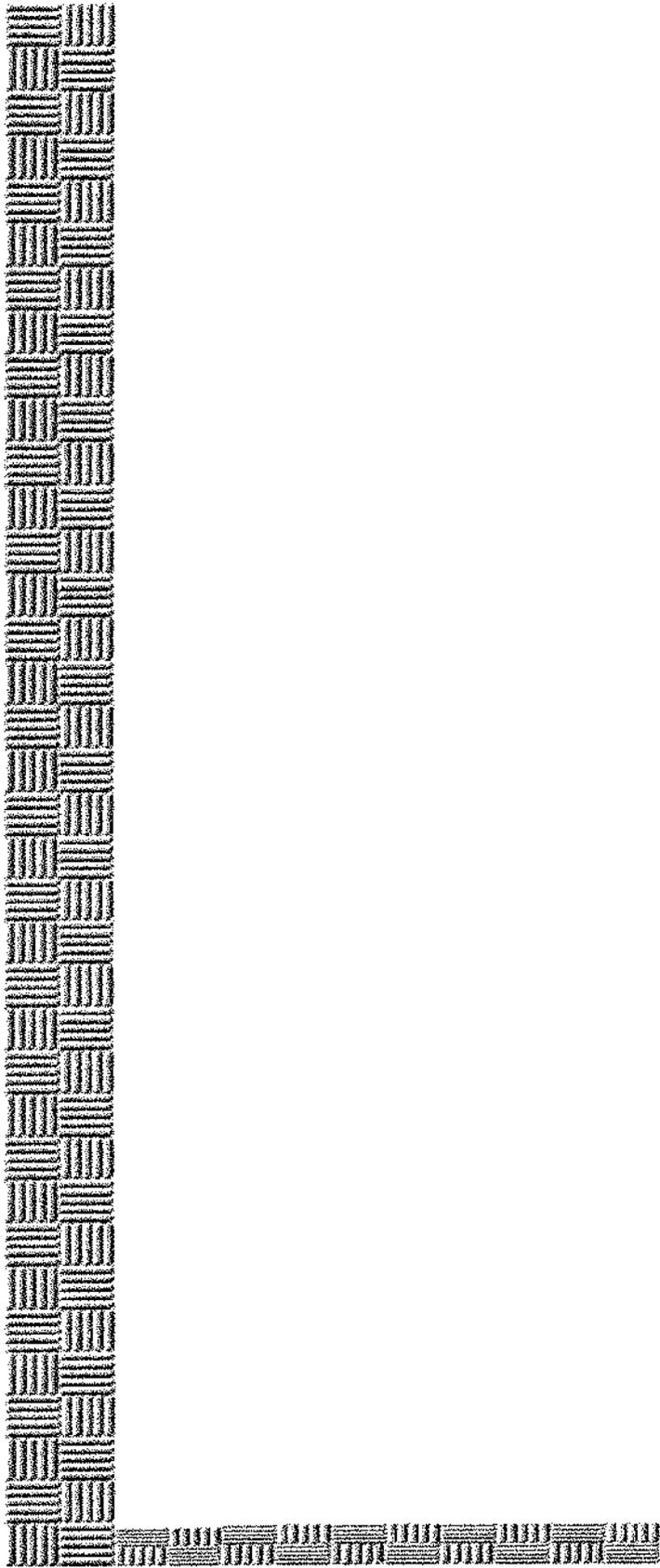
Métodos imuno-histoquímicos, que detectam antígenos relacionados com o ciclo celular, podem ser usados para que se demonstrem marcadores da célula em proliferação, como por exemplo, PCNA, Ki<sub>67</sub>, PC<sub>10</sub> (MATHEWS *et al.*, 1984).

ARBUSTINI *et al.* (1993) mostraram que, marcadores proliferativos celulares, tais como o PCNA e o Ki<sub>67</sub>, expressam poucos miócitos em corações humanos normais, enquanto a porcentagem de expressão aumenta em corações doentes. Concluíram que, esse aumento pode originar no miocárdio doente uma elevação de seu DNA renovado ou restabelecido, em consequência de uma inflamação, hipertrofia ou estímulo.

Um estudo realizado em cardiomiócitos de ratos, demonstrou que o mRNA para o gene PCNA está normalmente associado em célula proliferada, sendo expresso nas

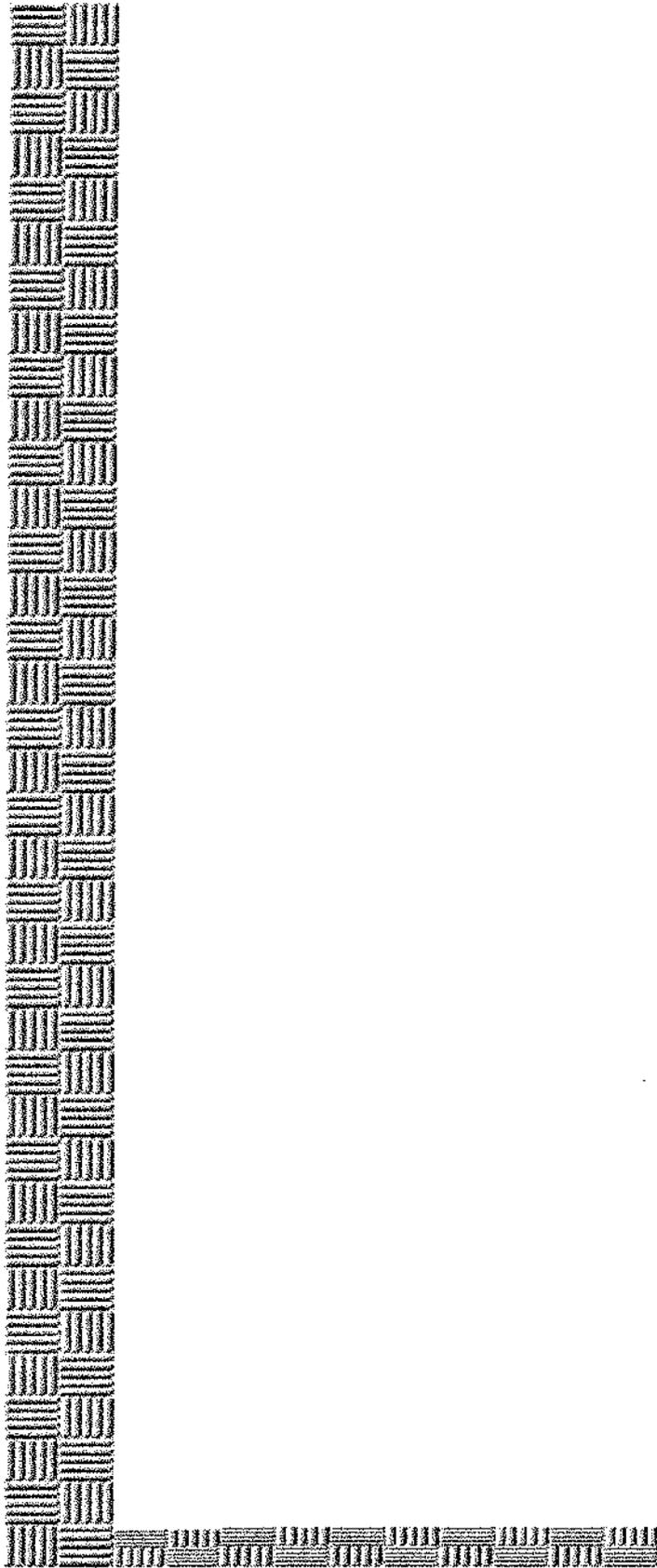
células do músculo cardíaco de ratos fetais, neonatais e adultos, que não mais sofrem processos mitóticos, sugerindo regulação pós-transcricional. O PCNA pode ser encontrado em células neonatais e fetais, porém, não naquelas do músculo cardíaco de ratos adultos (MARINO *et al.*, 1991).

Como a atividade proliferativa celular está associada à atividade nucleolar (NIWA *et al.*, 1992; KAUDEWITZ *et al.*, 1989; OGURA *et al.*, 1992; FIELD, FITZGERALD, SIN, 1984; SASAKI *et al.*, 1987; DERVAN *et al.*, 1989; TRERÈ *et al.*, 1991; CASASCO *et al.*, 1993; GERDES *et al.*, 1983; HALL *et al.*, 1988), estudos comparativos posteriores, entre a morfologia das AgNORs e a expressão imunohistoquímica do PCNA e (ou) Ki<sub>67</sub> em tecidos com desenvolvimento normal, como o cardiomiócito de rato, poderão fornecer dados importantes para uma melhor compreensão da cinética celular.



