

## ANÁLISIS DE LAS REGIONES ORGANIZADORAS DEL NUCLÉOLO (NORs) EN LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL Y EL CÁNCER DE CÉRVIX.

S. Y. Loaiza Vásquez<sup>1\*</sup>, J. B. Molina Barrios<sup>1</sup>, J. García Tamayo<sup>2</sup>

Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela <sup>1</sup>, Laboratorio de Patología Molecular, NOVAPATH. Maracaibo. Venezuela <sup>2</sup>

\*Autor de Correspondencia: Sweden Loaiza, correo electrónico: [swedenloaiza7@gmail.com](mailto:swedenloaiza7@gmail.com). Tlf: +58 414-6471808, fax: +58 261-7429786.

Recibido: Julio 2012. Aprobado: Octubre 2012.

Publicado: Enero 2013.

### ABSTRACT

The Nucleolar Organizer Regions (NORs) are segments of DNA that encode ribosomal RNA, which is directly related to protein synthesis and cell proliferation. Using silver impregnation techniques proteins associated with NORs can be detected, being its amount proportional to the proliferative activity. This paper aims to analyze the AgNOR (argyrophilic nucleolar organizer regions) in the progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN I, II, III) and cervical cancer through silver-staining technique to the prognosis of these injuries. In order to do so, the silver-staining technique was applied in 20 histological cuts from biopsies of cervix included in paraffin ( 4 cases of squamous metaplasia with VPH, of 6 of NIC I, 3 of NIC II and 3 of NIC III and 7 of squamous cell carcinoma). The average number of AgNORs was determined for cell for each case, obtaining significant differences ( $P < 0.05$ ) in the averages of the AgNORs among the control groups, NIC I, NIC II y NIC III with the squamous cell carcinoma and among the control groups and NIC I with the NIC III. We determined the average number of AgNORs per cell for each case, obtaining significant differences ( $P < 0.05$ ) in the averages of AgNORs between the control groups, CIN I, II and III squamous cell carcinomas and between control and CIN I to CIN III. It was concluded that AgNORs can be used as a method of prognosis in cervical lesions and serve as a complement to morphological diagnosis.

**Keywords:** Nucleolar organizer regions (NORs), intraepithelial neoplasia, cervical cancer.

### RESUMEN

Las Regiones Organizadoras Nucleolares (NORs) son segmentos de ADN que codifican el ARN ribosómico, el cual está directamente relacionado con la síntesis proteica y la proliferación celular. Mediante las técnicas de impregnación argéntica se pueden detectar las proteínas asociadas a los NORs, siendo su cantidad proporcional a la actividad proliferativa. El presente trabajo tiene como objetivo analizar los AgNORs (Regiones organizadoras nucleolares argirófilicas) en la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical (NIC I, II, III) y el cáncer de cuello uterino a través de la técnica de impregnación argéntica para el pronóstico de estas lesiones. Para ello, se aplicó la técnica de impregnación argéntica en 20 cortes histológicos provenientes de biopsias de cuello uterino incluidas en parafina (4 controles, 6 de NIC I, 3 de NIC II, 3 de NIC III y 7 de carcinoma epidermoide). Se determinó el número promedio de AgNORs por célula para cada caso, obteniéndose diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en las medias de los AgNORs entre los grupos control, NIC I, II y III con los carcinomas epidermoides y entre los grupos control y NIC I con el NIC III. Se concluyó que los AgNORs pueden ser utilizados como un método pronóstico en las lesiones del cuello uterino y que sirven de complemento al diagnóstico morfológico.

**Palabras claves:** Regiones organizadoras nucleolares (NORs), neoplasia intraepitelial, cáncer de cuello uterino.

### INTRODUCCIÓN

En el mundo, el carcinoma de cuello uterino es el tipo de cáncer que afecta con mayor frecuencia a la mujer y a pesar de ser una enfermedad que puede prevenirse, sigue siendo un problema de salud pública, afectando de manera

desproporcionada a los países menos desarrollados, donde los programas para la prevención y el diagnóstico precoz de cáncer de cuello uterino no han tenido un adecuado impacto en la reducción de la mortalidad por dicha

patología [1]. En Venezuela, desde la década de los años cuarenta, el cáncer de cuello uterino es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer [2].

