

Revista de la Asociación Dental Mexicana

Volumen **62**
Volume

Número **3**
Number

Mayo-Junio **2005**
May-June

Artículo:

Regiones de organizadores nucleolares
en células de descamación de la mucosa
bucal en fumadores crónicos

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Asociación Dental Mexicana, AC

Otras secciones de
este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com

Regiones de organizadores nucleolares en células de descamación de la mucosa bucal en fumadores crónicos

Eunice Ortiz Razo,* Rubén Alejandro Domínguez Jameson,** Yolanda Torres López,* Elba Rosa Leyva Huerta***

* Programa Jóvenes hacia la Investigación.
** Cirujano Dentista residente del Laboratorio de Patología.
*** Doctora en Odontología. Laboratorio de Patología.

Facultad de Odontología. UNAM.

Resumen

La citología exfoliativa es un método diagnóstico de ejecución rápida, simple y no invasiva utilizada en patología bucal; el objetivo fue cuantificar el número de regiones de organizadores nucleolares (NORs) teñidos con plata coloidal (AgNORs) como indicador de proliferación celular en células de descamación de la mucosa de pacientes fumadores crónicos. Los NORs se localizan dentro del núcleo en número de 1 ó 2, nosotros encontramos que variaron en tamaño y número, el promedio fue de 3 a 7.5 por célula en la mucosa yugal y de 2.1 a 4.3 en la lengua, el promedio de AgNORs por núcleo en las células de la mucosa yugal fue estadísticamente mayor en comparación al promedio de ellos en las células de descamación de la lengua. El análisis de relaciones de Pearson mostró un margen de error de .20% de acuerdo a los promedios del número de AgNORs por célula.

Palabras clave: AgNORs, regiones de organizadores nucleolares, tabaco, citología exfoliativa.

Abstract

Exfoliative cytology is a fast execution, simple and not invasive diagnose method used in oral Pathology. The objective was to quantify the number of Nucleolar Organizer Regions (NORs) died with colloidal silver (AgNORs) as cellular proliferations indicator in chronical smokers patients' mucous descamative cells. The NORs are located inside the nucleus in number of 1 or 2. We found that they changed in size and number. The average was from 3 to 7.5 per cell in yugal mucous and from 2.1 to 4.3 in tongue. AgNORs' average per nucleous in yugal mucous was statistically longer comparising to the average in descamative cells in tongue. The Pearson's relations analysis showed an error margin of .20% according to the averages of AgNORs' number per cell.

Key words: AgNORs, nucleolar organizer regions, tobacco, exfoliative cytology.

Recibido para publicación: 28-Agosto-2003

Introducción

Cada ser humano es poseedor de un sofisticado programa que controla el crecimiento y la diferenciación celular. Cuando se producen alteraciones en dicho programa, inicia el cáncer, que no es sino la proliferación incontrolada de células de un determinado órgano o sistema.¹ El cáncer es el resultado final de un complejo proceso en el que participan uno o, generalmente, varios carcinógenos.²

Los carcinógenos son sustancias u otros factores capaces de operar por sí mismos en todas las fases de la carcinogénesis, por ejemplo, el tabaco en el cáncer de laringe o de pulmón. Los llamados co-carcinógenos son factores incapaces por sí solos de generar cáncer, pero que sí pueden hacerlo en conjunción con otros factores, por ejemplo, el radón o el asbesto en conjunción con el tabaco en la génesis del cáncer de pulmón.^{3,4}

En la combustión del tabaco se producen sustancias de naturaleza similar, identificándose el 3,4 benzopireno

a partir del condensado (alquitrán) del humo del tabaco, sustancia genuinamente carcinogénica.⁵⁻⁷

Tabaco y cáncer

Actualmente, al tabaco se atribuye el 30% de las muertes por enfermedad coronaria y el 30% por cáncer. Se ha demostrado que el aumento de la prevalencia de cáncer de pulmón, coincide con el aumento de consumo de tabaco. Se considera que es responsable del 77% de los tumores de pulmón en el hombre y del 43% en la mujer.²

