



Claudio Kemp
Geraldo Rodrigues de Lima
Vania Alberti
Filomena Marina Carvalho

UM NOVO MARCADOR DE ATIVIDADE PROLIFERATIVA (PCNA/CICLINA)

Rev bras Mastol 1996; 6:33-38

*Trabalho realizado
na Escola Paulista de Medicina
da Universidade Federal
de São Paulo.*

UNITERMOS

Câncer de mama;
Fatores prognósticos;
PCNA.

RESUMO

Os autores relatam a importância dos fatores prognósticos no tratamento do câncer de mama. Observam que os dados clínicos e os parâmetros anátomo-patológicos são insuficientes para estimar o prognóstico, particularmente quando os linfonodos axilares apresentam-se livres de comprometimento neoplásico. Evidenciam que nos recentes anos as pesquisas buscam espelhar a agressividade tumoral através das informações da fração de crescimento tumoral e das células em proliferação. Fazem uma revisão dos marcadores de atividade proliferativa e apresentam um novo polipeptídeo, identificável em material parafinado, facilmente adaptável à rotina laboratorial e que apresenta resultados altamente significativos quando correlacionados com os fatores prognósticos.

INTRODUÇÃO

Estudos realizados nos últimos anos sobre a biologia molecular e cinética celular permitiu compreender melhor a história natural dos cânceres e, em especial, o da mama.

O conhecimento da história natural de uma enfermidade é indispensável para selecionar características determinantes da doença que sejam eficazes na previsão do seu comportamento biológico.

Os primeiros aspectos relevantes de uma doença são suas manifestações clínicas. Esses dados são úteis para estimá-la e classificá-la desde as fases iniciais até as tardias e estadiá-la clinicamente.

No entanto, sabe-se hoje que as manifestações clínicas do câncer de mama, na realidade, só representam a fase tardia de longa e silenciosa proliferação celular, instalada muitos anos antes do diagnóstico clínico ini-

cial e responsável também pela disseminação metastática assintomática.

A contribuição dos parâmetros anátomo-patológicos trouxeram dados preciosos para esclarecer estes fatos e permanecem, ainda hoje, como referências básicas para avaliar o prognóstico desse câncer, tais como: tipo e grau histológico, grau nuclear, invasão vascular, necrose, "status" linfonodal, etc.

Para estimar o prognóstico, o comprometimento dos linfonodos axilares é ainda o parâmetro anátomo-patológico mais valioso. Quando presente é considerado bom sinalizador das manifestações sistêmicas e com base neste dado indica-se, com ressalvas, tratamento complementar quimioterápico. Quando ausente, a doença é considerada de bom prognóstico e a necessidade da complementação sistêmica é controversa. No entanto, sabe-se que, dessas pacientes, cerca de 29% experimentam a recidiva tumoral

e suas lastimáveis consequências, incluindo 32% de óbito nos primeiros 10 anos após o tratamento inicial. Esse é um fato de considerável importância⁵.

A diversidade do comportamento biológico das neoplasias malignas tem sido o estímulo de muitos pesquisadores. As observações do crescimento tumoral das metástases pulmonares de pacientes incuráveis através de radiografias sucessivas, as medidas do tumor obtidas por repetidas mamografias em diferentes intervalos de sua evolução permitiram, através de estudo semilogarítmico desses dados, estimar o padrão de crescimento tumoral. Sob a luz desses conhecimentos, deduziu-se que o tempo de duplicação de um tumor varia de 23 a 209 dias. A partir daí, chegou-se à conclusão de que desde o início de um tumor, ou seja, da primeira célula até chegar a 1 cm cúbico (1 bilhão de células), pode demorar de 2 a 17 anos. Possibilitou, também, induzir uma relação entre tempo de duplicação e prognóstico. Assim, tempo de duplicação curto, portanto rápido crescimento, corresponderia a tumores com metástases mais precoces, e aqueles com tempo de duplicação longo, a mais tardias²⁸.

O crescimento de um tumor está condicionado a fenômenos passivos de necrose, descamação, imunodestruição, células em repouso (fase G₀) e em diferenciação, e fenômenos ativos de divisão celular.

