

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen 51
Volume

Número 3
Number

Julio-Septiembre 2004
July-September

Artículo:

Marcador de regiones de organizadores nucleolares en lesiones epiteliales de cavidad bucal

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Federación Mexicana de Patología Clínica, 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](#)

Marcador de regiones de organizadores nucleolares en lesiones epiteliales de cavidad bucal

Palabras clave: NORs, liquen plano, carcinoma epidermoide, carcinoma basocelular.

Key words: NORs, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, lichen planus.

Recibido: 21/05/2004
Aceptado: 24/06/2004

Elba Rosa Leyva Huerta,* Arith Nallely Zárate Daza,* Guadalupe Marcela Ramírez Macías,* Elisa Vega Memije**

* Laboratorio de Patología Bucal, Facultad de Odontología. Universidad Nacional Autónoma de México.

** Departamento de Dermatología, Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Secretaría de Salud.

Correspondencia:
Dra. Elba Rosa Leyva Huerta
División de Estudios de Posgrado e Investigación,
Facultad de Odontología, UNAM.
Circuito Institutos s/n Ciudad Universitaria
04510 México, D.F.
Tel: (095) 6 22 55 60
Fax: (095) 5 50 34 97
E-mail: docelbaleyva@hotmail.com

145

Resumen

Objetivo: Evaluar la presencia de regiones de organizadores nucleolares (NORs) en verruga vulgar, queratosis friccional, displasia epitelial, liquen plano, carcinoma epidermoide y carcinoma basocelular. **Material y métodos:** Fueron analizados histopatológicamente 68 casos por medio de la técnica de hematoxilina y eosina, así como con la técnica descrita por Ploton, utilizando nitrato de plata (AgNOR). **Resultados:** El promedio de NORs fue: Verruga vulgar 9 ± 2.24 , queratosis friccional 5.5 ± 1.16 , displasia epitelial 8 ± 2.12 , liquen plano 6.8 ± 2.13 , carcinoma epidermoide 6.96 ± 0.53 y carcinoma basocelular 3.55 ± 0.25 . Existió relación entre el número de AgNORs y la displasia ($r_s = 0.9$) con un nivel de confiabilidad de $p = 0.05$. La relación entre el promedio de NORs en liquen plano y carcinoma epidermoide fue de $r_s = 0.99$ con un nivel de confiabilidad de $p = 0.1$. Entre el carcinoma basocelular y el epidermoide la correlación fue de $r_s = 1.35$ con un nivel de confiabilidad de $p = 0.05$. **Conclusiones:** El número de NORs y el grado de malignidad del carcinoma epidermoide y basocelular se correlacionan estadísticamente de manera positiva, es decir, cuando el número de NORs aumenta, el grado de malignidad de la lesión también se incrementa.

Summary

Objective: The aim of the study was to evaluate NORs' number in: common wart, frictional keratosis, epithelial dysplasia, lichen planus, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. **Methods:** 68 cases were histopathologically analyzed by hematoxylin and eosin technique and the AgNOR technique described by Ploton, using silver nitrate. **Results:** NORs average was: common wart 9 ± 2.24 , frictional keratosis 5.5 ± 1.16 , epithelial dysplasia 8 ± 2.12 , lichen planus 6.8 ± 2.13 , squamous cell carcinoma 6.96 ± 0.53 and basal cell carcinoma 3.55 ± 0.25 . There was a relation between AgNORs' number and dysplasia $r_s = 0.9$, with a reliable level of $p = 0.05$. The relation between the average of nucleolar organizers in lichen planus and in squamous cell carcinoma was $r_s = 0.99$ with a reliable level of $p = 0.1$. Between basal cell and squamous cell carcinomas, the relation was $r_s = 1.35$ with a reliable level of $p = 0.05$. **Conclusions:** The grade of basal cell and squamous cell carcinomas' malignity and the number of nucleolar organizers are positively related, meaning that as organizers' number increases, malignity grade does.