El uso de hojas de betel masticado en Sri Lanka y parte de India es causante de una prevalencia extremadamente elevada de cáncer de cavidad bucal. El agente carcinógeno se piensa que está presente ya sea en la nuez de areca (betel), o en la piedra caliza o tabaco que se mastica por lo común junto con las hojas de betel.⁸⁻¹⁰

Es preocupante el riesgo de cáncer entre los fumadores pasivos, que son no fumadores expuestos crónicamente a los productos de combustión del tabaco por convivir en locales cerrados con fumadores. El humo que se desprende del cigarrillo tiene una mayor concentración de carcinógenos que el humo inhalado, por lo que es potencialmente más perjudicial. El nivel de carboxihemoglobina y nicotina en la laringe de los fumadores pasivos equivale al que se encuentra en fumadores de 4-6 cigarrillos/día.^{2,7}

El consumo de tabaco y alcohol son los factores predisponentes conocidos más importantes asociados al cáncer de cavidad bucal. El riesgo de padecer este tipo de cáncer en un fumador es 6 veces mayor al del no fumador; el abuso combinado de alcohol y tabaco ejerce un efecto multiplicador de riesgo. Este riesgo es aproximadamente 15 veces superior en el consumidor de alcohol y tabaco que el de una persona que no tiene ninguno de estos hábitos.¹¹

El cáncer más común de la cavidad bucal es el carcinoma epidermoide o de células escamosas, el cual tiene un alto grado de morbilidad y mortalidad. Los sitios de mayor incidencia del carcinoma epidermoide son: lengua, piso de boca y labio, todos ellos asociados a tabaco, sin embargo existen un espectro de alteraciones en boca asociadas a este hábito; desde alteraciones aparentemente inocuas como la melanosis del fumador, la estomatitis nicotínica y la queratosis del fumador, hasta lesiones premalignas como la leucoplasia y eritroplasia terminando con el carcinoma epidermoide.^{18,20,21} El 90% de los pacientes con carcinoma epidermoide revelan ser fumadores.¹²⁻¹⁴

La Sociedad Americana de Cáncer estima que alrededor de 30,000 nuevos casos fueron diagnosticados en 1995.¹⁵

El Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México reportó que de 62,675 notificados 900 (1.4%) correspondieron a cáncer de cavidad bucal, de los cuales

el 62.3% correspondió a varones y el 37.7% a mujeres. Durante el periodo de 1985 a 1992 se registraron 633 casos con diagnóstico de cáncer de cavidad bucal y constituyeron el 5% de todos los tumores malignos recibidos en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan).¹⁶

Crecimiento y proliferación neoplásica

Muchos han sido los intentos y avances para dilucidar el desarrollo y la proliferación de una neoplasia, entre ellos se encuentran el grado de diferenciación y el potencial de crecimiento de ellas; este último se puede estimar por medio de la determinación de regiones de organizadores nucleolares (NORs).^{17,18}

En la formación del nucleolo participan pequeños fragmentos de RNA ribosomal que se reconocen como regiones de organizadores nucleolares o NORs. Éstos se localizan en el centro fibrilar denso. En las células somáticas humanas, las regiones de organizadores nucleolares se localizan en el brazo corto de los cromosomas acrocéntricos 13-15, 21, 22. Los NORs son cistrones de DNA identificados principalmente a través de hibridación *in situ*, sin embargo por razones de simplicidad pueden identificarse con tinciones de plata coloidal debido a la argofilia constante de las proteínas asociadas.¹⁹⁻²²

Las NORs pueden considerarse como parte de la maquinaria nucleolar comprometida con la fabricación de ribosomas, son transcritos a RNA por la enzima RNA polimerasa I (RNAPI); están relacionados con un aumento de la actividad metabólica o proliferativa de la célula que está sufriendo transformación maligna. La cantidad de proteínas asociadas a las NORs, teñidas con plata coloidal (AgNORs) reflejan el grado de diferenciación de las neoplasias.^{19,21}