## ***5. Conclusões***

- I. Nossa análise, em microscopia eletrônica, demonstrou claramente que as precipitações de prata dentro do nucléolo são interligadas, o que torna uma contagem individual de precipitação arbitrária e pouco reproduzível. Por isso, acreditamos que, as precipitações de prata dentro de uma matriz devam ser consideradas como um “cluster” (uma unidade de AgNOR).
- II. Nossos resultados demonstraram que, os padrões morfológicos das AgNORs devem ser considerados, como já definidos para outros tecidos.
- III. A morfologia das AgNORs em relação ao tamanho dos “clusters”, provavelmente indica maior atividade proliferativa nas células, demonstrada qualitativa e quantitativamente nas idades de 16, 19 e 21 dias de vida intra-uterina e 1,5 dias pós-natal.
- IV. Os animais de 60 dias de vida após o nascimento apresentaram maior quantidade de “dots”, provavelmente relacionada a uma nova síntese protéica, necessária para o complexo miofibrilar.
- V. A análise do padrão das AgNORs, em diferentes idades, demonstrou que o tamanho e o formato das AgNORs variam de acordo com a idade do animal e, conseqüentemente, devem refletir alterações de proliferação e diferenciação celular durante o crescimento fisiológico do coração.
- VI. Os dados morfométricos das AgNORs permitiram a determinação exata da idade do animal em 79,7% dos casos (análise discriminante).
- VII. Para uma identificação segura das AgNORs, recomenda-se ausência de qualquer contracoloração. Com a finalidade de melhorar-se a identificação das células, pode ser feita uma pré-coloração no fragmento, com acetato de uranila 0,5%. O uso de citrato de chumbo e tetróxido de ósmio não é recomendável.
- VIII. A técnica, padronizada em cardiomiócitos no ventrículo esquerdo de rato, no presente estudo, é segura e confiável, pois através dela conseguimos obter dados ultra-estruturais satisfatórios.



## ***6. Summary***

Nucleolar organizing regions (NORs) are areas of extra or intranucleolar DNA which harbor genes coding for ribosomal RNA.

NORs have intense affinity for silver, which stains dots in the acrocentric chromosomes 13, 14, 15, 20 and 21. These are called argyrophilic NORs or AgNORs. This is due to the presence of non-histone proteins associated to ribosomal RNA recently transcribed from DNA.

Currently, the AgNOR technique is being employed in the evaluation of cellular proliferation, in distinguishing benign from malignant tumors and as an indicator of prognosis in malignant neoplasms. There has been considerable controversy in the criteria for measuring or counting AgNORs, making comparison of results from different authors often difficult. In an attempt to help define criteria for AgNOR measuring in light microscopy, we developed a technique for examining AgNORs in electron microscopy.

A normal tissue, the rat heart left ventricle in the fetal and postnatal periods was used. A total of 95 animals were studied at the following ages: 16, 19 and 21 pre-natal days; 1, 5, 8, 21 and 60 days after birth. For light microscopy 74 animals were used, and 21 for electron microscopy.

For light microscopy, material was fixed in 10% buffered formalin for one hour, dehydrated and cleared as usual and embedded in paraffin. Three  $\mu$ m sections were stained for AgNORs by the technique of Crocker & Nar (1987), slightly modified.

As no EM technique for AgNORs was found in the literature, we developed the following procedure empirically: tissue was fixed in Karnovsky's solution for one hour, followed by a quick rinse (3-5 seconds) in ethanol-acetic acid and incubated for 30 minutes in a solution containing 1 volume of 2% gelatine dissolved in 1% formic acid and 2 volumes of 50% aqueous silver nitrate. Solution was prepared and Millipore filtered just before use. Tissue blocks were then dehydrated in ascending alcohols and embedded in Araldite. We avoided using osmium tetroxide, uranyl acetate or lead citrate to ensure that any electrondense precipitations could be reliably attributed to silver.

EM revealed that an AgNOR cluster is formed by a group of silver precipitations intermingled with lighter strands and embedded in electronlucent matrix. The clusters correspond to the nucleolus itself. An AgNOR dot is a single dark precipitation

containing no matrix. Based on these observations, we adopted the criterion of counting a cluster (a nucleolus) as a single unit, since the counting of individual silver precipitations within a cluster proved unreliable and somewhat arbitrary.

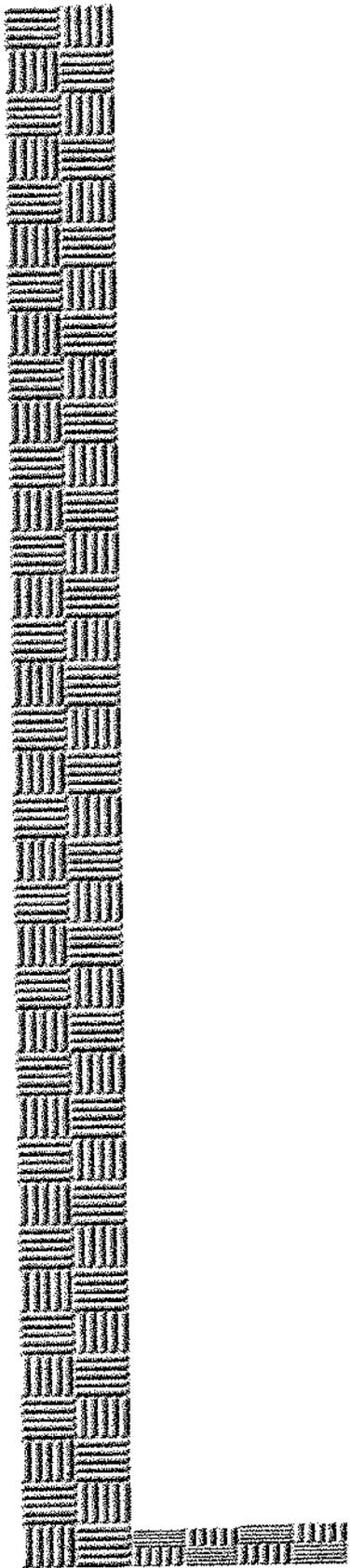
Examination of cardiomyocytes disclosed that large AgNOR clusters were more numerous in rats at 16, 19 and 21 prenatal days and 1,5 days postnatally than in animals at 8, 21 and 60 days after birth. This difference was interpreted as probably related to a higher proliferative activity of the cells in intrauterine life. At 60 days there was a high number of dots. This finding was thought to be a likely indicator of new protein synthesis necessary for the formation of the myofibrillary complex.

On a qualitative basis, the morphological appearance of the clusters was extremely similar, if not indistinguishable, for the ages 16, 19 and 21 prenatal days and 1,5 days postnatally. The same occurred for animals aged 8, 21 and 60 days postnatally. However it was possible to distinguish clearly between these two groups on cluster morphology alone. On the other hand, inside each group quantitative analysis showed significant differences between all ages.

In some cardiomyocyte nuclei we found three or more AgNORs on a straight line, which we designated as the alignment phenomenon. In animals with ages 16, 19 and 21 prenatal days and 1,5 days postnatally the number of such lined up AgNORs was small, while in those of later ages the phenomenon was observed with higher frequency.

Discriminating analysis showed that animals of different ages could be separated using morphometric data of AgNORs in 79,7 % of cases. For this effect, the numbers of nuclei with AgNOR alignment has a higher importance than the average AgNOR counting. Among the variables depending on the size of the AgNORs, precipitations larger than 2  $\mu$  are most important.

The high percentage of right results in age discrimination demonstrates that the technique here described is reliable and reproducible for morphometric evaluation of AgNORs.



## ***7. Referências bibliográficas***

- ALBERTS, B.; BRAY, J.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D.  
**Molecular Biology of the Cell.** 3 ed. New York, Garland, 1994.
- ALTEMANI, A.M.M.; CRESPO, A.; CARDINALI, I.A.; NORATO, D. Nucleolar organizer region (NORs) in pseudocarcinomatous hyperplasia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa. **São Paulo Medical Journal** 113: 693-7, 1995.
- ANGELIER, N.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; BOUTEILLE, M.; Visualization of AgNOR proteins on nucleolar transcriptional units in molecuar. **Chromossoma** 86:661-72, 1982.
- ANVERSA, P.; OLIVETTI, G.; LOUD, A.V. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I- Hypertrophy, hiperplasia and binucleation of myocytes. **Circ. Res.** 46: 495-502, 1980.
- ANVERSA, P.; PUNTILLO, E.; OLIVETTI, G.; SONNENBLICK, E.H.; CAPASSO, J.M. Load dependence of myocardial growth during maturation and aging. **G. Ital. Cardiol.** 19: 330-42, 1989.
- ANVERSA, P.; RICCI, R.; OLIVETTI, G. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: A review. **J. Am. Coll. Cardiol.** 7: 1140-9, 1986.
- ARBUSTINI, E.; DIEGOLI, M.; GRASSO, M.; FASANI, R.; D'ARMINI, A.; MARTINELLI, L.; GOGGI, C.; COMPANA, C.; GAVAZZI, A.; VIGANO, M. Expression of proliferating cell markes in normal and diseased humam hearts. **Am. J. Cardiol.** 72: 608-14, 1993.