Introducción

El papel de las regiones de organizadores nucleolares (NORs) para estimar el comportamiento de los tumores se ha basado en su capacidad para reflejar la actividad proliferativa de una neoplasia dada. Los NORs están típicamente agregados dentro de uno o dos nucléolos durante la interfase en la célula normal; los números de NORs visualizados dependen del nivel de actividad transcripcional de ARN y del estadio del ciclo celular.¹

El mecanismo mediante el cual se controlan los índices de proliferación de los diferentes tipos de células es uno de los aspectos menos comprendidos de la biología celular.² Aunque la función exacta de las proteínas NORs es incierta, se ha demostrado su relación con la proliferación celular y se ha sugerido que, en un núcleo en interfase, el número de AgNORs (regiones de organizadores nucleolares teñidos con plata) puede reflejar el estadio de activación y el grado de transformación maligna de ciertos tejidos; además, los AgNORs reflejan el grado de proliferación y diferenciación celular.^{3,4} Se ha considerado que el conteo de AgNORs puede contribuir al diagnóstico histológico, estableciendo el grado de transformación maligna de una lesión, por lo que este método puede ser un auxiliar como marcador cuantitativo en alteraciones celulares incipientes antes de que los cambios puedan ser detectados histológicamente. Por ello, se le considera un parámetro de gran valor en la patología tumoral, ya que el incremento en el número de ellos está asociado con aumento en la agresividad de un tumor.^{1,5,6} Los criterios de Jakobsson han sido descritos como el mejor sistema de gradificación para evaluar la invasión, el potencial metastásico y para predecir la conducta biológica del carcinoma epidermoide de laringe y boca.⁷ En un estudio *post mortem* realizado por nosotros, obtuvimos que el carcinoma epidermoide de boca se comporta como una enfermedad agresiva, independientemente del grado de diferenciación de los tumores, al clasificarlos de

acuerdo a los criterios de Jakobsson; con base en ésta, un carcinoma epidermoide con alto contenido de AgNORs puede tener un carácter agresivo, donde a mayor número de AgNORs más pobre será el pronóstico, independientemente del grado de diferenciación del tumor.⁸

Estas regiones pueden identificarse mediante microscopia de luz con tinciones de plata coloidal debido a la argirofilia de las proteínas asociadas a NORs.^{1,4,6,8,9-12}

Con base en lo anterior, fue realizado el presente estudio cuyo objetivo fue determinar la presencia de NORs, utilizando nitrato de plata, y cuantificar el número de ellos en seis lesiones de la misma estirpe celular que presentan diferente patrón histológico y comportamiento clínico.

Material y métodos

Para llevar a cabo este estudio fueron seleccionados 68 casos del archivo del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México y del Departamento de Dermatología del Hospital "Manuel Gea González" de la Secretaría de Salud. Estos casos fueron: 10 verrugas vulgares, 11 queratosis friccionales, 11 displasias epiteliales, 14 líquenes planos, 11 carcinomas epidermoides y 11 carcinomas basocelulares. Se realizaron cuatro cortes histológicos a cuatro micras de espesor en tejidos embebidos en parafina; dos de las laminillas fueron teñidas con la técnica convencional de hematoxilina y eosina para el diagnóstico histopatológico. El diagnóstico de las lesiones benignas se realizó de forma morfológica descriptiva de acuerdo al patrón histológico; en el caso de las dos neoplasias malignas, se utilizó la gradificación histológica de Jakobsson descrita en 1973, que consiste en dividir los criterios en: Factores intrínsecos del tumor (grado de queratinización, pleomorfismo nuclear y número de mitosis) y fac-

tores relacionados al huésped y al tumor (patrón de invasión, estado de invasión tumoral e infiltrado linfoplasmocitario).