No câncer de mama estima-se que o número de células em divisão ativa, ou seja, a fração de crescimento, representa cerca de 40% do total²⁸. Explorar informações da fração de crescimento tumoral e das células em proliferação e, assim, provavelmente, espelhar a agressividade de um tumor no intuito de estabelecer novos indicadores prognósticos têm norteado as pesquisas nos recentes anos.

Howard e Pelc (1953) foram os primeiros a introduzir, através dos experimentos com métodos autoradiográficos, o conceito do ciclo celular e suas divisões em várias fases. A partir daí, a aquisição de novos conhecimentos permitiram compreender melhor o ciclo celular¹².

Imediatamente após a mitose, a célula entra em aparente fase de repouso chamada G₁. Essa fase é seguida pela fase S ou de síntese de DNA, durante a qual a célula duplica seu conteúdo de DNA, que é um pré-requisito para nova divisão celular. A fase seguinte é definida como G₂, fase pré-mitótica.

É importante enfatizar que apesar de normalmente a síntese de DNA não ocorrer na fase G₁ e G₂, as células são ativas durante esse período, sintetizando proteínas e RNA^{12,28}.

Partindo dessas informações, vários métodos foram idealizados para medir a atividade proliferativa dos carcinomas mamários.

O mais simples, direto e realizado nos próprios cortes de parafina é a contagem mitótica. Geralmente é expressa em número de figuras de mitose contadas em cada 10 campos microscópicos de grande aumento, tomadas sucessivamente na área tumoral mais representativa, ampliada 400 vezes. No entanto, além de sofrer grande variação intratumoral, é susceptível a artefatos técnicos da fixação e do processamento do material. Ainda mais, é muito subjetiva, como provam os diferentes critérios utilizados na sua avaliação¹⁶.

O índice da timidina marcada revela uma porcentagem de células tumorais que se encontram na fase S do ciclo celular, ou seja, de síntese do DNA. A metodologia consiste em incubar tecido tumoral fresco em meio contendo timidina tritiada, a qual é incorporada ao DNA. Posteriormente são feitas auto-radiografias e contam-se as células marcadas obtendo-se um índice. Estes valores demonstraram ter correlação significativa com a recorrência precoce do câncer mamário²⁹.

Outra técnica para avaliar a fração tumoral em fase S é a citometria de fluxo. Consiste numa suspensão das células coradas por substâncias fluorescentes específicas para DNA; através de um dispositivo luminoso, a luz dissipada pelas células é captada resultando num histograma. Sua análise revela o número de células e a quantidade de DNA por célula. Fornece duas informações de real importância. Primeiro, nos dá a conhecer a velocidade de crescimento tumoral através da porcentagem de células em fase S e, segundo, indica a agressividade do tumor pela expressão de DNA celular (aneuploidia)²².

Resultados semelhantes se obtêm com a citometria estática computadorizada. O esfregaço é corado pelo método de Feulgen, específico para núcleo. Um feixe luminoso atravessa a lâmina em áreas previamente selecionadas e as diferentes intensidades de absorção da luz são captadas, o que resulta em um histograma. A análise estática fornece dados dos aspectos nucleares, tamanho, forma, conteúdo de DNA e o modo de sua distribuição¹¹.

Tem a vantagem de ser aplicada em material fixado e incluído em parafina. Infelizmente, essas técnicas necessitam de material sofisticado, profissionais especializados e são onerosas.

Os métodos imunohistoquímicos, mercê dos anticorpos monoclonais, vieram facilitar as pesquisas neste campo.

O estudo imunohistoquímico, através do anticorpo monoclonal Ki67, reage com um antígeno nuclear que se expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G₀. Tem-se revelado excelente marcador da atividade proliferativa em carcinoma de mama, mas o inconveniente

é sua aplicação restrita em estudos prospectivos por exigir material congelado¹⁷.

Atualmente já se tem disponível um anticorpo para material em parafina, Mabs (Mi 1-3); no entanto, necessita mais ampla utilização para que se possa observar as exigências de adaptação da metodologia nas condições habituais da rotina laboratorial.