La reacción de AgNOR fue descrita en 1975 por Goodpaster y Blomm utilizando una tinción de nitrato de plata con hidróxido de amonio a 60°; lograron demostrar la presencia de AgNOR en cromosomas de *Macaca mulatta* y *Carrollia perspicillia*.^{10,22}

Ploton demostró en 1986 que esta técnica podría ser llevada a cabo para observar las células en interfase estabilizándola con ácido fórmico. La cantidad de proteínas asociadas a los NORs, teñidas con plata coloidal, reflejan indirectamente el grado de diferenciación de las células y permitiendo establecer el índice de proliferación y diferenciación de la célula transformada.^{17,19}

El papel de los NORs se basa en su capacidad de reflejar la capacidad proliferativa de una célula. Los NORs están típicamente agregados dentro de uno o dos nucleolos durante la interfase en la célula normal; los números de AgNOR visualizados dependen de: a) El número de NORs presentes en los cromosomas, b) el nivel de actividad transcripcional de RNA y c) el estadio del ciclo celular.²⁰

En el cáncer uno de los aspectos más importantes es su prevención. Para ello es fundamental identificar los factores que participan en el origen del cáncer y su desarrollo posterior, por lo que es importante identificar y analizar con procedimientos no invasivos a las poblaciones de alto riesgo como son los fumadores crónicos. El análisis de AgNORs sugiere que el fumar cigarrillo influye en la actividad proliferativa en células de la mucosa bucal sana, siendo la cantidad de AgNORs estadísticamente más alta en células de fumadores que en las de no fumadores ($p < 0.1$).²³

La citología exfoliativa no se usa frecuentemente para evaluar el efecto del tabaco de los fumadores crónicos en la mucosa bucal normal; Cardilho²¹ demostró una correlación entre el número de AgNORs en células neoplásicas benignas y malignas en citologías de neoplasias de glándulas salivales tratadas mediante aspiración con aguja fina. Este método puede realizarse fácilmente en la cavidad bucal debido a su gran accesibilidad, procedimiento fácil el cual se caracteriza por ser de ejecución rápida, simple e indolora.

Basados en lo anterior el objetivo de este estudio fue cuantificar el número de regiones de organizadores nucleolares como indicador de proliferación celular en células de descamación de la mucosa bucal de pacientes fumadores crónicos.

Material y métodos

Se exploró la cavidad bucal de los pacientes fumadores observando lesiones asociadas a tabaquismo, se tomaron las muestras frotando la mucosa yugal así como la cara dorsal de la lengua con abatelenguas, el material obtenido se extendió sobre el portaobjetos.

Las laminillas se tiñeron con la técnica de Papanicolaou. Método estándar para el examen citológico útil para teñir células exfoliadas. Esta técnica utiliza soluciones como hematoxilina de Harris, la cual permite una mayor precisión en cuanto a la tinción del núcleo; la solución EA 50, que contiene eosina, verde ligero y café utilizada para teñir el citoplasma de células superficiales.

Y se administró nitrato de plata para regiones de organizadores nucleolares de acuerdo con la técnica de Pleton (1986), utilizando: Gelatina al 2% en ácido fórmico acuoso al 1%, posteriormente se mezcló una parte de la solución con dos partes de nitrato de plata al 50% durante 45 minutos en cuarto oscuro a una temperatura entre 20° y 25°C.

Finalmente se procedió a realizar el conteo de AgNORs mediante la selección de cinco campos para cada laminilla. Las laminillas fueron observadas con microscopio de campo claro utilizando un objetivo de 100x y aceite de inmersión. Posteriormente, de cada grupo de 5 campos

se obtuvo el conteo total del número de células así como el conteo del número de AgNORs y el promedio de éstos por célula en cada caso.

Se obtuvo promedio, desviación estándar, porcentajes y se realizó el análisis de relaciones de Pearson.

Resultados

En la revisión microscópica de las citologías teñidas con Papanicolaou, se observaron abundantes células de descamación en la mayor parte de los casos de lengua, excepto en uno, en el cual fueron escasas, en la mucosa yugal las células de descamación fueron escasas pero fue posible observar que algunas de ellas presentaron pleomorfismo nuclear, también se observaron colonias de microorganismos e infiltrado inflamatorio. En las *figuras 1 a, b, c y d* se observan las características de las citologías obtenidas. En los *cuadros I, II y III* se encuentran los resultados de la observación de las citologías teñidas con Papanicolaou.