La mayoría de los carcinomas del cuello uterino se inician como alteraciones intraepiteliales, por lo que frecuentemente existen lesiones sincrónicas y metacrónicas en el epitelio cervical displásico y neoplásico, que son provocadas por la expansión clonal de células epiteliales transformadas. [2]. A finales de los años 60 y comienzos de los 70 los estudios epidemiológicos aportaron abundante información acerca del cáncer cérvico-uterino, poniendo énfasis en un posible agente infeccioso relacionado con la etiología de la enfermedad. Desde el inicio de los años 80 la atención se fue enfocando en el virus del papiloma humano (VPH), basado en evidencias acumuladas a través de estudios epidemiológicos, clínicos y de biología molecular [3].

Ahora se sabe que en la transformación de las células del cáncer cervical siempre han mediado eventos genéticos previos y se conoce que los mismos están asociados a la presencia del VPH [2]. Los virus oncogénicos desempeñan un papel etiológico de extrema importancia en varios de los tumores malignos que afectan al hombre [4]. En el 80-90% de los casos diagnosticados con cáncer cérvico-uterino, se ha identificado DNA transcrito y los productos proteicos del VPH [5]. En la actualidad, la infección por VPH oncogénico es un prerrequisito para el desarrollo del cáncer cérvico-uterino [3].

Las regiones organizadoras nucleolares (NORs) como su nombre indica, están capacitadas para organizar los nucléolos y por tanto poseen el componente genético (ADNr) implicado en la biosíntesis de la maquinaria para transcribir diversos componentes del ARN ribosómico (ARNr) [6]. En la especie humana, estas regiones se encuentran ubicadas a nivel de las constricciones secundarias de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15,

21y 22), observándose en las células en interfase [7]. El número de AgNORs por núcleo se ha correlacionado con la tasa de transcripción del RNA ribosomal, proliferación celular y ploidía del DNA [8].

Las regiones organizadoras nucleolares son el resultado de la concentración de ARNr (ARN 28S, 18S, 58S), de tal forma que la cantidad de NORs aumenta en células donde la tasa de mitosis se encuentra incrementada, tal sería el caso de las células neoplásicas, las cuales al presentar mayor índice mitótico, tendrían una mayor cantidad de ARNr, y por ende, una mayor cantidad de NORs [9].

Un método establecido para cuantificar los NORs es mediante técnicas de impregnación argéntica [9]. Durante la mitosis, los genes ribosómicos están asociados con un conjunto de proteínas nucleolares ácidas (C23, B23 y posiblemente la ARN polimerasa 1), las que contienen abundantes grupos sulfhidrilo y carboxilo que precipitan los iones de plata; de este modo, los tejidos teñidos con plata coloidal permiten observar en el microscopio de luz las NORs argirofílicas (AgNORs), como puntos negros dentro del núcleo [10]. La cantidad de proteína de AgNOR, estimada durante la interfase, puede ser utilizada como marcador de proliferación celular con un valor pronóstico para varios cánceres humanos [11].

El presente trabajo tiene como objetivo analizar las regiones organizadoras nucleolares en la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical y el cáncer de cuello uterino.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se revisaron los archivos del año 2007 y 2010 del Laboratorio de Patología Molecular de la ciudad de Maracaibo y del Laboratorio de Patología BIMECA de la ciudad de Mérida. A partir de 70 biopsias se seleccionaron 20 muestras de pacientes, las cuales fueron clasificadas siguiendo los criterios de diagnóstico anatomopatológico de estas lesiones: NIC I (Se encuentra afectado el tercio

inferior del epitelio exocervical), NIC II (se encuentra afectado dos tercios del epitelio exocervical), NIC III (las células se tornan anaplásicas ocupan todo el espesor del epitelio sin traspasar la membrana basal) y carcinoma epidermoide (las células anaplásicas traspasan la membrana basal e invaden el estroma). La selección de los casos a estudiar se realizó en función de la disponibilidad del material (bloques de parafina) y la preservación del mismo.

El material a estudiar fue previamente fijado en formol tamponado al 10% e incluido en parafina. Se obtuvieron varios cortes de dos micras de espesor de cada uno de los casos seleccionados utilizando un microtomo de rotación, dichos cortes fueron trasladados a un baño de flotación para tejido, se colocaron en láminas portaobjetos y luego fueron desparafinados en el microondas durante un minuto. Los cortes primeramente fueron coloreados con hematoxilina eosina para categorizarlos según fuese el diagnóstico (NIC I, II, III y carcinoma epidermoide), luego se les realizó la tinción de impregnación argéntica según la técnica de Smith y Crocker (1988).