Assim, permanecia a expectativa de se encontrar um marcador de atividade proliferativa, identificável em material parafinado, por método simples e facilmente adaptável à rotina.

Em 1978, identificou-se um anticorpo no soro de alguns pacientes com lupus eritematoso sistêmico que reagia com um antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA- proliferating cells nuclear antigen). Referiu-se que esse anticorpo podia servir como marcador biológico para estudar as células em proliferação¹⁸.

Para estudar o principal processo que controlava a proliferação celular, postulou-se que para isso era essencial conhecer o mecanismo que regulava a síntese de polipeptídios e a progressão das células através do ciclo celular. A partir de homogeneizado de células coletadas de culturas celulares, obteve-se um mapa eletroforético de gel contendo polipeptídios marcados com [35 S] methionine. Identificou-se, desse modo, o padrão de polipeptídios sintetizados nas diversas fases do ciclo celular. Os polipeptídios individualizados foram retirados do gel e o montante de cada um foi calculado com base na quantidade de radioatividade presente em cada sítio por meio de um cintilômetro. Demonstrou-se que o polipeptídio localizado no ponto isoelétrico denominado "IEF 49" de peso molecular 36 KD aumentava especificamente na fase S e servia como marcador para esta fase².

Tornou-se importante verificar se a proporção desse polipeptídio era sensível às mudanças sob diversas condições fisiológicas em paralelo com as porcentagens das células em proliferação.

Para resolver esta questão, estudou-se a síntese desse polipeptídio em situações em que a porcentagem de células em proliferação mudava drasticamente. Primeiro em células gigantes produzidas por irradiação com doses letais de RX (1000 cGY). Observou-se que 8% delas permaneceram na fase S e exibiam 1/6 da quantidade do polipeptídio IEF 49 quando comparadas com as do grupo controle, das quais 31% mantinham-se na fase S. Culturas de fibroblastos de pele humana quando tornavam-se senescentes, a proliferação celular cessava e observava-se paralelamente diminuição na porcentagem de síntese do IEF 49. Células de fígado de rata adulta marcadas com [35 S]

methionine mostravam síntese reduzida ou ausência de IEF 49 em células que não ciclavam. Por fim, células transformadas (imortais ou imortais e tumorigênicas) sintetizavam esse polipeptídio continuamente e em quantidades variáveis. A partir dessas observações, postulou-se ser este polipeptídio um marcador das células em proliferação³.

Paralelamente, confirmou-se que em cerca de 3% das pacientes com lupus eritematoso sistêmico um auto-anticorpo reagia com um antígeno nuclear nas células em proliferação (PCNA). Chamaram a atenção para sua expressão na fase que precedia a síntese ativa de DNA²⁵.

Examinaram-se imunoprecipitados contendo PCNA por eletroforese, evidenciou-se que o ponto isoelétrico IEF 49, denominado ciclina, e o antígeno PCNA eram idênticos².

Trabalhando com culturas de células amnióticas humanas demonstrou-se por técnica de imunofluorescência indireta a sequência de aparecimento e a variação na distribuição nuclear da proteína ciclina (PCNA). Os resultados mostraram ainda estreita relação entre as porcentagens de células exibindo síntese de DNA e os esfregaços com reação positiva para PCNA. Sugeriu-se que a distribuição desse antígeno dependia do "status" de duplicação do DNA e que o PCNA era o componente central do caminho que conduzia à divisão celular⁷.

Utilizando fatores de crescimento purificados derivados de plaquetas e fibroblastos, demonstrou-se que ambos estimulavam a síntese de DNA e ciclina, evidenciando a estreita relação entre eles⁴.

Descreveu-se uma proteína auxiliar específica da DNA polimerase δ necessária para sua atividade catalítica. Afirmou-se ainda que a DNA polimerase δ mantinha essa habilidade de síntese de DNA na presença dessa proteína auxiliar²⁶.

Em 1987 demonstrou-se por uma combinação de coluna cromatográfica convencional que a ciclina e essa proteína auxiliar eram idênticas⁴.