- BAKER, D. E. J. IN: **The Laboratory Rat**. Academic Press, Inc. Ltda, New York; 1979; Vol.I, p.153-68.
- BISHOP, S.P. Myocardial cell growth in the normal and hypertrophying neonatal heart (abstra.). **Circulation 44 (Suppl):** II- 142, 1971.
- 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.
- BOQUIST, L.L.V. Nucleolar organizer regions in uterine sarcomas. **Virchow's Archiv (A) Pathl. Anat. 420:** 353-8, 1992.
- BRODSKY, W.J.; AREFLYEVA, A.M.; URYVAEVA, I.V. Mitotic polyploidization of mouse heart myocytes during the first postnatal week. **Cell Tissue Res. 210:**133-44,1980.
- BROW, L.R. & SHAPIRRO, S.H. The nucleolus as a factor in histopathologia diagnosis. **J. Histochem. 5:**157-60,1982.
- CASASCO, A.; GIORDANO, M.; DANOVA, M.; CASASCO, M.; CORNAGLIA, A. I.; CALLIGARO, A. PC10 monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues. **Histochemistry 99:** 191-9, 1993.
- CIA, E.M.M.; TREVISAN, M.A.S.; METZE, K. **Técnica AgNOR: Um auxílio no diagnóstico diferencial em citologia urinária**. Campinas, 1996. (Tese de Mestrado-Faculdade de ciências médicas da Unicamp). 89p.

- CLAYCOMB, W.C. DNA synthesis and DNA polymerase activity in differentiating cardiac muscle. **Biochem. Biophys Res. Communications.** **54:** 715-20, 1973.
- CLAYCOMB, W.C. & BRADSHAW, H.D.Jr. Acquisition of multiple nucleic and the activity of DNA replication in terminally differentiated adult cardiac muscle cells in culture. **Dev. Biol.** **99:** 331-7, 1983.
- CLAYCOMB, W.C. & LANSON, N.A.J. Proto-oncogene expression in proliferating and differentiating cardiac and skeletal muscle. **J. Biochem.** **247:** 701-6, 1987.
- CLAYCOMB, W.C. Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. Deoxyribonucleic acid synthesis and nuclear and cytoplasmic deoxyribonucleic acid polymerase activity. **J. Biol. Chem.** **250:** 3229-35, 1975.
- CLUBB, F.J. & BISHOP, S.P. Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. **Lab. Invest.** **50:** 571-7, 1984.
- COLECCHIA, M. & LEOPARDI, O. Evaluation of AgNOR count in distinguishing benign from malignant mesothelial cells in pleural fluids. **Path. Res. Pract.** **188:** 541-4, 1992.
- CROCKER, J. & EGAN, M.J. Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas. **J. Pathol** **156:** 233-9, 1988.
- CROCKER, J. & NAR, P. Nucleolar Organizer Region in Lymphomas. **J. Pathol.** **151:** 111-8, 1987.

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.

CROCKER, J.; Nucleolar organizer regions. IN **Current Topic in Pathol.** **82**: 91-149, 1990.

CROCKER, J.; MACARTNEY, J.C.; SMITH, P.J. Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. **J. Pathol.** **154**: 151-6, 1988.

DAS, B.C.; RANI, R. MITRA, A.B.; LUTHRA, U.K. The number of silver-staining NORs (DNAr) in lymphocytes of newborns and its relationship to human development. **Mech. Ageing Dev.** **36**: 117-23, 1986.

DERENZINI, M. & TRERÈ, D. Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumor pathology. **Virchow's Arch. (B) Cell. Pathol.** **61**: 1- 8, 1991a.

DERENZINI, M.; & TRERÈ, D. Standardization of interphase Ag-NOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. **J. Path.** **165**: 337-42, 1991b.

DERENZINI, M.; BETTS, C.M.; CECCARELLI, C.; EUSEBI, V. Ultrastructural organization of nucleoli in benign naevi malignant melanomas. **Virchow's Arch. (B) Anat. Pathol.** **51**: 343-52, 1986.

DERENZINI, M.; BETTS, C.M.; TRERÈ, D.; MAMBELLI, V.; MILLIS, R.R.; EUSEBI, V.; CANCELLIERI, A. Diagnostic value of silver-stained interphasic nucleolar organizer regions in breast tumours. **Ult. Pathol.** **14**: 233 - 45, 1990a.

- DERENZINI, M.; FARABEGOLI, F.; TRERÈ, D. Relationship between interphase AgNOR distribution and nucleolar size in cancer cells. **J. Histochemical** 24: 951-6, 1992.
- DERENZINI, M.; FARABEGOLI, F.; PESSION, A.; NOVELLO, F. Spatial redistribution of ribosomal chromatin in the fibrillar centres of human circulating lymphocytes after stimulation of transcription. **Exp. Cell. Res.** 170: 31-41, 1987.
- DERENZINI, M.; PESSION, A.; TRERÈ, D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. **Lab. Invest.** 63: 137-40, 1990b.
- DERENZINI, M.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; PESSION, A.; NOVELLO, F. Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution. **J. Ultrast. Res.** 84: 161-72, 1983.
- DERENZINI, M.; PESSION, A.; FARABEGOLI, F.; TRERÈ, D.; BADIALI, M.; DEHAN, P. Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. **Am. J. Pathol.** 134: 925-32, 1989.
- DERENZINI, M.; ROMAGNOLI, T.; MINGAZZINI, P.; MARINOZZI, V. Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. **Virchow's Arch. (B) Cell. Pathol.** 54: 334-40, 1988.
- DERENZINI, M.; THIRY, M.; GOESSENS, G. Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. **J. Histochem. Cytochem.** 38: 1237-56, 1990c.

- DERVAN, P.A.; GILMARTIN, L.G.; LOFTUS, B.M.; CARNEY, D.N. Breast carcinoma kinetics. Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with  $K_{i-67}$  scores. **Am. J. Clin. Pathol.** **92**: 401-7, 1989.
- DONELLY, H. In **Laboratory Animals: An introduction for new experimenters.** Tuffery, A. A.; New York; 1987; p.63-78.
- EUSEBI, V.; CATTANI, M.G.; LAMOVEC, J.; TRERÈ, D.; CECCARELLI, C.; VERONESI, P.; CLEMENTE, C.; DERENZINI, M. Prognostic relevance of silver-stained nucleolar proteins in sarcomatoid carcinomas of the breast. **Ultrast. Pathol.** **15**: 203-14, 1991.
- EVANS, A.T.; ORRELL, J. M.; GRANT, A. Re-evaluating silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in problematic cutaneous melanocytic lesions: a study with quantitation and pattern analysis. **J. Pathol.** **165**: 61-7, 1991.
- FAKAN, S. & HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. **Bioll. Cell.** **56**: 189-206, 1986.
- FISCHER, B.; SCHLÜTER, G.; ADLER, C.P.; SANDRITTER, W. Cytophotometric DNA, histone and non-histone protein determinations on human hearts. **Beitr. Path. Bd.** **141**: 238-60, 1970.
- FIELD, D.H.; FIGZGERALD, P.H.; SIN, F.Y.I. Nucleolar silver-staining patterns related to cell cycle phase and cell generation of PHA-stimulated human lymphocytes. **Cytobios** **41**: 23-33, 1984.

- GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer** 31: 13-20, 1983.
- GHAZIZADEH, M.; SASAKI, Y.; OGURO, T.; AIHARA, K. Silver staining of organizer regions in prostatic lesions. **Histopathology** 19: 369-72, 1991.
- GILBERT, M.F.; LORAND-METZE, I.; GROTTO, H.Z.W.; METZE, K. Pattern of nucleolar organizer regions in human normal granulopoiesis and leukemias. **Pathology, Research and Practice** 189, (6-7), 705, 1993 (abstract).
- GILBERT, M.F.; METZE, K.; LORAND-METZE, I. Nucleolar organizer regions in chronic myeloid leukemia. **La Revista de Investigacion Clinica, Suplemento abril**, pg. 246. 1994. (abstract).
- GILBERT, M.F.P.; METZE, K.; LORAND-METZE, I. Changes of nucleolar organizer regions in granulopoietic during the course of chronic myeloid leukemia. **Annals of Hematology** 71: no prelo, 1995.
- GOESSENS, G. Nucleolar structure. **Int. Rev. Cytol.** 87: 107-58, 1984.
- GOODPASTURE, C. & BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma** 53: 37-50, 1974.
- 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.