Las láminas fueron desparafinadas en xilol y pasadas por tres baños en alcohol al 95%, los dos primeros baños por dos minutos y el último por 5 minutos. Luego se pasaron por un baño con agua corriente durante 2 ó 3 minutos agitando suavemente. Se colocaron en hematoxilina por 5 minutos y luego en un baño en agua corriente por 2 minutos. Las láminas fueron teñidas con eosina durante 1 minuto y tres baños en alcohol isopropílico al 95% durante 2 minutos cada uno. Por último se realizó un baño de las muestras en la solución de xilol/ alcohol y dos baños rápidos en xilol durante dos minutos cada uno.

Al extraer el portaobjetos del último baño con xilol, se colocó una gota de medio Martex sobre un extremo del corte y se dejó caer suavemente el cubre-objeto, limpiando luego cualquier exceso para finalmente

observar al microscopio. Se evaluó cada uno de los casos y se categorizaron según la presencia de NIC I, II, III y carcinoma epidermoide.

A los cortes de las biopsias se les realizó la técnica de AgNOR según Smith y Crocker (1988). Para ello dos gramos de gelatina se disolvieron en una solución de ácido fórmico al 1% y de esta solución se disolvió 1 ml en 2 ml de nitrato de plata al 50% diluida en agua destilada. Los cortes desparafinados fueron sometidos a cambios de xilol e hidratados en alcoholes de concentraciones decrecientes hasta lavar con agua destilada, posteriormente se les colocó una gota de la solución argéntica durante 30 minutos en una cámara húmeda oscura y a temperatura ambiente. Los cortes fueron lavados en agua destilada, deshidratados en alcoholes a concentraciones crecientes y montados en medio sintético (Martex) para su observación. La presencia de NORs fue reconocida por los gránulos de plata en el núcleo, los cuales fueron observados con un microscopio de luz adaptado a un televisor de 18 pulgadas empleando un aumento de 400X.

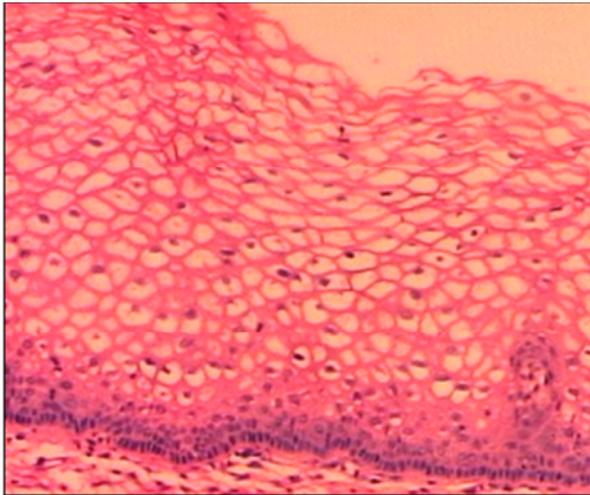
Para el conteo de NORs presentes en las células del epitelio exocervical se aplicó la metodología utilizada por Prasad y Ray (1993), donde cada AgNORs fue contado como una unidad independiente, en aquellos casos donde los AgNORs se agrupaban para formar masas, se intentó individualizarlos, contando cada una de las unidades constituyentes. Se anotó el número de AgNORs encontrado en 100 células para cada caso.

Para establecer una comparación entre los diferentes grados de neoplasia intraepitelial cervical y el cáncer de cuello uterino, se les aplicó una estadística descriptiva para obtener el promedio y la desviación estándar de cada uno de los casos y un ANOVA de una vía para determinar diferencias estadísticas significativas entre las medias; cuando resultó significativo, se buscaron los grupos

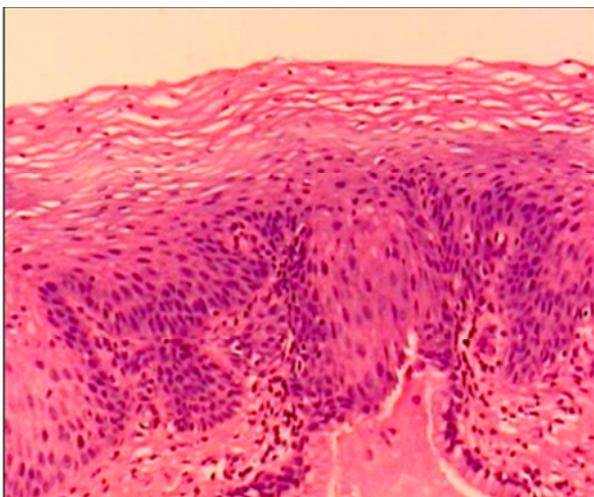
diferentes utilizando la prueba de rangos múltiples. En todos los casos se tomaron como significativos los contrastes con p-valores  $< 0,05$ . El análisis se realizó mediante el paquete estadístico Statgraphics centurión X.