Los AgNORs fueron localizados como puntos negros dentro del núcleo, los cuales variaron en tamaño y número, hubo algunos casos donde únicamente encontramos 1 ó 2 y otros en donde encontramos hasta 11. En este estudio el número promedio de AgNORs fue de 3 hasta 7.5 por célula en la mucosa yugal y de 2.1 hasta 4.3 en la lengua, en las *figuras 2 a, b, c, y d* se observan diferentes imágenes de la disposición y número de las regiones de organizadores nucleolares en las células de descamación de lengua y mucosa yugal; los *cuadros IV y V* nos muestran el número de células observadas, el número de AgNORs contabilizados y el promedio por célula de mucosa yugal y de lengua. En la *figura 3* se muestra la distribución de los AgNORs en cada caso estudiado tanto de mucosa yugal como de lengua.

En relación a los resultados el promedio de AgNORs por núcleo en las células de la mucosa yugal fue estadísticamente mayor en comparación al promedio de ellos por núcleo en las células de descamación de la lengua.

El análisis de relaciones de Pearson mostró un margen de error de .20% de acuerdo a las desviaciones con respecto a los promedios del número de AgNORs por célula para los casos de mucosa yugal y de lengua.

Discusión

La citología exfoliativa ha sido durante mucho tiempo una herramienta de diagnóstico para predecir los cambios preneoplásicos y neoplásicos de las células de descamación de las mucosas, nunca va a ser un sustituto de la biopsia pero sí puede utilizarse previo a la toma de ella en lesiones que son sospechosas de malignidad, sin embargo no se usa frecuentemente para evaluar el efec-

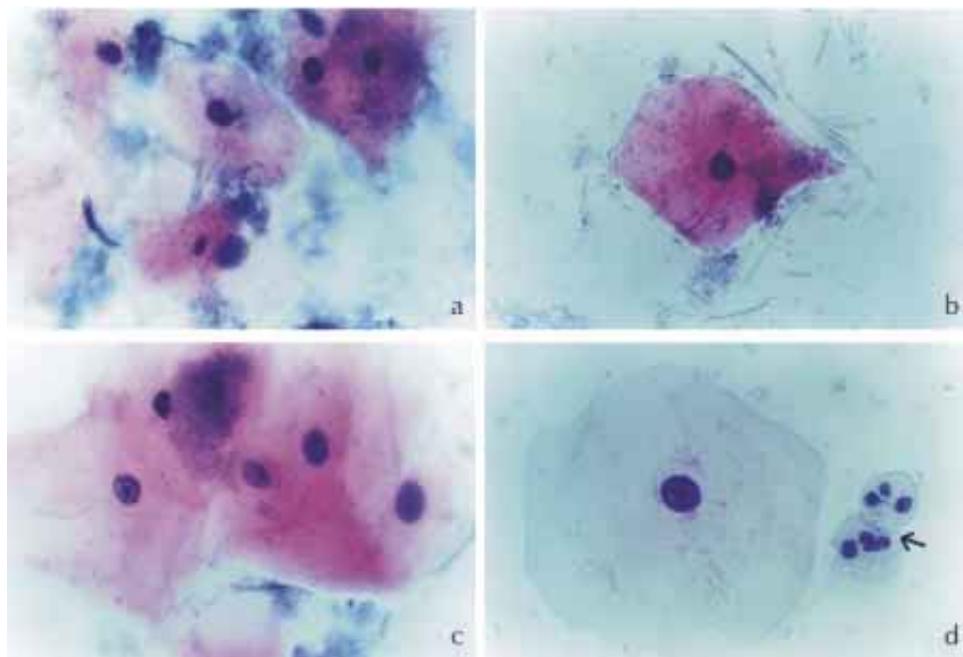


Figura 1. a) Células de descamación de la lengua. b) Microorganismos observados en mucosa yugal. c) Células de mucosa yugal que presentan pleomorfismo nuclear. d) Células inflamatorias (flecha) observadas en mucosa yugal.