- GRIMM, A.F.; DE LA TORRE; LA PORTA, M. Ventricular nuclei-DNA relationships with myocardial growth and hypertrophy in the rat. **Circ. Res.** **26**: 45-52, 1970.
- GROTTO, H.Z.W.; LORAND-METZE I.; METZE, K. Nucleolar organizer regions in normal hematopoiesis: relationship to cellular proliferation and maturation. **Nouv. Rev. Franc. Hemat.** **32**: 1- 4, 1991.
- GROTTO, H.Z.W.; METZE, K.; LORAND-METZE, I. Pattern of nucleolar organizer regions in human leukemic cells. **An. Cell. Pathol.** **5**: 203-12, 1993.
- GROTTO, M.Z.W.; LORAND-METZE, I.G.H.; METZE, K. Nucleolus-organisierend regionen in interphasenkernen normalen und leukamischen knochenmarkes in V.Lohrs (Ed.) Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Pathologie 74, Tangung Pathologie der Haematopotischen Stammzelle, Gustav Fischer. Verlag, Styttgart, N. York, pg. 469, 1990.
- GROVE, D.; NAIR, K.G.; ZAK, R. Biochemical correlates of cardiac hypertrophy - III Changes in DNA content; the relative contributions of polyploidy and mitotic activity. **Circ. Res. Vol.** **25**: 463-71, 1969a.
- GROVE, D.; ZAK, R.; NAIR, K.G.; ASCHENBRENNER, V. Biochemical correlates of cardiac hypertrophy: IV Observations on the cellular organization of growth during myocardial hypertrophy in the rat. **Circ. Res.** **25**: 473-85, 1969b.
- HALL, P.A.; CROCKER, J.; WATTS, A.; STANSFELD, A.G. A comparison of nucleolar organizer region staining and ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. **Histopathology** **12**: 373-81, 1988.

- HAMILTON, P.W. Nucleolar organizer region in: HAMILTON, P.W., ALLEN, D.D. Quantitative clinical pathology. Oxford, Blackwell Sciences, 1995; páginas, 127-39.
- HANSEN, A.B. & ANDERSEN, C.B. Stereological estimation of nucleolar organizer regions in prostatic tissue with an optical disector. **APMIS 100**: 135-41, 1992.
- HANSEN, A.B. & OSTERGARD, B. Nucleolar organiser regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue. **Virchow's Arch. (A) Pathol. Anat. 417**: 9-13, 1990.
- HERNANDEZ-VERDUN, D. Structural organization of the nucleolus in mammalian cells. **Methods Arch. Exp. Pathol. 12**: 26-62 1986.
- HERNANDEZ-VERDUN, D.; DERENZINI, M.; BOUTEILLE, M. The morphological relationship in electron microscopy between NOR-silver proteins and intra nucleolar chromatin. **Chromosoma 85**: 461-73, 1982.
- 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 79**: 349-62, 1980.
- HERNANDEZ-VERDUN, D. & DERENZINI, M. Non-nucleosomal configuration of chromatin in nucleolar organizer region of metaphase chromosomes in situ. **Eur. J. Cell. Biol. 31**: 360-65, 1983.
- HOWAT, A.J.; GIRI, D.D.; WRIGHT, A.L.; UNDERWOOD, J.C.E. Silver stained nucleoli and nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. **J. Pathol. 156**: 227-32, 1988.

- HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A<sub>1</sub>-step method. **Experientia** **36**: 1014-5, 1980.
- HOWELL, W.N. Selective staining of nucleolar organizer regions (NORs). In **the Cell. Nucleus** Vol. XI (ed.H.Busch e L.Rothblum), p. 89-142. Acad.Press: N. York London, 1982.
- HSU, T.C.; SPIRITO, S.E.; PARDUE, M.L. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. **Chromossoma**, **53**: 25-36, 1975.
- HUBBEL, H.R.; ROTHBLUM, L.I.; HSU, T.C. Identification of a silver binding protein associated with the nucleolar region. **Cell. Bioll. Int. Rep.** **37**: 615-22, 1979.
- JOZSA, L.; KANNUS, P.; JÄRVINEN, M.; ISOLA, J.; KVIST, M.; LEHTO, M. Atrophy and regeneration of rat calf muscles cause reversible changes in the number of nucleolar organizer regions. Evidence that also in nonproliferating cells the number of NORs is a marker of protein synthesis activity. **Laboratory Investigation** **69**: 231-8, 1993.
- KANITAKIS, J.; HOYO, E.; HERMIER, C.; CHOUVET, B.; THIVOLET, J. Nucleolar organizer region enumeration in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas of the skin. **Cancer** **69**: 2937-41, 1992.
- KARNOVSKY, M.D. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of ligh osmolality for use in electron-microscopy (abstr.) **J. Cell. Biol.** **27**: 137a, 1965.

- KATZBERG, A. A.; FARMER, B. B.; HARRIS, R. A. The predominance of binucleation in isolated rat heart myocytes. **Am. J. Anat.** **149**: 489-495, 1977.
- KAUDEWITZ, P.; BRAUN-FALCO, O.; ERNST, M.; LANDTHALER, M.; SHOLZ, W.; GERDES, J. Tumor cell growth fraction in human malignant melanomas and the correlation to histopathologic tumor gradind. **Am. J. Pathol.** **134**: 1036-48, 1989.
- KHATTECH, A.; SPATZ, A.; PADRE, M.; DUVILLARD, P.; CHARPENTIER, P.; BOGNEL, C.; MICHEL, G.; LHOMMÉ, C. Nucleolar organizer regions in ovarian tumors: discrimination between carcinoma and bordeline tumor. **Int. J. Gynecol. Pathol.** **11**: 11-14, 1992.
- KORECKY, B.; SWEET, S.; RAKUSAN, K. Number of nucleic in mammalian cardiac myocytes. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** **57**: 1122-7, 1979.
- KUHN, H.; PFITZER, P.; STOEPEL, K. DNA content and DNA synthesis in the myocardium of rats after induced renal hypertension. **Cardiovasc. Res.** **8**: 86-91, 1974.
- LEBLANC, B.; MOMPON, P.R.; ESPÉRANDIEU, O.; GEFFRAY, B.; GUILLERMO, C. Nucleolar organizer regions in cardiac lesions induced by doxorubicin. **Toxic. Path.** **19**: 176-83, 1993.
- LEEK, R.D.; ALISON, M. R.; SARRAF, C. E. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. **J. Pathol.** **165**: 43-51, 1991.

LEWIN, B. Gene expression, 2 eucaryotic cromosomes. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley and Sons 875-8, 1989.

LORAND - METZE, I.; GROTTTO, H.Z.W.; METZE, K. Nucleolar organizer regions in interphase nucleic of human leucemia cells. **Blood 78 (supl. 1)**, 456a, 1991.

LORAND-METZE, I. & METZE, K. Nucleolar organizer regions (AgNORs) as a parameter of disease activity on chronic lymphocytic leukemia. **Path. Res. an Practice 727**, 1995 (abstract).

MARINO, T. A.; HALDAR, S.; WILLIAMSON, E. C.; BEAVERSON, K.; WALTER, R. A.; MARINO, D. R.; BEATTY, C.; LIPSON, E. K. Proliferating cell nuclear antigen in developing and adult rat cardiac muscle cells. **Circ. Res. 69**: 1353-60, 1991.

MATHEWS, M.B.; BERNSTEIN, R.M.; FRANZA, B.R.J. ; GARRELS, J.F. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. **Nature 309**: 374-6, 1984.

METZE, K. & LORAND-METZE, I. Silver staining of nucleolar organizer regions in prostatic lesions. **Histopathology 21**: 97-8, 1992.

METZE, K. & LORAND-METZE, I. Interpretation of the AgNOR pattern in haematologic cytology. **Acta Haematol. 89**: 110-11, 1993.

METZE, K. & LORAND-METZE, I. AgNOR staining in normal bone marrow cells (letter.) **J. Clin. Pathol. 44**: 526, 1991.

- MOHAMED-J., G.J.; ARMSTRONG, S. J.; CROCKER, J.; LEYLAND, M. J.; HULTEN, M. A. The relationship between number of interphase NORs-bearing chromosomes in non Hodgkins's lymphoma. **J. Pathol.** **158:** 3-7, 1989.
- MOURAD, W.A.; KATZ, R.L.; SEMBERA, D.; ATKINSON, E.N.; EL-NAGGAR, A.K. Two AgNOR counts in fine needle aspirates of lymphoproliferative disorders compared with acridine orange flow cytometry. **Diagnostic Cytopath.** **8:** 128-34, 1992.
- MURRAY, P.G.; BOLDY, D.A.R.; CROCKE, J.; AYRES, J.G. Sequential demonstration of antigens and AgNORs in frozen and paraffin sections. **J. Pathol.** **159:** 169-72, 1989.
- NAKAMURA, S.; TAKEDA, Y.; OKABE, Y.; YOSHIDA, T.; OHTAKE, S.; KOBAYASHI, K.; KANNO, M.; MATSUDA, T. Argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region in acute leukemias and its relation to the S-phase fraction of leukemic cells. **Acta Haematol.** **87:** 6-10, 1992.
- NIKICICZ, E.P. & NORBACK, D.H. Argyrophilic nucleolar organiser region (AgNOR) staining in normal bone marrow cells. **J. Clin. Pathol.** **43:** 723-7, 1990.
- NIWA, K.; YOKOYAMA, Y.; FURUI, T.; TANAKA, T.; MORI, H.; MORI, H. Changes of silver-stained nucleolar organizer regions in mouse endometrial carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea and 17 $\beta$ -oestradiol. **Virchow's Archiv. (A) Pathol. Anat.** **421:** 387-91, 1992.