## RESULTADOS

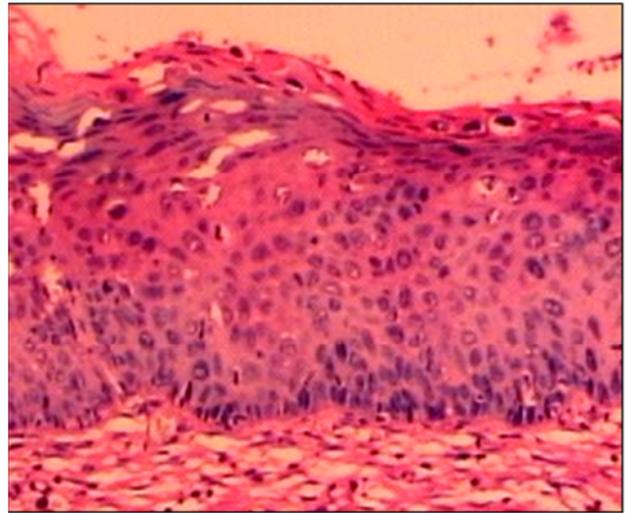
Se estudiaron 20 biopsias de cuello uterino cuyo diagnóstico anatomopatológico mediante la tinción de hematoxilina-eosina fue el siguiente: 4 casos controles correspondientes a pacientes con atipias coilocíticas, 6 casos de neoplasia intraepitelial cervical de tipo I, 3 casos de neoplasia intraepitelial cervical de tipo II, 3 casos de neoplasia intraepitelial cervical de tipo III y 7 casos de carcinoma epidermoide (figuras 1, 2, 3, 4 y 5).



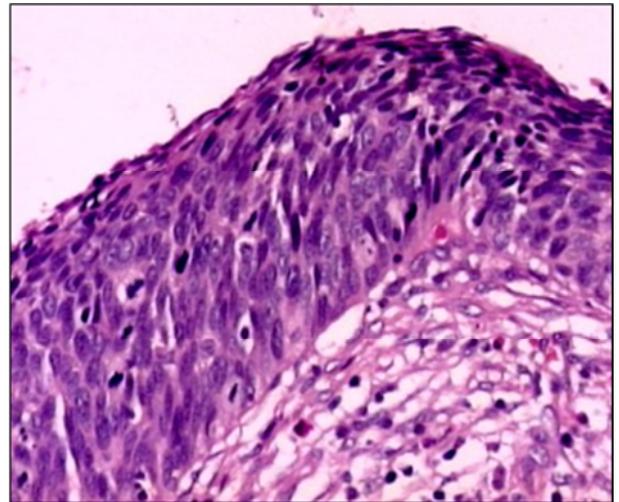
**Fig. 1.** Control (atipias coilocíticas) H-E. 200x