Cuadro I. Células de descamación en el total de los casos.

Células de descamación	Lengua (No. casos)	Mucosa yugal (No. casos)
Abundantes y normales	19	3
Escasas y normales	1	19
Pleomorfismo nuclear	7	5
Fuente: directa		

Cuadro II. Infiltrado inflamatorio en los casos estudiados.

Tipo celular	Lengua (No. casos)	Mucosa yugal (No. casos)
Neutrófilos	7	10
Linfocitos	5	7
Macrófagos	0	1
Mixto	13	8
Escasos	5	5
No hay	1	3
Fuente: directa		

to del tabaco de los fumadores crónicos en la mucosa bucal normal, aun cuando es un procedimiento no invasivo y de fácil manejo; Cardilho²¹ realizó un estudio en citologías de células neoplásicas benignas y malignas de

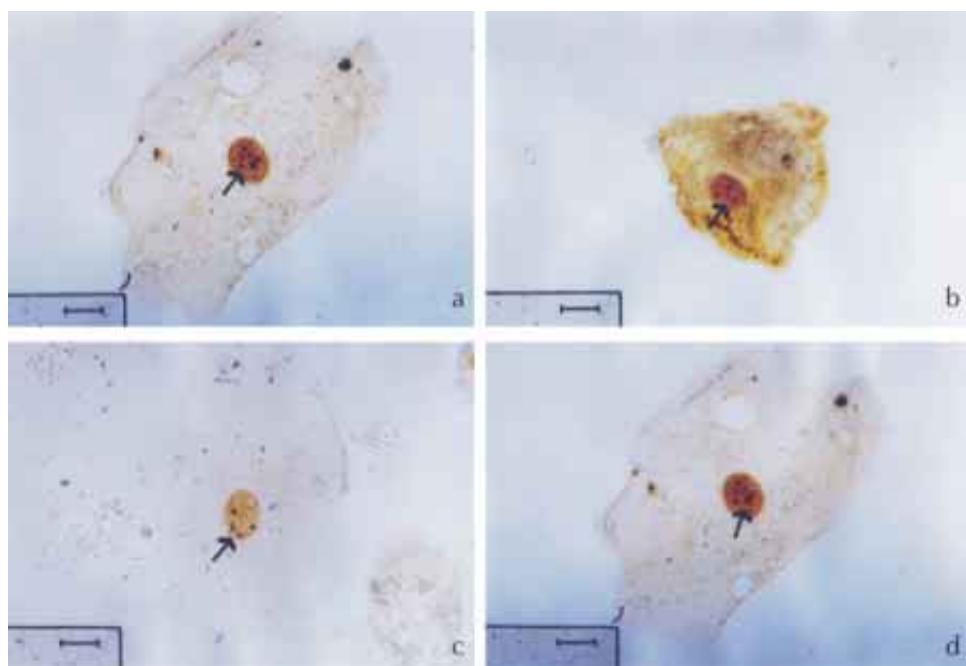
Cuadro III. Colonias de microorganismos en las muestras obtenidas.

Tipo de microorganismo	Lengua (No. casos)	Mucosa yugal (No. casos)
Cocos en racimo	27	4
Cocos aislados	4	14
Cocos abundantes	25	2
Cocos escasos	2	25
Bacilos	4	0

Fuente: directa

glándulas salivales mediante aspiración con aguja fina. Tratando de correlacionar el número de AgNORs con el tipo de célula, en este trabajo nosotros intentamos describir los posibles cambios citológicos en células de descamación de fumadores crónicos utilizando dos técnicas; la de Papanicolaou tradicionalmente utilizada y la de AgNORs. Esta última técnica se basa en: que la cantidad de proteínas asociadas a los NORs, teñidas con plata coloidal, reflejan indirectamente el grado de diferenciación de las células y permiten establecer el índice de proliferación y diferenciación de la célula transformada.^{17,19}

Esta técnica de AgNORs ha sido utilizada para distinguir entre lesiones malignas y benignas, así mismo se considera una herramienta importante para el diagnóstico de algunas patologías tumorales, ya que como lo reportan Do Carmo y cols,²² el número de AgNORs está



Figuras 2. a), b), c) y d) Se muestran los organizadores nucleolares en el núcleo de la célula; éstos presentan diferente disposición, forma, tamaño y número. Las flechas indican la posición de ellos.