Ogata e col. (1987) foram os primeiros a obter um anticorpo monoclonal para PCNA, por imunização ativa em cepas de camundongo purificados em rim de coelho, denominado 19A2. Para se assegurarem da especificidade da reação, removeram pequenas quantidades de auto-anticorpos para outros antígenos nucleares com extratos de rim de coelho que contêm vestígios de PCNA, e numerosos outros auto-antígenos nucleares. Afirmaram também que estes anticorpos reagiam não só com coelhos mas também com células humanas²¹.

Trabalhando com culturas de fibroblastos humanos, observou-se que após irradiação com ultravioleta

iniciava-se a atividade catalítica da DNA polimerase δ induzindo a síntese de DNA e, com isso, promovia a reparação celular²⁰.

Aprofundando neste estudo, verificou-se rápido aumento de PCNA durante a síntese de DNA, após o dano celular. Inferiu-se que o PCNA existe no núcleo em três formas: livre no nucleoplasma, como um complexo pré-síntese ou como um complexo de duplicação do DNA. Concluiu-se que a ciclina também exerce ação na reparação do DNA²⁷.

Descreveu-se a aplicação desses anticorpos monoclonais específicos anti-PCNA nos esfregaços, para estudar a proliferação das células humanas. Usando marcadores para PCNA e DNA demonstrou-se a estreita associação entre os resultados, confirmados por imunofluorescência indireta e por citometria de fluxo¹⁵.

Utilizando o anticorpo monoclonal (19A2) anti-PCNA, fez-se uma análise retrospectiva em tecidos tumorais fixados em álcool e incluídos em parafina, usando o método streptavidina-biotina-peroxidase. Seus resultados foram semelhantes aos obtidos por citometria de fluxo do mesmo tumor. Concluiu-se ser, esse método simples, reproduzível e valioso para análise rotineira da cinética celular até em tecidos fixados e incluídos em parafina.

A complexidade dos procedimentos de purificação do antígeno PCNA encorajou os pesquisadores a explorar caminhos alternativos para obtê-lo sem comprometer sua pureza. Relatou-se a expressão de um PCNA de gene recombinante em *Escherichia coli* cuja proteína resultante usou-se para imunizar cobaias. Foram isolados e caracterizados onze novos anticorpos monoclonais para PCNA. Descreveram-se as propriedades de alguns desses anticorpos, ou seja, de reconhecer epitopos antigênicos desde células humanas até leveduras e, principalmente, de reagir com PCNA em cortes histológicos fixados em formalina. Encontraram-se maiores eficiência e afinidade de reação no anticorpo codificado PC-10 e sugeriu-se seu uso para determinar a fração proliferativa em tumores³⁰.

Finalmente, utilizou-se esse novo anticorpo (PC-10). Foram investigados os efeitos da fixação e dos reagentes habitualmente empregados. Considerou-se o tempo de fixação como importante fator na imuno-reatividade do PCNA. Demonstrou-se que esse anticorpo reconhece PCNA em tecidos convencionalmente fixados e processados em parafina; também sua estreita relação com outros marcadores de atividade proliferativa no mesmo tecido como: Ki67, citometria de fluxo, incorporação com bromodeoxyuridine¹³.

Consequência do maior interesse despertado por esse novo anticorpo, fez-se uma análise comparativa entre 19A2 e PC-10 utilizando material de arquivo fixado em formalina.

Observou-se boa correlação entre eles nos casos que reagiram para ambos os anticorpos. Evidenciaram-se reações mais confiáveis e, em maior número dos casos, para o anticorpo PC-10. Concluiu-se que esse anticorpo poderia reconhecer diferentes epitopos do PCNA, e quais seriam mais resistentes às alterações pelos processos de fixação¹⁰.

Desde então os trabalhos foram se acumulando na literatura, sempre enfatizando a correlação da imuno-reatividade para PCNA e os fatores de prognósticos, discutindo as controvérsias do método e questionando as possíveis causas dos diferentes resultados.