Para la demostración de NORs, se utilizó la técnica AgNOR descrita por Ploton en 1986. Fueron utilizados dos cortes histológicos de tejidos embebidos en parafina a cuatro micras; se desparafinaron en xilol e hidrataron las laminillas en agua destilada, colocándose los tejidos en vasos de Coplin, los cuales se hidrataron durante un minuto. Al mismo tiempo, se preparó la solución de trabajo, que constó de 2% de gelatina en un litro de ácido fórmico acuoso al 1%; después se mezcló una parte de la anterior solución con dos partes de nitrato de plata acuosa al 50%, la cual fue la solución de trabajo. Esta solución se preparó justo antes de teñir en cuarto oscuro a temperatura de 20 a 25° C. Se colocó la solución de trabajo en vasos de Coplin y se sumergieron las laminillas durante 45 minutos en reposo; después se lavaron con agua bidestilada, se deshidrataron y montaron.

La observación y cuantificación de las manchas nucleolares fue realizada por dos examinadores; no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre sus cuantificaciones. Se utilizó un objetivo de 100x

y aceite de inmersión, estableciendo la observación de 25 campos con un área de 230 micras cada uno, con un aumento de 4,000x (cctv con un monitor de 20"), obteniendo los siguientes datos por caso: número de células por campo, número de AgNORs y promedio de AgNORs.

De los resultados por lesión, se obtuvo el promedio total de AgNORs por caso y por lesión, así como la desviación estándar y el coeficiente de correlación de Spearman.

Resultados

Los NORs se observaron como puntos redondos o elongados teñidos de negro dentro del nucléolo de la célula, el resto de ella se tiñó de color amarillo parduzco. La tinción de plata coloidal mostró la presencia de puntos nucleolares que variaron en cuanto a tamaño y número. Algunos nucléolos presentaron pequeños y numerosos puntos nucleolares (se contaron de dos a 13 puntos nucleolares), siendo variables en cuanto a número y forma en las diferentes lesiones; los linfocitos de la lámina propia sirvieron como control interno, ya que con frecuencia presentaron uno o dos AgNORs por célula. La distribución del promedio de AgNORs de cada uno de los casos de las lesiones epiteliales estudiadas se muestra en la *figura 1*.

En verruga vulgar, los AgNORs se observaron finos y numerosos, si los comparamos con la queratosis friccional, en la que se observaron gruesos y escasos. En la displasia epitelial presentaron una distribución más regular (*figura 2 A, B, C, D, E, F*) El liquen plano y el carcinoma epidermoide presentaron puntos negros finos y abundantes, distribuidos de manera irregular, siendo más abundantes en el carcinoma epidermoide; sin embargo, en el carcinoma basocelular, su disposición fue más regular y fueron más gruesos (*figura 3 A, B, C, D, E, F*).

El promedio de AgNORs fue de 9 ± 2.24 en verruga vulgar; de 5.55 ± 1.16 en queratosis friccional; de 8 ± 2.12 en displasia epitelial, de 6.8 ± 2.13 en liquen plano, de 6.96 ± 0.53 en carcino-

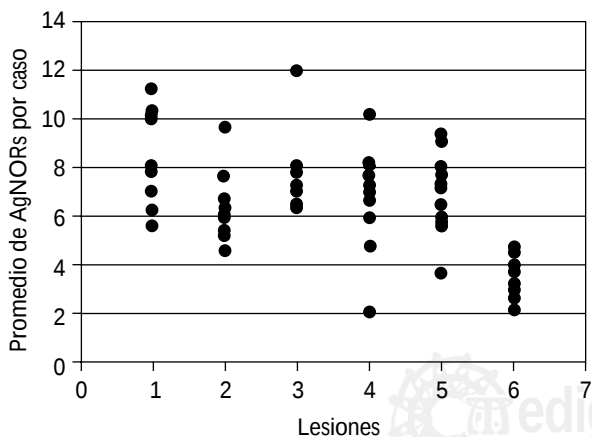


Figura 1. Distribución del promedio de la cuantificación de regiones de organizadores nucleolares teñidos con plata (AgNORs) por caso de las seis lesiones epiteliales: 1) verruga vulgar, 2) queratosis, 3) displasia, 4) liquen plano, 5) carcinoma epidermoide, 6) carcinoma basocelular.