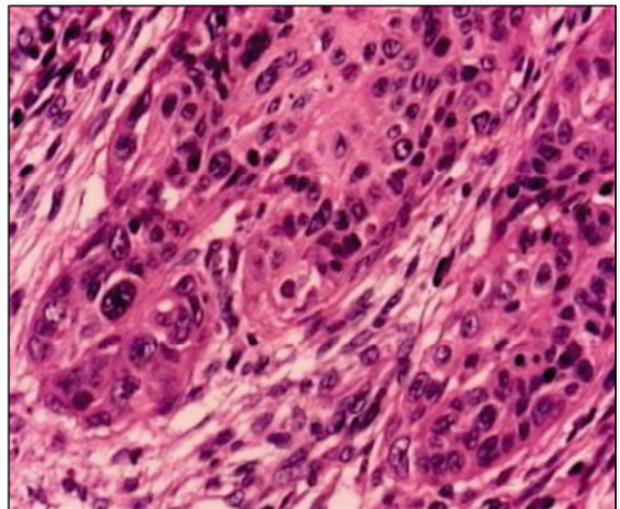
**Fig. 2.** NIC I H-E. 200x



**Fig. 3.** NIC II H-E. 200x



**Fig. 4.** NIC III H-E. 200x

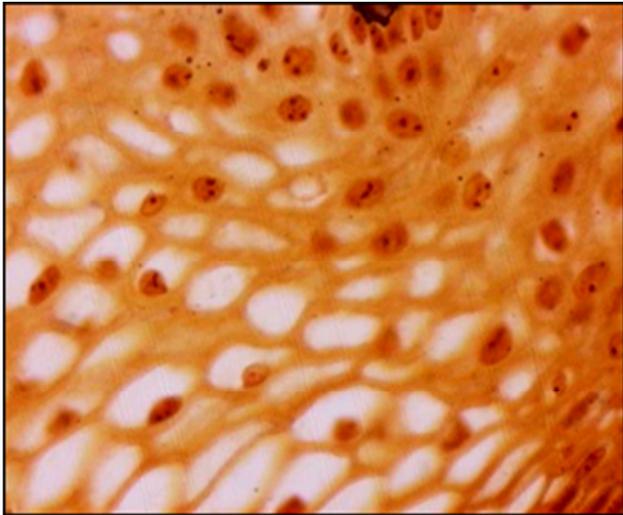
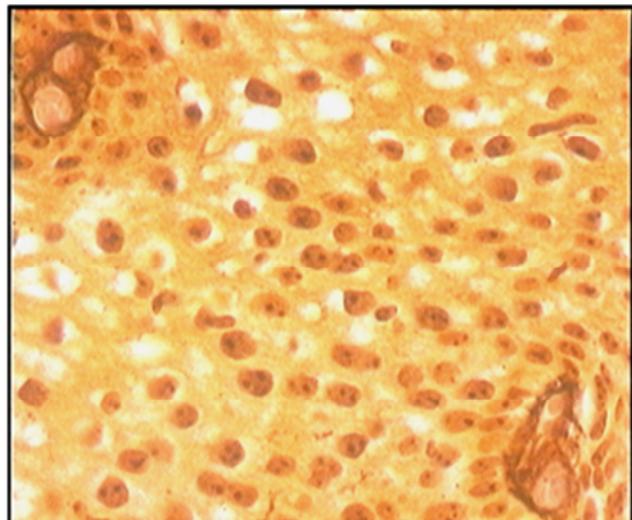
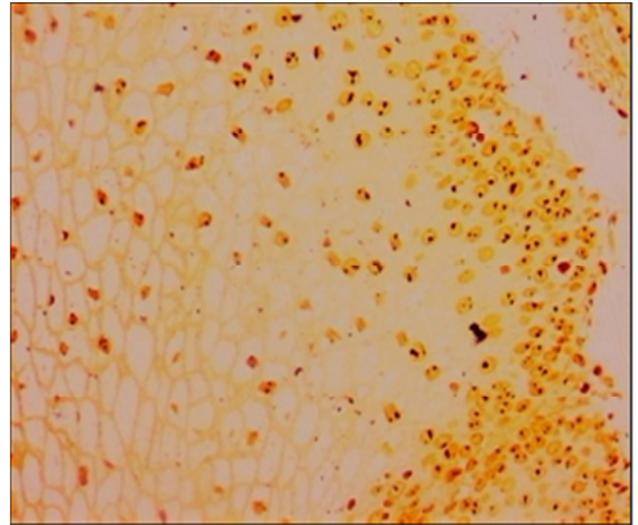
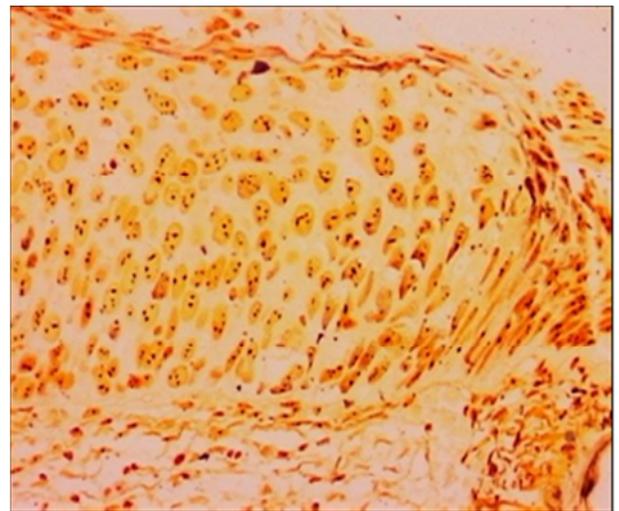