- NIWA, K.; YOKOYAMA, Y.; TANAKA, T.; MORI, H.; MORI, H.; TAMAYA, T. Silver - stained nucleolar organizer regions in the normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. **Virchow's Arch. (A) Pathol. Anat.** 419: 493-7, 1991.
- OGURA, S.; SHOSAKU, A.; SUKOH, N.; KUNIKANE, H.; NAKAJIMA, I.; INOUE, K.; KAWAKAMI, Y. Correlation between nucleolar organizer regions visualized by silver staining and the growth rate in lung adenocarcinoma. **Cancer** 70: 63 -8, 1992.
- OLIVETTI, G.; ANVERSA, P.; LOUD, A.V. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue, composition, capillary growth and sarcoplasmic alterations. **Circ. Res.** 46: 503 -12, 1980.
- OOMS, E.C.M. & VELDHUIZEN, R.W. Argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region in bladder-tumours. **Virchow's Archiv. Pathol. Anat. (A)** 414: 365-9, 1989.
- PARAZZA, F.; BERTIN, E.; WOZNIAK, Z.; USSON, Y. Analysis of the spatial distribution of AgNOR proteins in cell nuclei using simultaneous confocal scanning laser fluorescence and transmitted light microscopy. **J. Microscopy** 178: 251-60, 1995.
- PERRY, R.P. Processing of RNA. **A Rev. Biochem.** 45: 605-29, 1976.
- PESSION, A.; FARABEGOLI, F.; TRERÈ, D.; NOVELHO, F.; MONTANARO, L.; SPERT, S.; RAMBELLI, F.; DERENZINI, M. AgNOR proteins and transcription and duplication of ribosomal genes in mammalian cell nucleoli. **Chromosoma** 100: 242-50, 1991.

- PETERSON, R.O. & BASERGA, R. Nucleic acid and protein synthesis in cardiac muscle of growing and adult mice. **Exp. Cell. Res.** **40**: 340-2, 1965.
- PFEIFLE, J.; BOLLER, K.; ANDERER, F.A. Phosphoprotein pp135 is an essential component of the nucleolar organizer region (NOR). **Exp. Cell. Res.** **162**: 11-22, 1986.
- PLOTON, D.; GILBERT, N.; MÈNAGER, M.; KAPLAN, H.; ADNET, J.-J. Three-dimensional co-localization of nucleolar argyrophilic components and DNA in cell nuclei by confocal microscopy. **J. Histochem. Cytochem.** **42**: 137-48, 1994.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; ADNET, J.-J. Simultaneous ultrastructural localization of Ag-NOR ( nucleolar organizer region) proteins and ribonucleoproteins during mitosis, in human breast cancerous tissues. **J. Cell. Sci.** **74**: 239-56, 1985.
- PLOTON, D.; 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.
- PLOTON, D.; THIRY, M.; MENAGER, M.; LEPOINT, A.; ADNET, J.-J.; GOESSENS, G. Behaviour of nucleolus during mitosis. A comparative ultrastructural study of various cancerous cell lines using the Ag-NOR staining procedure. **Chromosoma** **95**: 95-107, 1987.
- RAKUSAN, K.; RAMAN, S.; LAYBERRY, R.; KORECKY, B. The influence of aging and growth on the postnatal development of cardiac muscle in rats. **Circ. Res.** **42**: 212-8, 1978.

- RASKA, I.; OCHS, R.L.; SALAMANIN-M., L. Immunocytochemistry of the cell nucleus. **Electron Microsc. Rev.** **3**: 301-53, 1990.
- RAYTER, Z.; SURTEES, P.; TILDSLEY, G.; CORBISHLEY, C. The prognostic value of argyrophil nucleolar organizer regions ( AgNORs ) in colorectal cancer. **European J. Sur. Oncology** **18**: 37-40, 1992.
- RIBOTTA, M.; DONNA, A.; BETTA, P.-G.; LIBENER, R. BELLINGERI, D.; ROBOTTI, F. Quantitative analysis of nucleoli and nucleolar organizer regions in cultured primary human normal, reactive and malignant mesothelial cells. **Path. Res. Pract.** **188**: 536-40, 1992.
- ROBERT-FORTELE, I.; JUNÉRA, H.R.; GÉRAUD, G.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Three-dimensional organization of the ribosomal genes and Ag-NOR proteins during interphase and mitosis in PtK<sub>1</sub> cells studied by confocal microscopy. **Chromosoma** **102**: 146-57, 1993.
- ROUSSEL, P.; ANDRÉ, C.; MASSON, C.; GÉRAUD, G.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Localization of the polymerase I transcription hUBF during the cell cycle. **J. Cell. Sci.** **104**: 327-37, 1993.
- RUMYANTSEV, P.P. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. **Int. Rev. Citol.** **51**: 187-273, 1977.
- RÜSCHOFF, J.; PLATE, K.H.; CONTRACTOR, H. & THOMAS, C. Silver-stained structures (AgNORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. **J. Pathol.** **161**: 89-90, 1990a.

- 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.
- RÜSCHOFF, J.; PLATE, K.H.; CONTRACTOR, H.; KERN, S.; ZIMMERMANN, R.; THOMAS, C. Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. **J. Pathol.** **161**: 113-8, 1990b.
- RÜSCHOFF, J.; ZIMMERMANN, R.; ULSHÖFER, B.; THOMAS, C. Silver-stained nucleolar organizer proteins in urothelial bladder lesions. A morphometric study. **Path. Res. Pract.** **118**: 593-8, 1992.
- SACKS, N.P.M.; ROBERTSON, J.F.R.; ELLIS, I.O.; NICHOLSON, R.I.; CROCKER, J.; BLAMEY, R.W. Silver - stained nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in primary breast cancer. **European J. Surgical Oncology** **18**: 92-102, 1992.
- SASAKI, K.; MURAKAMI, T.; KAWASAKI, M.; TAKAHASHI, M. The cell cycle associated change of the K<sub>i-67</sub> reactive nuclear antigen expression. **J. Cell. Physiol.** **133**: 579-84, 1987.
- SASAKI, R., MORISHITA, T.; YAMAGATA, S. Mitosis of heart muscle cells in normal rats. **Tohoku J. Exp. Med.** **96**: 405-11, 1968.
- SCHWARZACHER, H.G.; MIKESÁAR, A.V.; SCHNEDL, W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. **Cytogenet. Cell. Genet.** **20**: 24-39, 1978.

- SCHWARZACHER, H.G. & WACHTLER, F. Nucleolus organizer regions and nucleoli. **Hum. Genet. 63:** 89 -99,1983.
- SIDDIQ, T.; RICHARDSON, P.J.; SHERWOOD, R.A.; PREEDY, V.R. Protein synthesis in pulmonary, cardiac and skeletal muscle in acute hypertension induced by aortic constriction in the rat. **Card. Res. 26:** 72-81, 1992.
- SMETANA, K. & LIKOVSKY, Z. Nucleolar silver-stained granules in maturing erythroid and granulocytic cells **Cell. Tissue Res. 237:** 367-70, 1984.
- SMITH, P.J.; SKILBECK, N.; HARRISON, A.; CROCKER, J. The effect of a series of fixatives on the Ag-NOR technique. **J. Pathol. 155:** 109 -12,1988.
- SMITH, R. & CROCKER, J. Evaluation of nucleolar organizer region- associated proteins in breast malignancy. **Histopathology 12:** 113-25, 1988.
- SINN, H.P.; LEHNERT, T.; KANDETZKI, C.; WALDHERR, R. Nucleolar organizer regions in myogenic stromal tumours. **Virchow's Archiv. (A) Pathol. Anat. 415:** 317-21, 1989.
- SOONRO, I.N. & WHINSTER, W.F. Growth fraction in lung tumors determined by Ki<sub>67</sub> immunostaining and comparison with AgNOR scores. **J. Pathol. 162:** 217-22, 1990.
- SPECTOR, D.L.; OCHS, R.L.; BUSCH, H. Silver staining immunofluorescence and immunoelectron microscopia localization of nucleolar phosphoproteins b23. **Chromosoma 90:** 139-48, 1984.