ma epidermoide y de 3.55 ± 0.25 en carcinoma basocelular. En el caso de las neoplasias malignas, registramos cuatro carcinomas epidermoides de bajo grado con promedio de 7.55 AgNORs, cuatro de grado intermedio con 6.13 AgNORs y tres de alto grado de malignidad con 7.27 AgNOR. En carcinoma basocelular, obtuvimos seis de bajo grado con promedio de 3.42 AgNORs, cuatro de grado intermedio con 3.63 AgNORs y un caso de alto grado de malignidad con 4.49 AgNORs. El *cuadro 1* muestra el promedio de la cuantificación del número de AgNORs en los cuales se incluyen: número de células contadas, límites mínimo

y máximo de AgNORs, promedio y desviación estándar.

El número de AgNORs obtenido fue directamente proporcional con el grado de displasia $r_s = 0.9$ ($p = 0.05$), el liquen plano y el carcinoma epidermoide tuvieron semejanza numérica con respecto a la cuantificación de AgNORs, las diferencias estadísticamente fueron significativas ($r_s = 0.99$) con un nivel de confiabilidad de $p = 0.1$. En carcinoma basocelular y carcinoma epidermoide también se encontró diferencias estadísticamente significativas ($r_s = 1.35$ $p = 0.05$), en ambas lesiones fue directamente proporcional el número de