**Fig. 5.** Carcinoma epidermoide H-E. 400x

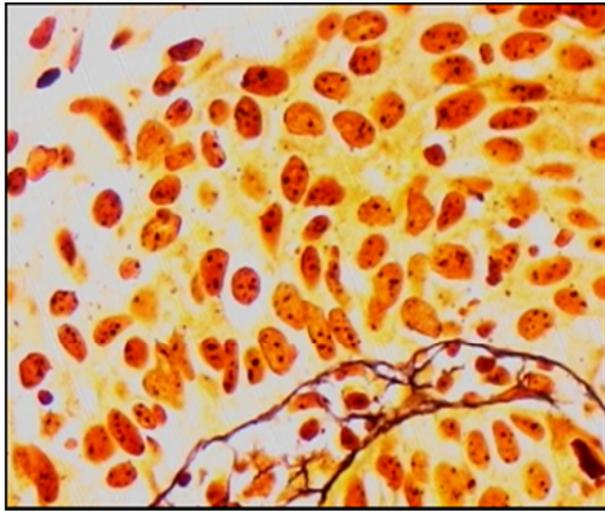
*Tinción de los AgNORs***Tabla 1.** Media y desviación estándar de los AgNORs en la progresión de la neoplasia intraepitelial cervical y cáncer de cuello uterino.

Diagnóstico histopatológico	Media $\pm$ DS
Control	2,03 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>
NIC I	2,07 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
NIC II	2,34 $\pm$ 0,41 <sup>ab</sup>
NIC III	2,93 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup>
CE	4,05 $\pm$ 0,45 <sup>c</sup>

a, b, c: Superíndices indican diferencias significativas entre los grupos  $p < 0,05$ .

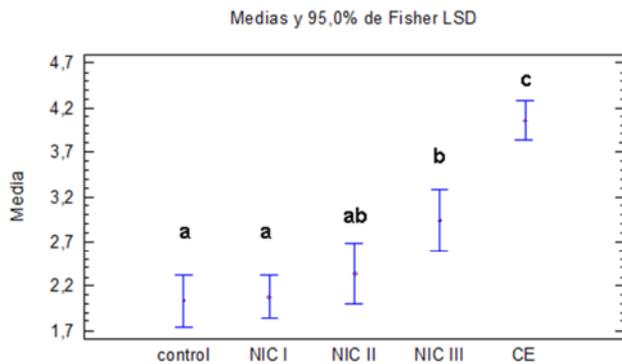
**Fig. 6.** Control (atipias coilocíticas). 400x**Fig. 7.** NIC I AgNORs. 400x**Fig. 8.** NIC II AgNORs. 200x**Fig. 9.** NIC III AgNORs. 200x

Como resultado del estudio de los AgNORs, se observó un incremento progresivo de los mismos desde las células benignas hasta las malignas (figuras 6, 7, 8, 9 y 10). En el grupo control el conteo de AgNORs fue bajo, con una media de  $2,03 \pm 0,20$ . Para el NIC I la media fue de  $2,0 \pm 0,22$ . El NIC II tuvo una media de  $2,34 \pm 0,41$ . En el NIC III la media fue de  $2,93 \pm 0,65$ . Se observó un aumento considerable de la media de los AgNORs en los casos de carcinoma epidermoide con respecto a los anteriores, siendo ésta de  $4,05 \pm 0,45$ .



**Fig. 10.** Carcinoma epidermoide AgNORs. 400x

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos: control, NIC I, NIC II y NIC III con los carcinomas epidermoides y entre los grupos: control y NIC I con el NIC III (figura 11).



**Fig. 11.** Media y desviación estándar de AgNORs por tipo de neoplasia intraepitelial cervical y cáncer de cuello uterino

## DISCUSIÓN

Las regiones organizadoras nucleolares son porciones de ADN localizadas en los cromosomas acrocéntricos 13,14, 15, 21 y 22 [8]. Estas regiones cumplen un papel esencial en la transcripción del ARN [14], y se encuentran asociadas a proteínas no histónicas con afinidad por la plata [8]. Las regiones organizadoras nucleolares se

visualizan como puntos negros al emplear técnicas argirófilicas, denominándose AgNORs [14].