SPRINGHORN, J.P.; ELLINGSEN, O.; BERGER, H-J.; KELLY, R.A.; SMITH, T.W.

Transcriptional regulation in cardiac muscle. Coordinate expression of Id with a neonatal phenotype during development and following a hypertrophic stimulus in adult rat ventricular myocytes "in vitro". **J. Biol. Chemistry** **267**: 14360-5, 1992.

SURESH, U.R.; CHAWNER, L.; BUCKLEY, C.H.; FOX, H. Do AgNOR counts reflect

cellular ploidy or cellular proliferation ? A study of trophoblastic tissue. **J.Pathol.** **160**: 213-15, 1990.

THEILER, K. **The House Mouse**. In: Development and normal stages from fertilization to

4 weeks of ages. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York; 1972; p. 1-2.

TRERÈ, D.; FARABEGOLI, F.; CANCELLIERI, A.; CECCARELLI, C.; EUSEBI, V.;

DERENZINI, M. AgNOR area in interphase nucleic of human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labelling and K<sub>1-67</sub> immunostaining. **J. Pathol.** **165**: 53-9, 1991.

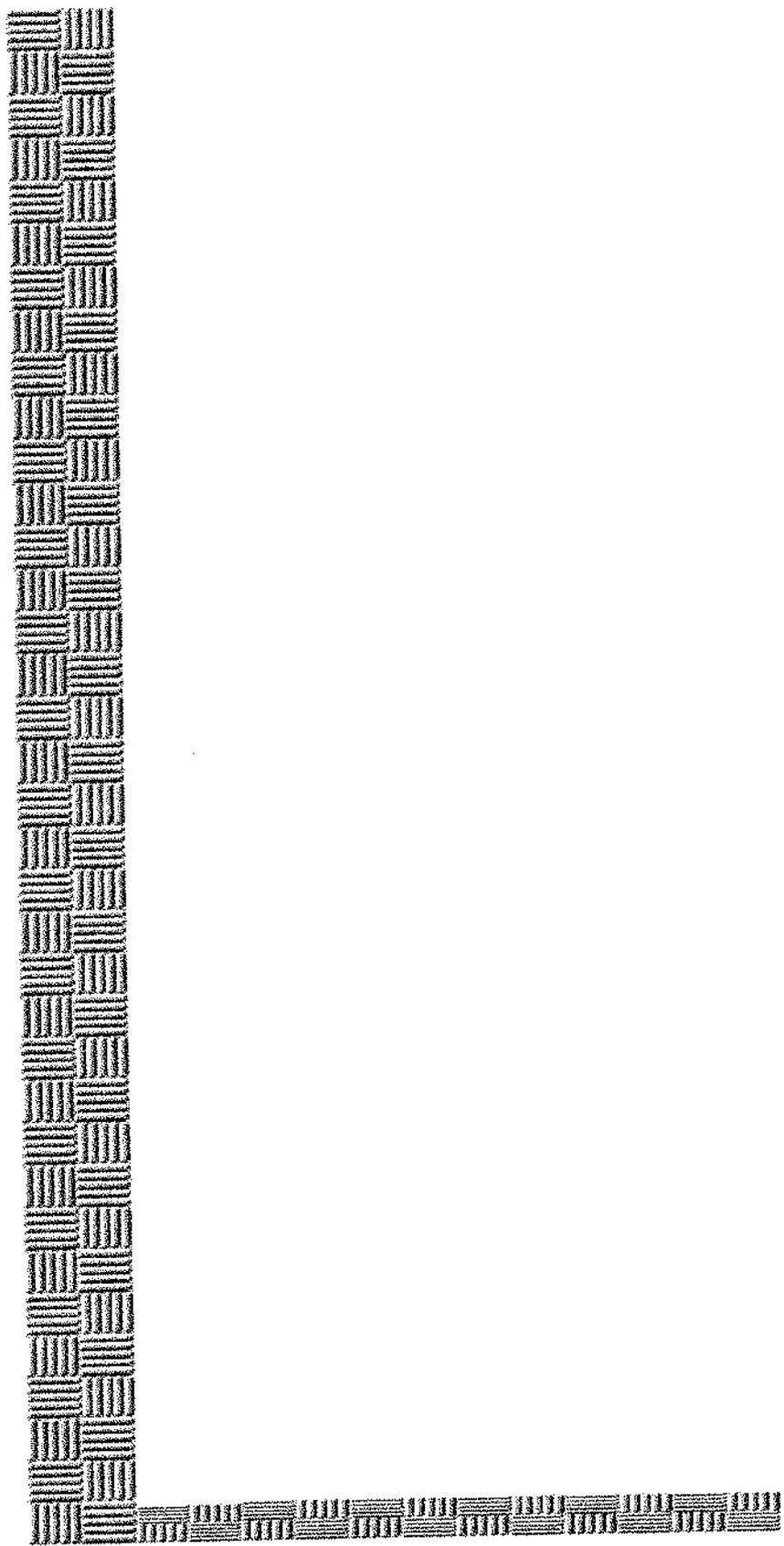
TREVISAN, M.S. **A técnica AgNOR no diagnóstico do câncer da mucosa coloretal:**

**aplicação em exames citológicos**. Campinas, 1995. (Tese de Livre Docência-Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp). 60p.

TREVISAN, M.S.; SOUZA, M.I.; MAGNA, L.A. Nucleolar organizer regions of

mesothelial and carcinomatous cells in effusions. **Diagn. Cytopathol.** **9**: 492-7, 1993.

- TRÖSTER, H.; SPRING, H.; MEISSNER, B.; SCHULTZ, P.; ONDET, P.; TRENDELENBURG, M.F. Structural organization of an active chromosomal nucleolar organizer region (NOR) identified by light microscopy, and subsequent TEM and STEM electron microscopy. **Chromosoma** **91**: 151-63, 1985.
- UNDERWOOD, J.C.E. Nuclear Morphology and grading in tumours. In: **Current Topics in Pathol.** v. 82 UNDERWOOD, J.C.E. (ed.) Pathology of the nucleus. Heidelberg. Springer Verlag, 1990; p. 1-15.
- UNDERWOOD, J.C.E. & GIRI, D.D. Editorial: Nucleolar organizer regions as a diagnostic discriminants for malignancy. **J. Pathol.** **155**: 95-6, 1988.
- WACHTLER, F.; HOPMAN, A.H.N.; WIEGANT, J.; SCHWARZACHER, H.G. On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nucleoli. **Exp. Cell. Res.** **167**: 227-40, 1986.
- ZAK, R. Cell Proliferation during cardiac growth. **Am. J. Cardiol.** **31**: 211-9, 1973.
- ZAK, R. Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. **Circ. Res. Supp.** **II 34-35**: 17-26, 1974.
- ZAKHAROV, A.F.; DAVUBOV, A.Z.; BENJUSH, Y.A.; EGOLINA, N.A. Polymorphisms of Ag-stained nucleolar organizer regions in man. **Hum. Gent.** **60**: 334-9, 1987.



## ***8. Anexo***

Números médios das AgNORs da classe  $\leq 0,5 \mu\text{m}$

Nº do animal	Grupo 1 16 dias i.u.	Grupo 2 19 dias i.u.	Grupo 3 21 dias i.u.	Grupo 4 1,5 dia a.n.	Grupo 5 8 dias a.n..	Grupo 6 21 dias a.n..	Grupo 7 60 dias a.n.
1	0,36	0,46	0,32	0,11	0,18	0,14	1,03
2	0,47	0,36	0,57	0,23	0,26	0,18	0,90
3	0,41	0,33	0,43	0,40	0,26	0,15	1,13
4	0,28	0,18	0,27	0,30	0,38	0,12	0,70
5	0,38	0,14	0,36	0,41	0,13	0,24	0,64
6	0,19	0,26	0,46	0,40	0,11	0,14	1,60
7	0,28	0,22	0,51	0,51	0,24	0,06	0,85
8	0,38	0,60	0,41	0,49	0,13	0,12	1,05
9	0,39	0,42	0,24	0,30	0,26	0,22	0,98
10	0,41	0,45	0,43	0,36	0,18	0,07	0,81
11				0,36	0,24	0,13	
12						0,12	