Assim, inúmeros pesquisadores destacaram sua correlação com o índice mitótico, grau de diferenciação histológico e nuclear, sobrevida livre de câncer e sobrevida global. Também referiram estreita relação com outros marcadores de atividade proliferativa do tumor como: Ki67, incorporação da timidina tritiada, incorporação da bromodeoxyuridine, citometria de fluxo, citometria estática computadorizada. Da mesma forma, com a proteína C-erb-B2, expressão da p53, receptor para EGF e ausência de receptores hormonais. Enfatizaram ser o método de resultados confiáveis, reproduzíveis, de técnica facilmente adaptável na rotina laboratorial e, principalmente, não oneroso^{1,8,12,19,23,24}.

Entre nós, analisou-se o valor das características clínicas, anátomo-patológicas e imunohistoquímicas (PCNA, pS2, p29) na previsão da recidiva em 51 pacientes com tumores phyllodes de mama⁶.

Avaliou-se, também, a expressão imunohistoquímica para PCNA em 28 sarcomas de partes moles. Os resultados mostraram haver relação significativa com o grau histológico, número de mitoses e celularidade⁹.

Em pacientes com câncer de mama (estágio II) estudou-se o valor prognóstico do PCNA e notou-se haver significativa associações com valores crescentes de ciclina e a piora na classificação dos graus nuclear e histológico, em particular nas pacientes que tinham axila negativa¹⁴.

A utilização dos métodos imunohistoquímicos como fator de prognóstico tem sido bastante estudada, e seus resultados mostram-se bastante confiáveis.

Além do mais, mantidas as tendências atuais na crescente incidência do câncer mamário, no desenvolvimento técnico dos aparelhos, na melhoria dos filmes mamográficos e das técnicas de mamografia, veremos aumentar o número de doentes e do diagnóstico em tumores pequenos e inclusive não palpáveis.

Isso faz com que essas técnicas, tal como o PCNA, que prevêm o prognóstico em pequenas porções de tecido ou nos esfregaços citológicos e que são facilmente adaptáveis à rotina laboratorial, desempenhem importante papel no presente e com mais certeza em futuro próximo.

KEY-WORDS

Breast cancer;
Prognostic factors;
PCNA.

ABSTRACT

A NEW MARKER OF PROLIFERATION ACTIVITY (PCNA/CYCLIN)

The authors of the present study report the importance of the prognostic factors in the treatment of breast cancer. They have observed that the clinical data and the anatomopathological parameters have been insufficient to estimate the prognosis, particularly when the axillary lymphonodes are free of neoplastic compromising. They also emphasize that within recent years, researches have attempted to reflect the tumoral aggressiveness through data involving the proportion of tumoral growth and the proliferating cells. In addition to that, this study also provides a review of the markers of tumoral proliferative activity and introduces a new polypeptide, which is identifiable in paraffined material, is easily adaptable to laboratorial routines and demonstrates highly significant results when correlated with the prognostic factors.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AALTOMAA S, LIPPONEN P, PAPINAHU S, SYRJANEN K. Proliferating-cell nuclear antigen (PC10) immunolabelling and other proliferation indices as prognostic factors in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 119: 288-294.
2. BRAVO R, CELIS E J. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 1980; 84: 795-802.
3. BRAVO R, FEY J S, BELLATIN J, LARSEN M P, AREVALO J, CELIS E J. Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. *Exp Cell Res* 1981; 136: 311-319.
4. BRAVO R, FRANK R, BLUNDELL A P P, MACDONALD-BRAVO H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ . *Nature* 1987; 326: 515-517.
5. CARTER C L, ALLEN C, HENSON D E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187.
6. CARVALHO F M. Análise de variáveis histológicas e imunohistoquímicas na previsão da recidiva de tumores fyllodes da mama. São Paulo, 1992 (Tese de doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
7. CELIS E J, CELIS A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 3262- 3266.
8. CUMMINGS C M, FURNIVAL M C, PARSONS G P, TOWNSEND E. PCNA immunostaining in breast cancer. *Aust N Z J Surg* 1993; 63: 630-606.
9. FARO JUNIOR M P. Expressão imunohistoquímica do PCNA (proliferating cell nuclear antigen) em sarcomas de partes moles. São Paulo, 1993 (Tese de doutorado - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).
10. GELB B A, KAMEL W O, LEBRUN P D, WARNKE A R. Estimation of tumor growth fractions in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using two anti PCNA/cyclin monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1992; 141: 1453-1458.
11. GHALI V S, LIAU S, TEPLITZ C, PRUDENTE R. A comparative study of DNA ploidy in 115 fresh-frozen breast carcinomas by image analysis versus flow cytometry. *Cancer* 1992; 70: 2668-2672.
12. HALL A P, LEVISON A D. Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990; 43: 184-192.
13. HALL A P, LEVISON A D, WOODS L A, YU W C C, KELLOCK B D, WATKINS A J et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162: 285-294.
14. KEMP C. Valor prognóstico do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA/Ciclina) nas pacientes com câncer de mama no estágio II (T_2 N0, I M0). São Paulo, 1995 (Tese de doutorado - Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo).
15. KURKI P, OGATA K, TAN M E. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin) as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1988; 109: 49-59.
16. LE DOUSSAL V, TUBIANA-HULIN M, FRIEDMAN S, HACENE K, SPYRATOS F, BRUNET M. Prognostic value of histologic grade nuclear