El número de AgNORs se ha correlacionado con la tasa de transcripción de ARN ribosomal, proliferación celular y ploidía [8]. Un incremento aparente de los NORs en una población de células, refleja un incremento de la actividad transcripcional [14].

Este estudio aporta datos respecto al número AgNOR en la progresión de las lesiones del cuello uterino, las cuales han sido objeto de innumerables investigaciones con el fin de entender mejor su comportamiento biológico y su utilidad como marcador pronóstico. En este trabajo el conteo de los AgNORs mostró que las medias de los casos controles y de neoplasia intraepitelial cervical I y II resultaron muy similares: los casos controles  $2,03 \pm 0,20$ , NIC I  $2,07 \pm 0,22$  y NIC II  $2,34 \pm 0,41$ ; indicando un posible solapamiento entre algunos de los datos obtenidos para estos grupos, dificultando así el uso de esta técnica como método diagnóstico. Por otro lado, las medias obtenidas en los casos diagnosticados como NIC III y carcinoma epidermoide fueron diferentes entre ellas: NIC III  $2,93 \pm 0,64$  y carcinoma epidermoide  $4,05 \pm 0,45$ . Esto permite considerar la posibilidad de utilizar esta técnica como un marcador pronóstico auxiliar en la evaluación de las lesiones intraepiteliales cervicales y el carcinoma epidermoide del cuello uterino.

Los primeros trabajos en relación a las lesiones del cuello uterino fueron publicados a finales de la década de los ochenta con resultados controversiales. El primero de ellos fue publicado por Egan y col. en 1988, donde analizaron 50 casos que abarcaron desde el epitelio escamoso cervical normal hasta el NIC III, observando un incremento progresivo en el número de los AgNORs y concluyendo que esta técnica representa una herramienta útil para el diagnóstico y para predecir el comportamiento clinicopatológico en las lesiones del cuello uterino. Sin embargo, Rowlands en ese mismo año, no encontró

diferencias significativas entre el número de AgNORs del epitelio normal, NIC I, II, III en 24 casos estudiados.

Thickett y col. en el año 1989 publicaron resultados similares a los obtenidos por Egan y col. (1988). En ese mismo año Marbaix y col. publicaron su estudio de 48 casos donde concluyeron que a pesar de observar un incremento progresivo en el conteo de AgNORs en los diferentes grupos de estudio, este factor no debería representar un factor pronóstico en la evaluación de las lesiones premalignas y malignas del cuello uterino.

Alcántara y col. en el año 1992 estudiaron 35 biopsias del cérvix y encontraron diferencias significativas entre los casos de cérvix normal y aquellos con infección por VPH y carcinoma cervicouterino, siendo éste el primer trabajo publicado en Latinoamérica acerca del comportamiento de los NORs en las lesiones del cuello uterino. Más adelante autores como Crisan y col. (1996), Terlikowski y col. (1998) y Singh y col. (2006) confirman el valor pronóstico de los AgNORs en las lesiones del cuello uterino. Desde entonces, este método ha sido utilizado ampliamente para evaluar diferentes patologías.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los descritos en los numerosos estudios mencionados anteriormente sobre neoplasias intraepiteliales cervicales y el cáncer de cuello uterino, independientemente que éstos efectuaran la evaluación de los AgNOR por análisis microscópico ó con ayuda de técnicas de análisis de imagen. Igualmente el fijador utilizado, el grosor del corte, el método de impregnación argéntica, el tiempo de la exposición a la misma, así mismo las metodologías de conteos varían de un autor a otro, sin embargo, esta variación no impidió comparar los resultados.

## CONCLUSIONES

Se considera la posibilidad de utilizar la técnica de AgNORs como un marcador pronóstico auxiliar en la evaluación de las lesiones intraepiteliales cervicales y el

carcinoma epidermoide del cuello uterino, ya que es un parámetro accesible, reproducible y económico que se podría utilizar de manera paralela a la técnica histológica de rutina en lesiones sospechosas de malignidad, complementando así el diagnóstico morfológico.