Teste de Kruskal-Wallis

H = 49,683 com 6 graus de liberdade  $p < 0,001$

## Teste Dunn

Grupos	Diferenças	SE	Q	p<0,05
7X6	69,50-10,67=58,83	9,21	6,391	sim
7X5	69,50-21,41=48,09	9,39	5,120	sim
7X2	69,50-38,50=31,00	9,61	3,224	sim
7X4	69,50-39,95=29,55	9,39	3,145	sim
7X1	69,50-41,85=27,65	9,61	2,876	não
7X3	69,50-47,35=22,15			eliminado
3X6	47,35-10,67=36,68	9,21	3,985	sim
3X5	47,35-21,41=25,94	9,39	2,762	não
3X2	47,35-38,50=8,85			eliminado
3X4	47,35-39,95=7,40			eliminado
3X1	47,35-41,85=5,50			eliminado
1X6	41,85-10,67=31,18	9,21	3,388	sim
1X5	41,85-21,41=20,44			eliminado
1X2	41,85-38,50=3,35			eliminado
1X4	41,85-39,95=1,90			eliminado
4X6	39,95-10,67=29,29	8,97	3,264	sim
4X5	39,95-21,45=18,55			eliminado
4X2	39,95-38,50=1,45			eliminado
2X6	38,50-10,67=27,83	9,21	3,024	não
2X5	38,50-21,41=17,09			eliminado
5X6	21,41-10,67=10,74			eliminado

**Números Médios das AgNORs da classe 0,6 - 1,0  $\mu$ m**

<b>Nº do Animal</b>	<b>Grupo 1 16 dias i.u.</b>	<b>Grupo 2 19 dias i.u.</b>	<b>Grupo 3 21 dias i.u.</b>	<b>Grupo 4 1,5 dia a.n.</b>	<b>Grupo 5 8 dias a.n.</b>	<b>Grupo 6 21 dias a.n.</b>	<b>Grupo 7 60 dias a.n.</b>
1	3,38	3,53	3,40	2,38	2,35	1,99	1,35
2	3,22	2,63	2,99	3,58	1,91	2,51	1,21
3	3,19	3,22	3,15	3,19	1,80	2,43	1,01
4	2,75	2,95	3,67	4,07	2,38	1,91	1,21
5	3,07	3,60	4,35	4,07	2,48	1,72	1,60
6	2,97	4,26	3,15	3,60	2,84	1,49	1,14
7	3,53	3,46	3,44	3,30	2,53	1,55	1,06
8	2,50	2,78	4,95	3,91	2,48	1,47	1,42
9	2,79	2,46	3,65	3,16	2,48	1,58	1,30
10	2,26	3,39	3,86	4,13	2,63	1,58	1,02
11				3,31	2,23	1,39	
12						2,38	

Teste de Kruskal-Wallis

H = 57,779 com 6 graus de liberdade p<0,001

## Teste Dunn

Grupos	Diferença	SE	Q	p<0,05
3X7	59,70-6,20=53,50	9,62	5,563	sim
3X6	59,70-18,29=41,41	9,21	4,497	sim
3X5	59,70-28,64=31,06	9,40	3,306	sim
3X1	59,70-43,70=16,00	9,62	1,664	não
3X2	59,70-50,90=8,80			eliminado
3X4	59,70-57,77=1,93			eliminado
4X7	57,77-6,20=51,57	9,40	5,489	sim
4X6	57,77-18,29=39,48	8,98	4,398	sim
4X5	57,77-28,64=29,14	9,17	3,178	sim
4X1	57,77-43,70=14,07			eliminado
4X2	57,77-50,90=6,87			eliminado
2X7	50,90-6,20=44,70	9,62	4,648	sim
2X6	50,90-18,29=32,61	9,21	3,542	sim
2X5	50,90-28,64=22,26	9,40	2,370	não
2X1	50,90-43,70=7,20			eliminado
1X7	43,70-6,20=37,50	9,62	3,899	sim
1X6	43,70-18,29=25,41	9,21	2,760	não
1X5	43,70-28,64=15,06			eliminado
5X7	28,64-6,20=22,44	9,40	2,388	não
5X6	28,64-18,29=10,34			eliminado
6X7	18,29-6,20=12,09			eliminado

Números médios das AgNORs da classe 1,1 - 1,5  $\mu\text{m}$

Nº do animal	Grupo 1 16 dias i.u.	Grupo 2 19 dias i.u.	Grupo 3 21 dias i.u.	Grupo 4 1,5 dia a.n.	Grupo 5 8 dias a.n.	Grupo 6 21 dias a.n.	Grupo 7 60 dias a.n.
1	0,41	0,53	0,59	0,65	0,47	0,29	0,39
2	0,41	0,39	0,66	0,41	0,46	0,20	0,78
3	0,56	0,22	0,47	0,28	0,47	0,19	0,57
4	0,34	0,15	0,30	0,32	0,45	0,16	0,98
5	0,55	0,26	0,24	0,57	0,30	0,36	0,36
6	0,55	0,08	0,43	0,47	0,49	0,39	0,46
7	0,53	0,08	0,51	0,59	0,43	0,30	0,48
8	0,41	0,54	0,37	0,45	0,30	0,36	0,81
9	0,55	0,46	0,52	0,68	0,28	0,34	0,31
10	0,51	0,34	0,47	0,21	0,30	0,29	0,76
11				0,26	0,31	0,28	
12						0,40	

Teste de Kruskal-Wallis

H = 22,665 com 6 graus de liberdade  $p < 0,001$

## Teste Dunn

Grupos	Diferença	SE	Q	p<0,05
7X6	53,50-19,25=34,25	9,21	3,720	sim
7X2	53,50-24,65=28,85	9,62	3,000	não
7X5	53,50-33,59=19,91			eliminado
7X4	53,50-41,14=12,36			eliminado
7X2	53,50-44,40=9,10			eliminado
7X1	53,50-49,65=3,85			eliminado
1X6	49,65-19,25=30,40	9,21	3,302	sim
1X2	49,65-24,65=25,00			eliminado
1X5	49,65-33,59=16,06			eliminado
1X4	49,65-41,14=8,51			eliminado
1X3	49,65-44,40=5,25			eliminado
3X6	44,40-19,25=25,15	9,21	2,732	não
3X2	44,40-24,65=19,75			eliminado
3X5	44,40-33,59=10,81			eliminado
3X4	44,40-41,14=3,26			eliminado
4X6	41,14-19,25=21,89			eliminado
4X2	41,14-24,65=16,49			eliminado
4X5	41,14-33,59=7,55			eliminado
5X6	33,59-19,25=14,34			eliminado
5X2	33,59-24,65=8,94			eliminado
2X6	24,65-19,25=5,40			eliminado

Números médios das AgNORs da classe 1,6 - 2,0  $\mu$ m

Nº do animal	Grupo 1 16 dias i.u.	Grupo 2 19 dias i.u.	Grupo 3 21 dias i.u.	Grupo 4 1,5 dia a.n.	Grupo 5 8 dias a.n.	Grupo 6 21 dias a.n.	Grupo 7 60 dias a.n.
1	0,12	0,19	0,19	0,10	0,08	0,06	0,57
2	0,09	0,04	0,15	0,07	0,01	0,04	0,58
3	0,23	0,13	0,16	0,08	0,12	0,04	0,52
4	0,18	0,06	0,09	0,10	0,17	0,02	0,51
5	0,22	0,06	0,06	0,14	0,10	0,05	0,43
6	0,17	0,06	0,07	0,21	0,09	0,15	0,44
7	0,17	0,11	0,13	0,17	0,07	0,06	0,47
8	0,19	0,18	0,19	0,10	0,01	0,08	0,48
9	0,12	0,19	0,11	0,16	0,07	0,16	0,53
10	0,35	0,14	0,19	0,06	0,09	0,15	0,47
11				0,08	0,04	0,18	
12						0,14	

Teste de Kruskal-Wallis H=37,361 com 6 graus de liberdade  $p < 0,001$

## Teste Dunn

Grupos	Diferença	SE	Q	p<0,05
7X5	69,50-21,14=48,36	9,39	5,150	sim
7X6	69,50-24,42=45,08	9,20	4,899	sim
7X4	69,50-32,14=37,36	9,39	3,979	sim
7X2	69,50-32,15=37,35	9,61	3,886	sim
7X3	69,50-38,60=30,90	9,61	3,215	sim
7X1	69,50-49,35=20,15	9,61	2,096	não
1X5	49,35-21,14=28,21	9,39	3,004	não
1X6	49,35-24,42=24,93			eliminado
1X4	49,35-32,14=17,21			eliminado
1X2	49,35-32,15=17,20			eliminado
1X3	49,35-38,60=10,75			eliminado
3X5	38,60-21,14=17,46			eliminado
3X6	38,60-24,42=14,18			eliminado
3X4	38,60-32,14=6,46			eliminado
3X2	38,60-32,15=6,45			eliminado
2X5	32,15-21,14=11,01			eliminado
2X6	32,15-24,42=7,73			eliminado
2X4	32,15-32,14=0,01			eliminado
4X5	32,14-21,14=11,00			eliminado
4X6	32,14-24,42=7,72			eliminado
6X5	24,32-21,14=3,28			eliminado