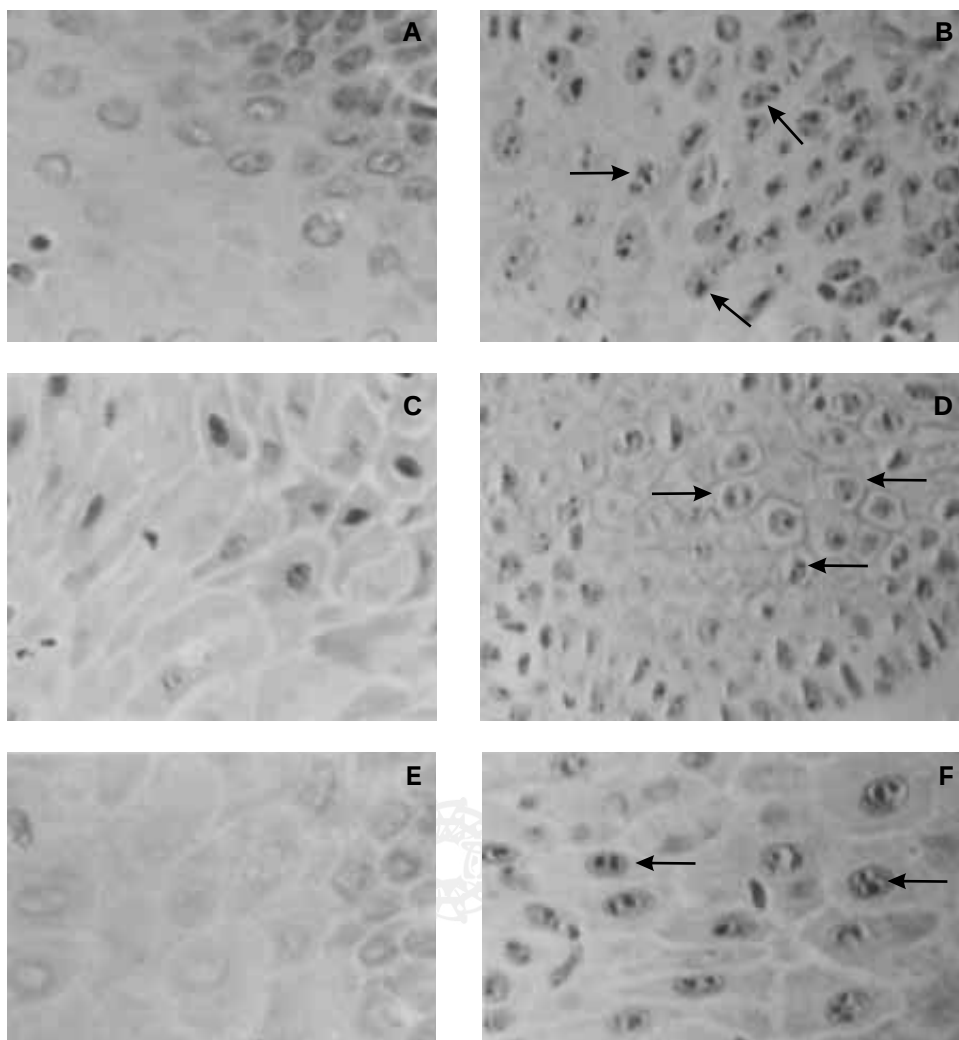


Figura 2. Fotomicrografías correspondientes a las siguientes lesiones: **A)** Verruga vulgar, **C)** displasia epitelial y **E)** queratosis friccional con tinción de hematoxilina y eosina. **B)** Verruga vulgar, **D)** queratosis friccional y **F)** displasia epitelial teñidas con plata coloidal, se aprecian los puntos nucleolares (100 X).