Cuadro IV. Promedio de AgNORs en mucosa yugal.

Caso	No. células	No. AgNORs	Promedio SD
1	6	18	3.0 ± 1.66
2	6	25	4.1 ± 0.56
3	7	47	6.7 ± 2.04
4	6	23	3.8 ± 0.86
5	7	35	5.0 ± 0.34
6	10	44	4.4 ± 0.60
7	7	27	3.8 ± 0.86
8	10	45	4.5 ± 0.16
9	12	54	7.5 ± 2.84
10	18	70	3.8 ± 0.86

Fuente: directa

Cuadro V. Promedio de AgNORs en cara dorsal de la lengua.

Caso	No. células	No. AgNORs	Promedio SD
1	12	47	3.9 ± 0.37
2	7	25	3.5 ± 0.03
3	6	26	4.3 ± 0.77
4	19	73	3.8 ± 0.27
5	15	44	2.9 ± 0.63
6	7	15	2.1 ± 0.43
7	7	26	3.7 ± 0.17
8	8	27	3.3 ± 0.23
9	10	49	4.9 ± 1.37
10	14	41	2.9 ± 0.63

Fuente: directa

incrementado en las células con alta actividad proliferativa.

Jaber y cols¹⁴ hacen hincapié en el tabaco y el alcohol como factores de riesgo de la displasia epitelial y Sampaio y cols²³ encontraron diferencia significativa en el número de AgNORs por núcleo de un grupo de pacientes fumadores en comparación al número de ellos del grupo de no fumadores. Nosotros reportamos en este trabajo que el número de AgNORs variaba entre la mucosa yugal y la lingual, encontrando un promedio total de 4.66 AgNORs por célula para mucosa yugal y de 3.53 para lengua, cabe mencionar que fue contrario a lo que esperábamos ya que considerábamos que el promedio iba a ser mayor en la lengua donde es el sitio de desarrollo de

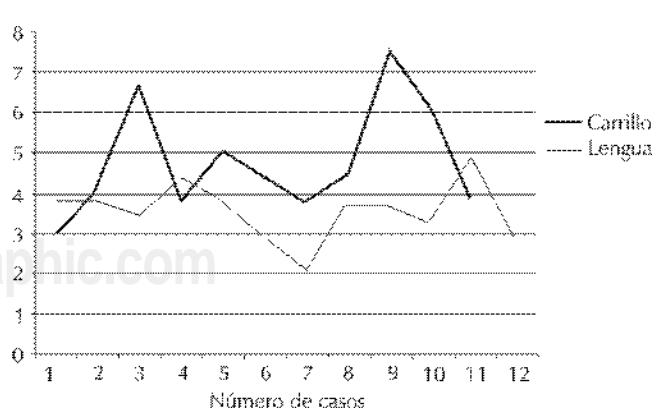


Figura 3. Promedio de AgNORs por célula en cada caso.

la mayor parte de los tumores de cavidad bucal asociados a este hábito.

No observamos un patrón celular sugestivo de algún proceso maligno, salvo los casos en los cuales se observó pleomorfismo nuclear. Lo importante obtenido por nosotros es que existe relación del tabaco con el aumento de actividad celular a través del incremento de las regiones de organizadores nucleolares contabilizados. En relación a los resultados el promedio de AgNORs por núcleo en las células de la mucosa yugal fue estadísticamente mayor en comparación al promedio de ellos por núcleo en las células de descamación de la lengua. El margen de error que obtuvimos al realizar el análisis estadístico puede ser debido al método de conteo en el cual no utilizamos software o a los precipitados de plata no contemplados que en algunos casos pudo dar pie a confusión a la hora del conteo.