## REFERENCIAS

- [1] Wiesner C; Vejarano M; Caicedo J; Tovar S; Cendales R. (2006). "La citología de cuello uterino en Soacha, Colombia: representaciones sociales, barreras y motivaciones". *Salud Pública*. 8: 185-196.
- [2] García Tamayo J. (2006). "Actualización sobre la historia del virus del papiloma humano en Venezuela y su relación con el cáncer cervical". *Vitae-Academia Biomédica Digital*. 27.
- [3] Nazzal O; Suárez E; Larraguibel R; Rojas L; Bronda A. (2006). "Lesiones preinvasoras de cuello uterino: Una visión actual". *Rev chil obstet Ginecol*. 71: 341-348.
- [4] León G., Bosques O. (2005). "Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino". *Rev Cubana Obstet Ginecol*. 31: 1-8.
- [5] León G; Bosques O; Silviera M. (2004). "Mecanismos moleculares de los cofactores asociados con el cáncer de cuello uterino". *Rev Cubana Obstet Ginecol*. 30: 1-5.
- [6] Giménez G. (2001). "Revisión. Reiniciación de la transcripción en el ciclo celular: Nucleologénesis". *Anal Real Acad Farm*. 67: 43-84.
- [7] Pedrazzini E; Slavutsky I. (1997). "Regiones organizadoras del nucléolo (NORs) en neoplasias linfoides". *Bol Acad Nac Med B Aires*. 75: 525-35.

- [8] Orellana A; Espinoza I; Franco M; Jaimes N; Ortega A. (2004). "Evaluación del grado de queratinización y recuento de AgNORs en citología exfoliativa de mucosa oral normal de individuos fumadores y no fumadores". *Med Oral*. 9:197-203.
- [9] Huerta L; Flores G; Gaitán L. (2008) "¿Son los AgNOR's una herramienta útil como marcadores pronósticos de cáncer oral?". *Avances en Odontoestomatología*. 24: 211-218.
- [10] Cano C; Alvarez G; Valencia W; Ramirez J; Prada C. (2002)." Análisis del marcador tisular AgNOR en leucoplasia y carcinoma escamocelular oral". *Med. Oral*. 7: 17-25.
- [11] Roussel P; Hernandez D. (1994). "Identification of Ag-NOR proteins, Markers of proliferation related to Ribosomal Gene Activity". *Experimental Cell research*. 214: 465-472.
- [12] Smith R., Crocker J. (1988). "Evaluation of nucleolar organizer region associated proteins in breast malignancy". *Histopathol*. 12: 113-25.
- [13] Prasad C., Ray J. (1993). "Significance of nucleolar organizing regions in ovarian epithelial tumors". *Surgical Pathology*. 66:127-135.
- [14] Darne J; Polacz S; Sheridan E; Anderson D; Ginsberg R, Sharp F.(1990). "Nucleolar organizer regions in adenocarcinoma in situ and invasive adenocarcinoma of the cervix". *J Clin Pathol*. 43: 657-660.
- [15] Egan M; Freeth M; Crocker J. (1988). "CIN, VPH infection and nucleolar organizer regions in cervical epithelium". *J Patthol*. 154:80.
- [16] Rowlands D. (1988), "Nucleolar organizing regions in cervical intraepithelial neoplasia". *J Clin Pathol*. 41:1200-2.
- [17] Thickett K; Griffin N; Griffiths A; Wells M. (1989) "A study of nucleolar organizer regions in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection". *Int J Gynecol Pathol*. 8:331-9.
- [18] Marbaix E; Dewandeleer S; Habba C; Liegeois P; Willems T; Rahier J; Donnez J. (1989). "Nucleolar organizer regions in the normal and carcinomatous epithelium of the uterine cervix. A morphometric study". *Int J Gynecol Pathol*. 8:237-45.
- [19] Alcántara A; Hernández M; Amancio O; Lira J. (1992). "Comportamiento de los organizadores nucleolares en el cervix normal, infección por virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino". *Ginecol obstet Méx*. 60:286-9.
- [20] Crisan D; Olinici C; Rasinariu A; Basaraba A. (1996). "Nucleolar organizer regions (AgNORs) in intraepithelial neoplasia of the uterine cervix". *Rom J Morphol Embryol*. 42: 213-218.
- [21] Terlikowski S; Dzięcioł J; Mazurek A; Sulkowski S, Boroń R; Oniszcuk M; Lejmanowicz K. (2004). "A morphometric study of nucleolar organizer regions in cervical intraepithelial neoplasia". *Folia Morphol*. 63: 209-212.
- [22] Singh U; Singh R; Srivastava A; Mishra J; Singh N; Qureshi S; Jaiswar S; Srivastava S. (2006). "AgNOR count and its diagnostic significance in cervical intraepithelial neoplasia". *J Obstet Gynecol India*. 56: 244-246.