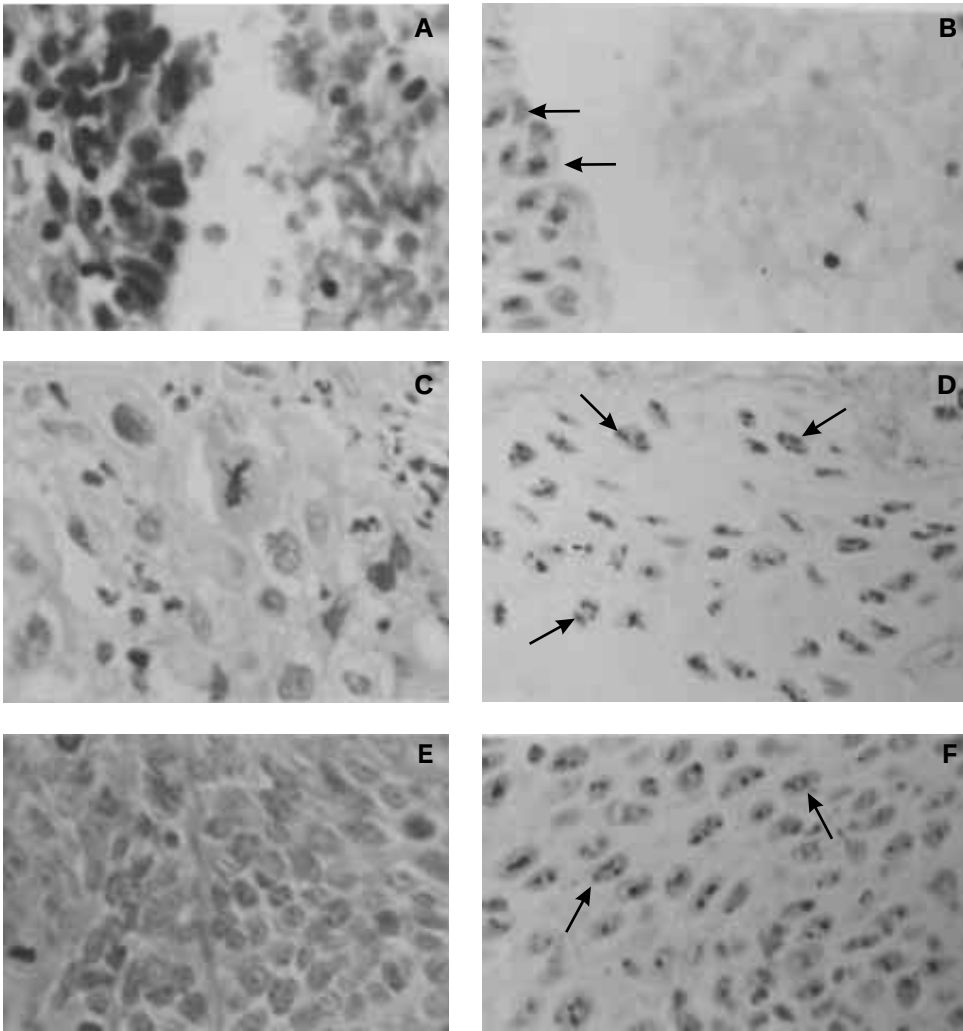


Figura 3. Fotomicrografía de liquen plano, carcinoma epidermoide y carcinoma basocelular. **A, C y E** corresponden a la tinción de hematoxilina y eosina; mientras que **B, D y F** corresponden a la tinción de plata coloidal, se aprecian los puntos nucleolares (100 X).

Cuadro I. Cuantificación de AgNORs en seis lesiones epiteliales.				
Diagnóstico histopatológico	Número de casos	Promedio de células contadas	AgNORs Rango	AgNORs Promedio + DE
Verruga vulgar	10	512.83	3.66 - 9.40	9.00 ± 2.24
Queratosis friccional	11	606.00	2.16 - 4.74	5.55 ± 1.16
Displasia epitelial	11	429.00	5.58 - 10.34	8.00 ± 2.12
Liquen plano	14	481.10	4.58 - 7.70	6.80 ± 2.13
Carcinoma epidermoide	11	357.27	6.32 - 12.03	6.96 ± 0.53
Carcinoma basocelular	11	693.82	2.05 - 10.19	3.55 ± 0.25
P = 0.05 Abreviaturas: AgNORs = Regiones de organizadores nucleolares teñidos con plata. DE = Desviación estándar.				

AgNORs encontrados con la gradificación histológica de las neoplasias.

Discusión

Un método empleado para cuantificar los NORs por célula es utilizar una tinción con nitrato de plata en tejidos embebidos en parafina y su posterior observación en microscopio de campo claro a un aumento de 100x. Este método es relativamente simple y se requiere sólo de un microscopio; pero presenta inconvenientes durante el método de conteo debido a la variación interobservadores. Estos inconvenientes son eliminados si la evaluación morfométrica se realiza con la ayuda de una computadora con imagen digitalizada, en la cual se hace un análisis sin que existan influencias de los observadores.¹⁰

El tamaño, número y distribución de AgNOR ha sido analizado en tumores benignos y malignos. Un decremento en el tamaño, un incremento en el número y una distribución irregular han sido reportados en lesiones malignas contrario a las benignas, siendo propuesto como un marcador de la replicación celular.⁸ Arora y colaboradores¹³ indican que la tinción de AgNOR es simple y que puede ser usada como método para la estimación de la proliferación celular de un tumor, haciendo diferenciación del tejido normal del crecimiento proliferativo no neoplásico, neoplásico benigno y neoplásico maligno de tejidos blandos. Xin Xie y su grupo⁵ mencionan que, cuando en la cuantificación de AgNORs existe una cantidad mayor a 1, puede ser una herramienta útil para distinguir entre epitelio normal, displasia y carcinoma epidermoide de cavidad bucal.

Chattopadhyay y asociados¹⁴ demostraron que existe un incremento en el promedio de conteo de AgNORs en leucoplasias y carcinoma epidermoide de cavidad bucal comparado con el epitelio normal, sugiriendo que entre más displásico es el epitelio la cantidad de AgNOR se incrementa y el tamaño de los puntos nucleolares decrece (epite-