Conclusiones

El incremento en el número de AgNORs puede ser el reflejo de la proliferación de una célula que se encuentra metabólicamente estimulada probablemente por el efecto del tabaco por lo que esta técnica puede ser considerada como marcador de actividad celular siendo un posible método auxiliar, cuantitativo y discriminativo para detectar alteraciones celulares incipientes contribuyendo así al diagnóstico temprano de tejidos involucrados.

Bibliografía

1. <http://www.opolanco.es/Apat/Boletin9/oncogene.html>
2. Pardo FJ. *Anatomía patológica*. Madrid (España), Mosby. 1996: 358-480.
3. "<http://www.tuotromedico.com/temas/cancer-y-medio-ambiente.htm>" <http://www.tuotromedico.com/temas/cancer-y-medio-ambiente.htm>
4. Rubin et al. *Fundamentos de Patología*. México, Panamericana. 1992: 97-102.
5. http://www.placonempresas.com/fumar/tabaco_y_cancer.htm
6. Brancroft JD et al. *Manual of Histological Techniques and their diagnostic application*. New York (Estados Unidos), Churchill Livingstone. 1994: 325-326.
7. http://www.encolombia.com/consideraciones_odonto.htm
8. William C, Kumao S. *Cancer and the Oral Cavity*. Estados Unidos, Quetessence Publishing. 1986: 17-21.
9. Andersson G, Vala EK, Curvall M. The influence of cigarette consumption and smoking machine yield of tar and nicotine on the nicotine uptake and oral mucosal lesions in smokers. *J of Oral Pathol Med* 1997; 26:117-23.
10. Barasch A, Douglas EM, Krutchkoff JD, Eisenberg E. Smoking, gender and age as risk factors for Site-Specific Intraoral Squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994; 73(3): 509-13.
11. "<http://www.fisterra.com/guiasz/cáncer oral.htm>" <http://www.fisterra.com/guiasz/cáncer oral.htm>
12. Ord R et al. *Oral cancer*. China, Quintessence books. 2000: 6.
13. Abdel-Salam et al. Which oral white lesions will become malignant? An image cytometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69(3).
14. Jaber MA, Porter SR, Gilthorpe MS, Bedi R, Scully. Risk factors for oral epithelial dysplasia- the role of smoking and alcohol. *Oral Oncol* 1999; 35: 151-156.
15. Vigneswaran N et al. Tobacco use and cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 80(2).
16. Frias MM, Zeichner GI, Suchil BL, Ochoa CFJ. Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto Nacional de Cancerología (1985-1992). *Revista del Instituto Nacional de Cancerología* 1997; 43(2): 80-85.
17. Avers CJ. *Biología celular*. 2^a Ed. Estados Unidos, Grupo Editorial Iberoamericana. 1991: 538- 541, 603-606.
18. Puztai et al. *Cell proliferation in cancer*. Gran Bretaña, Oxford University Press. 1996: 19.
19. Gambini CS. Counting the Nucleolar Organizer Region-Associated Protein is a Prognostic Clue of Malignant Melanoma. *Arch Dermatol* 1992: 487-490.
20. Leyva-Huerta E, Flores G, Barrera R, Aldape-Barrios. *Regiones de organizadores nucleolares y examen por PCR de RNAr 18S en 19 casos de carcinoma epidermoide de cavidad bucal*. D.F (México), División de estudios de Posgrado de Investigación, UNAM 1998: 17-25.
21. Cardilho MR. AgNORs technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses. *Acta Cytol* 1992; 21: 275-79.
22. Do Carmo MAV, Silva EC. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumours (AOTs). *J Oral Pathol & Med* 1998; 27: 153-156.
23. Sampaio H et al. AgNOR Count in Exfoliative Cytology of Normal Bucal Mucosa, Effect of Smoking. *Acta Cytol* 1999; 43(2): 117-120.

Reimpresos:

Dra. Odont. Elba Rosa Leyva Huerta.
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Círculo Institutos s/n, Ciudad Universitaria
México, D.F 04510
Correo electrónico: docelbaleyva@hotmail.com
Este documento puede ser visto en:
www.medigraphic.com/adm