Números médios das AgNORs da classe 2,1 - 2,5  $\mu\text{m}$

Nº do animal	Grupo 1 16 dias i.u.	Grupo 2 19 dias i.u.	Grupo 3 21 dias i.u.	Grupo 4 1.5 dia a.n.	Grupo 5 8 dias a.n.	Grupo 6 21 dias a.n.	Grupo 7 60 dias a.n.
1	0,03	0,03	0,01	0,03	0,00	0,01	0,01
2	0,06	0,07	0,02	0,01	0,00	0,01	0,03
3	0,07	0,03	0,03	0,00	0,05	0,00	0,02
4	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02	0,00	0,06
5	0,07	0,02	0,01	0,02	0,03	0,01	0,06
6	0,04	0,02	0,03	0,03	0,01	0,02	0,02
7	0,05	0,02	0,05	0,02	0,01	0,01	0,03
8	0,06	0,02	0,01	0,05	0,03	0,01	0,02
9	0,06	0,09	0,01	0,03	0,01	0,01	0,03
10	0,10	0,04	0,04	0,01	0,01	0,01	0,16
11				0,01	0,00	0,04	
12						0,01	

Teste de Kruskal-Wallis

H = 28,729 com 6 graus de liberdade p<0,001

**Teste Dunn**

<b>Grupos</b>	<b>Diferença</b>	<b>SE</b>	<b>Q</b>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>1X6</b>	60,45-19,58=40,87	9,16	4,461	sim
<b>1X5</b>	60,45-25,77=34,68	9,35	3,710	sim
<b>1X4</b>	60,45-30,41=30,04	9,35	3,212	sim
<b>1X3</b>	60,45-36,95=23,50	9,57	2,456	não
<b>1X2</b>	60,45-47,20=13,25			eliminado
<b>1X7</b>	60,45-47,60=12,85			eliminado
<b>7X6</b>	47,60-19,58=28,02	9,16	3,059	sim
<b>7X5</b>	47,60-25,77=21,83	9,35	2,335	não
<b>7X4</b>	47,60-30,41=17,19			eliminado
<b>7X3</b>	47,60-36,95=10,65			eliminado
<b>7X2</b>	47,60-47,20=0,40			eliminado
<b>2X6</b>	47,20-19,58=27,62	9,16	3,015	não
<b>2X5</b>	47,20-25,77=21,43			eliminado
<b>2X4</b>	47,20-30,41=16,79			eliminado
<b>2X3</b>	47,20-36,95=10,25			eliminado
<b>3X6</b>	36,95-19,58=17,37			eliminado
<b>3X5</b>	36,95-25,77=11,18			eliminado
<b>3X4</b>	36,95-30,41=6,54			eliminado
<b>4X6</b>	30,41-19,58=10,83			eliminado
<b>4X5</b>	30,41-25,77=4,64			eliminado
<b>5X6</b>	25,77-19,58=6,19			eliminado

Números médios das AgNORs da classe 2,6 - 3,0  $\mu\text{m}$

Nº do animal	Grupo 1 16 dias i.u.	Grupo 2 19 dias i.u.	Grupo 3 21 dias i.u.	Grupo 4 1,5 dia a.n.	Grupo 5 8 dias a.n.	Grupo 6 21 dias a.n.	Grupo 7 60 dias a.n.
1	0,01	0,03	0,02	0,00	0,01	0,01	0,08
2	0,03	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01	0,12
3	0,05	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00	0,15
4	0,02	0,03	0,01	0,00	0,01	0,00	0,08
5	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,11
6	0,03	0,05	0,03	0,01	0,00	0,02	0,13
7	0,03	0,02	0,01	0,02	0,00	0,00	0,07
8	0,02	0,04	0,00	0,00	0,00	0,01	0,05
9	0,04	0,06	0,00	0,01	0,01	0,01	0,13
10	0,09	0,06	0,01	0,01	0,01	0,01	0,13
11				0,01	0,00	0,01	
12						0,00	

Teste de Kruskal-Wallis

H = 48.957 com 6 graus de liberdade p<0,001

## Teste Dunn

Grupos	Diferença	SE	Q	p<0,05
7X5	68,80-19,91=48,89	9,28	5,268	sim
7X6	68,80-22,79=46,01	9,10	5,058	sim
7X4	68,80-23,05=45,75	9,28	4,930	sim
7X3	68,80-32,20=36,60	9,50	3,853	sim
7X2	68,80-48,75=20,05	9,50	2,111	não
7X1	68,80-53,15=15,65			eliminado
1X5	53,15-19,91=33,24	9,28	3,581	sim
1X6	53,15-22,79=30,36	9,10	3,338	sim
1X4	53,15-23,05=30,10	9,28	3,244	sim
1X3	53,15-32,20=20,95	9,50	2,205	não
1X2	53,15-48,75=4,40			eliminado
2X5	48,75-19,91=28,84	9,28	3,107	sim
2X6	48,75-22,79=25,96	9,10	2,854	não
2X4	48,75-23,05=25,70			eliminado
2X3	48,75-32,20=16,55			eliminado
3X5	32,20-19,91=12,29	9,28	1,324	não
3X6	32,20-22,79=9,41			eliminado
3X4	32,20-23,05=9,15			eliminado
4X5	23,05-19,91=3,14			eliminado
4X6	23,05-22,79=0,25			eliminado
6X5	22,79-19,91=2,88			eliminado

Números médios das AgNORs da classe 3,1 - 3,5  $\mu\text{m}$

Nº do animal	Grupo 1 16 dias i.u.	Grupo 2 19 dias i.u.	Grupo 3 21 dias i.u.	Grupo 4 1.5 dias a.n.	Grupo 5 8 dias a.n.	Grupo 6 21 dias a.n.	Grupo 7 60 dias a.n.
1	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02
2	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02
3	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,04
4	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11				0,00	0,00	0,00	
12						0,00	

Teste de Kruskal-Wallis

H = 10,640 com 6 graus de liberdade p<0,001

## Teste Dunn

Grupos	Diferença	SE	Q	p<0,05
1X6	54,75-28,00=26,75	9,53	2,805	não
1X4	54,75-30,95=23,80			eliminado
1X3	54,75-31,25=23,50			eliminado
1X5	54,75-36,86=17,89			eliminado
1X7	54,75-41,05=13,70			eliminado
1X2	54,75-42,25=12,50			eliminado
2X6	42,25-28,00=14,25			eliminado
2X4	42,25-30,95=11,30			eliminado
2X3	42,25-31,25=11,00			eliminado
2X5	42,25-36,86=5,39			eliminado
2X7	42,25-41,05=1,20			eliminado
7X6	41,05-28,00=13,05			eliminado
7X4	41,05-30,95=10,10			eliminado
7X3	41,05-31,25=9,80			eliminado
7X5	41,05-36,86=4,19			eliminado
5X6	36,86-28,00=8,86			eliminado
5X4	36,86-30,95=5,91			eliminado
5X3	36,86-31,25=5,61			eliminado
3X6	31,25-28,00=3,25			eliminado
3X4	31,25-30,95=0,30			eliminado
4X6	30,95-28,00=2,95			eliminado

Números médios das AgNORs da classe > 3,5  $\mu\text{m}$

Nº do animal	Grupo 1 16 dias i.u.	Grupo 2 19 dias i.u.	Grupo 3 21 dias i.u.	Grupo 4 1,5 dia a.n.	Grupo 5 8 dias a.n.	Grupo 6 21 dias a.n.	Grupo 7 60 dias a.n.
1	0,02	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
2	0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	0,02
3	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
4	0,02	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,01
5	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
6	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
7	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
8	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
9	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06
10	0,04	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11				0,00	0,00	0,00	
12						0,00	

Teste de Kruskal-Wallis

H = 31,586 com 6 graus de liberdade p<0,001

## Teste Dunn

Grupos	Diferença	SE	Q	p<0,05
1X6	63,90-22,21=41,69	9,24	4,510	sim
1X4	63,90-24,82=39,08	9,43	4,143	sim
1X5	63,90-29,64=34,26	9,43	3,633	sim
1X3	63,90-34,15=29,75	9,65	3,081	sim
1X2	63,90-40,20=23,70	9,65	2,455	não
1X7	63,90-52,70=11,20			eliminado
7X6	52,70-22,21=30,49	9,24	3,299	sim
7X4	52,70-24,82=27,88	9,43	2,956	não
7X5	52,70-29,64=23,06			eliminado
7X3	52,70-34,15=18,55			eliminado
7X2	52,70-40,20=12,50			eliminado
2X6	40,20-22,21=17,99	9,24	1,946	não
2X4	40,20-24,82=15,38			eliminado
2X5	40,20-29,64=10,56			eliminado
2X3	40,20-34,15=6,05			eliminado
3X6	34,15-22,21=11,94			eliminado
3X4	34,15-24,82=9,33			eliminado
3X5	34,15-29,64=4,51			eliminado
5X6	29,64-22,21=7,43			eliminado
5X4	29,64-24,82=4,82			eliminado
4X6	24,82-22,21=2,61			eliminado