lio normal 2.26 ± 0.32 , leucoplasia 2.69 ± 0.49 y carcinoma epidermoide 3.48 ± 0.42). Schwint y colaboradores¹⁰ registraron cifras de 6.56 en carcinoma, 4.81 en adyacente y 2.95 en el epitelio normal; Warnakulasuriya y asociados¹ cuantificaron el número de AgNORs, el cual fue 4.51 ± 2.57 en queratosis, 5.61 ± 4.63 en displasia epitelial y 8.37 ± 6.11 en carcinoma. Nosotros obtuvimos 5.5 ± 1.16 en queratosis 8 ± 2.12 en displasia epitelial y 6.96 ± 0.53 en carcinoma epidermoide. Consideramos que esta diferencia de resultados puede deberse al número de casos observados y/o a que la técnica de tinción es diferente en cada uno de los trabajos revisados sobre los NORs. Contrario a lo que esperábamos, obtuvimos un promedio de 9 ± 2.24 AgNORs en la verruga vulgar; este resultado es contrario al observado por Cabrini y su grupo,⁶ los cuales reportan que el papiloma tiene un promedio de 4.53 ± 2.37 ; esto se debe a la etiología viral de la lesión, ya que, al estar alterado el ADN nuclear por la información viral agregada, también existe mayor producción de ARNr con un número elevado de NORs. Cabe mencionar que nosotros no buscamos asociación entre el número de NORs y la presencia del virus papiloma humano (VPH); sin embargo, Chartteje y colaboradores¹⁵ buscaron asociación entre los AgNORs y el VPH en carcinomas de cavidad bucal con o sin infección; el número de AgNORs en las muestras positivas al VPH fue de 7.15 ± 2.13 y en las negativas al VPH fue de 6.16 ± 1.89 ; diferencias significativas fueron observadas entre los conteos de carcinomas pobremente, moderadamente y bien diferenciados (10.5 ± 0.54 , 7.31 ± 1.07 y 5.12 ± 0.85 , en forma respectiva).

En el presente estudio, nosotros intentamos categorizar los carcinomas basocelulares bajo los criterios establecidos por Jakobsson utilizados para la gradificación de carcinoma epidermoide de boca y laringe, pero modificados de acuerdo a las características propias de esta neoplasia. Cabe mencionar que esta modificación se hizo de manera arbitraria (ya que no encontramos en la lite-

ratura ningún reporte en el que se establezca la aplicación de estos criterios para aquellos carcinomas), se realizó con el fin de poder comparar los bajo las mismas circunstancias. De Rosa y asociados¹⁶ dividieron al carcinoma basocelular en dos grupos: agresivo y no agresivo. Al observar los AgNORs presentes en esta lesión, contaron en el primero 9.48 y en el segundo 6.56. Nosotros, debido a que no contábamos con los antecedentes clínicos de los pacientes, no pudimos hacer uso de esta clasificación, por lo cual intentamos categorizar a los tumores de acuerdo al comportamiento biológico local, dividiéndolos en bajo, intermedio y alto grado de malignidad. Cabe mencionar que el promedio total de células contadas en el carcinoma basocelular fue mayor que en el epidermoide, pero éstas tuvieron una diferenciación celular mayor que las del epidermoide, ya que en pocos casos perdieron su uniformidad; el rango en el promedio de AgNORs fue de 3.42 a 4.49, no alcanzando las cifras que aquellos autores señalan. Al comparar nuestros resultados entre el carcinoma basocelular y el carcinoma epidermoide, encontramos que el promedio de AgNORs fue 3.55 ± 0.25 para el basocelular y 6.96 ± 0.53 para el epidermoide, lo que, al aplicar el coeficiente de correlación de Spearman, mostró diferencia significativa con $r_s = 1.35$ por lo cual el resultado fue que ambas variables, la gradificación de Jakobsson y la cuantificación de organizadores nucleolares, se correlacionan de manera positiva.

Bajo esta consideración, los estudios indican que existen diferencias significativas entre neoplasias benignas y malignas, y establecen que después de un conteo amplio es posible determinar el valor de este método para la determinación del comportamiento biológico en los tumores limítrofes ("borderline"). Sin embargo, es necesario unificar criterios en la realización de la técnica con tinción de plata, sobre todo porque no se pueden obtener los resultados más confiables posibles si no hay un estándar a seguir.