- components of Scarff-Bloow-Richardson (S.B.R.). Cancer 1989; 64: 1914-1921.
17. MARCHETTI E, QUERZOLI P, FERRETI S, FABRIS G, NEUCI I. Assessment of proliferative rate of breast cancer by Ki67 monoclonal antibody. Mod Pathol 1990; 3: 31-35.
 18. MIYACHI K, FRITZLER M J, TAN E M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J immunol 1978; 121: 2228-2233.
 19. NARITA T, FÜNAHASHI H, SATOH Y, TAKAGI H. Proliferations cell nuclear antigen immunostaining in breast cancer and its relation to prognosis. Jpn J Clin Oncol 1993; 23(1): 20-25.
 20. NISHIDA C, REINHARD P, LINN S. DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase δ . J biol chem 1988; 263: 501-510.
 21. OGATA K, KURKI P, CELIS E J, NAKAMURA M R, TAN M E. Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. Exp Cell Res 1987; 168: 475-486.
 22. QUINN M C, WRIGHT A N. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: Evaluation of methods and applications as prognostic variables. J Pathol 1990; 160: 93-102.
 23. SHRESTHA P, YAMADA K, WADA T, MAEDA S, WATATANIM, YASUTOMI M et al. Proliferating cell nuclear antigen in breast lesions: Correlation of c-erb B-2 oncoprotein and EGF receptor and its clinicopathological significance in breast cancer, Virchows Archiv A Pathol Anat 1992; 421: 193-202.
 24. TAHAN R S, NEUBERG S D, DIEFFENBACH A, YACOB L. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. Cancer 1993; 71: 3552-3559.
 25. TAKASAKI Y, DENG S J, TAN M E. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. J Exp Med 1981; 154: 1899-1909.
 26. TAN K C, CASTILHO C, SO G.A, DOWNEY M K. An auxiliary protein for DNA polymerase δ from fetal calf thymus. J biol chem 1986; 261: 12310-12316.
 27. TOSCHI L & BRAVO R. Changes in cyclin/ proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. J Cell Biol 1988; 107: 1623-1628.
 28. TUBIANA M. Review article. The kinetics of tumour cell proliferation and radiotherapy. Br J Radiol 1971; 44: 325- 347.
 29. TUBIANA M, PEJOVIC U H, CHAVANDRA N, COUTESSO G, MALAISE E P. The long term prognostic significance of the thymidine labeling index in breast cancer. Int J Cancer 1984; 33: 441-445.
 30. WASEEM H N & LANE P D. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). J Cell Sci 1990; 96: 121-129.

Endereço para correspondência:

Claudio Kemp
 Rua Dr. Bacelar, 333
 V. Clementino
 04026-001 - São Paulo - SP