Consideramos que los NORs pueden ser empleados como marcadores cuantitativos auxiliares en alteraciones celulares incipientes antes de que los cambios histológicos de malignidad puedan ser detectados. Además, la técnica AgNOR es un parámetro accesible, reproducible, económico y comparable que se podría utilizar en forma rutinaria de manera paralela a la técnica histológica de rutina en lesiones sospechosas de malignidad. El conteo de AgNORs en una población altamente especializada con un alto nivel de recambio de salud como es el epitelio bucal hace más complejo y variable el estudio, si se compara con estudios en una población celular más estable.

Referencias

1. Warnakulasuriya K, Johnson N. Nucleolar organizer region (Nor) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 77-81.
2. Karp G. Biología celular. 2a ed. México: Mc Graw-Hill, 1987; 522-723.
3. Donofrio V, Lo Muzio, Mignogna G, Troncone S, Staibano A, et al. Prognostic evaluation of HPV-Associated precancerous and microinvasive carcinoma of the Oral Cavity: Combined use of nucleolar organizer regions (AgNOR) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Oral Oncol Eur J Cancer* 1995; 31B (3): 174-180.
4. Schwint AE, Savino TM, Lanfranchini HE, Marschoff E, Cabrini RL, Itoiz ME. Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma or human oral mucosa. *Cancer* 1994; 73 (11): 2674-2679.
5. Xie X, Frass COP, Subdo J, Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Am Cancer Soc* 1997; 79: 2200-2208.
6. Cabrini RL, Schwint AE, Mendez A, Femopase F, Lanfranchini H, Itoiz ME. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 275-279.
7. Masanori S, Seiji N, Takeshi H, Makoto S, Masuichiro O. Mode of tumor invasion in oral squamous cell carcinoma: improved grading based on extracellular matrices. *Head and Neck* 1996; 80: 55-62.
8. Leyva HER, Flores G, Barrera R, Aldape BB. Regiones de organizadores nucleolares y examen por PCR de RNAr 18s en 19 casos de carcinoma epidermoide de cavidad

- bucal. *Rev Div Estud Posgrado Invest Fac Odont UNAM* 1998; 7: 17-25.
9. Migaldi M, Criscuolo M, Zunarelli E, Lo Branco L, Martinnelli AM, Barbolini G. P 120 and AgNOR nucleolar protein expression. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod* 1998; 85: 189-196.
 10. Derenzani M, Sirri V, Tere D. Nucleolar organizer regions in tumor cells. *Cancer J* 1997; 7 (2): 1-10.
 11. Rosa G. Prognostic evaluation of HPV associated precancerous and microinvasive carcinoma of the oral cavity: Combined use of nucleolar organizer regions (AgNOR) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Oral Oncol Eur J Cancer* 1995; 31B (3): 174-180.
 12. Schwint AE, Gómez E, Itoiz ME, Cabrini RL. Nucleolar organizer regions as markers of incipient cellular alterations in squamous epithelium. *J Dent Res* 1993; 72 (8): 1233-1236.
 13. Arora HL, Arora N, Solanki RL. Argyrophilic nucleolar organizer regions in soft tissue tumors. *Indian Pathol Microbiol* 1996; 39 (4): 257-263 (Abstract).
 14. Chatopadhyay A, Chawda JG, Doshi JJ. Silver binding nucleolar organizing region: A study of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofacial Surg* 1994; 23: 374-377.
 15. Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Chakraborty RN, Mitra RB. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral carcinomas in relation to human papillomavirus infection and cytogenetics. *J Oral Pathol Med* 1997; 26 (7): 310-314 (Abstract).
 16. De Rosa G, Staibano S, Barra E, Zeppa P, Salvatore G, Vetrani A, Palombini L. Nucleolar Organizer Region in Aggressive and Nonaggressive Basal Cell Carcinoma of the Skin. *Cancer* 1992; 69: 123-126.