

01421  
94



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DETERMINACION DE AgNORs EN CELULAS DE  
DESCAMACION EN FUMADORES CRONICOS

**T E S I N A**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**C I R U J A N O     D E N T I S T A**

**P R E S E N T A :**

**RUBEN ALEJANDRO DOMINGUEZ JAMESON**

TUTORA: DRA. ELBA LEYVA HUERTA



MEXICO D.F.

2003

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar con bien hasta esta etapa de mi vida.

A mis padres por darme la existencia, por todo su amor, comprensión y apoyo en los momentos buenos y malos, por ser mi soporte en todo momento a pesar de mi carácter.

A Jorge, mi hermano por todo el apoyo y el cariño mostrado en los tiempos difíciles, pero sobre todo por saber ser mi amigo.

A Tamara por toda la paciencia y el amor mostrado siempre, por estar a mi lado incondicionalmente.

A la Doctora Elba Leyva por compartir su conocimiento y su sabiduría, por encaminarme excelentemente durante la realización de este trabajo y por toda la paciencia y comprensión que recibí de su parte.

A Eunice por ayudarme a la realización de una parte importantísima de este trabajo.

A Hernick y Luis por brindarme su apoyo y su amistad aún a pesar de todos estos años que ya han pasado.

A mis compañeros y amigos de profesión a quienes estimo y admiro.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas  
UNAM a difundir en formato electrónico e imp.  
contenido de mi trabajo respectivo.

NOMBRE Dominiquez Amador

Rosita Alejandro

FECHA: 02-Mayo-2003

FIRMA: [Firma]

B

# “DETERMINACIÓN DE AgNORs EN CÉLULAS DE DESCAMACIÓN DE LA MUCOSA BUCAL DE FUMADORES CRÓNICOS”

## ÍNDICE

	PAG.
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>ANTECEDENTES</b>	3
Importancia del núcleo celular	3
El nucleolo y su relación con el núcleo en la transcripción del RNA	4
¿Qué son las Regiones de Organizadores Nucleolares (NORs)?	6
Papel que juegan los NORs en el metabolismo nuclear	7
Técnica de AgNORs	12
Relación de las NORs con el cáncer	15
Tabaquismo y cáncer bucal	17
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	21
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	21
<b>HIPÓTESIS</b>	22
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	22
Objetivos específicos	22
<b>METODOLOGÍA</b>	23
Diseño de la muestra	23
Tipo de estudio	23
Población de estudio	23
Criterios de inclusión	23
Criterios de exclusión	24
Métodos	24

**RESULTADOS**  
**DISCUSIÓN**  
**CONCLUSIONES**  
**BIBLIOGRAFÍA**

**PAG.**  
**27**  
**38**  
**40**  
**41**

D

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PAG.</b>
<b>Fig.1.</b> Cromosomas acrocéntricos	<b>7</b>
<b>Fig. 2.</b> Componentes del nucleolo	<b>8</b>
<b>Fig. 3.</b> Disposición en forma de arbolitos de navidad que representa ADN en actividad transcripcional con sus consecuentes fibrillas de ARN en crecimiento.	<b>10</b>
<b>Fig. 4.</b> Regiones de Organizadores Nucleolares	<b>13</b>
<b>Fig. 5.</b> Células de descamación de la lengua	<b>31</b>
<b>Fig. 6.</b> Pleomorfismo nuclear en las células de descamación	<b>31</b>
<b>Fig.7.</b> Infiltrado inflamatorio	<b>32</b>
<b>Fig. 8.</b> Colonias de microorganismos, cocos en racimo	<b>32</b>
<b>Fig. 9.</b> Colonias de microorganismos, bacilos	<b>33</b>
<b>Fig. 10.</b> Células de descamación que presentan 2 y 3 AgNORs	<b>35</b>
<b>Fig. 11.</b> Células de descamación que presentan 2 AgNORs	<b>35</b>
<b>Fig. 12.</b> Células de descamación que presentan 3, 4 y 5 AgNORs y pleomorfismo nuclear	<b>36</b>
<b>Fig. 13.</b> Célula de descamación que presenta 6 AgNORs	<b>36</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PAG.</b>
<b>Tabla 1.</b> Células de descamación en el total de los casos	<b>28</b>
<b>Tabla 2.</b> Infiltrado inflamatorio en el total de los casos	<b>28</b>
<b>Tabla 3.</b> Colonias de microorganismos en el grupo de estudio	<b>29</b>
<b>Tabla 4.</b> Promedio de AgNORs por caso en mucosa yugal	<b>34</b>
<b>Tabla 5.</b> Prmedio de AgNORs por caso en cara dorsal de la lengua	<b>34</b>

E

**ÍNDICE DE GRÁFICAS**

	<b>PAG.</b>
<b>Gráfica 1.</b> Células de descamación en el total de los casos	<b>29</b>
<b>Gráfica 2.</b> Infiltrado inflamatorio en los casos estudiados	<b>30</b>
<b>Gráfica 3.</b> Colonias de microorganismos en las muestras obtenidas	<b>30</b>
<b>Gráfica 4.</b> Promedio de AgNORs por célula en cada caso	<b>37</b>

F

## RESUMEN

La cuantificación de Regiones de Organizadores Nucleolares (NORs), ha sido sugerida como un indicador de proliferación celular, por lo cual constituye una herramienta para el diagnóstico y pronóstico de lesiones tumorales.

En base a este conocimiento se realizó un estudio cualitativo a 27 pacientes fumadores crónicos a través de la técnica des Papanicolau y posteriormente se tomaron 10 casos para realizar la cuantificación de AgNORs mediante la tinción de plata coloidal descrita por Ploton. De cada caso se obtuvieron dos laminillas, una de la mucosa yugal y otra de la cara dorsal de la lengua.

Con la técnica de Papanicolau se observaron con microscopio de campo claro células de descamación normales y algunos casos con pleomorfismo nuclear; colonias de microorganismos, principalmente cocos y bacilos; así como la presencia de infiltrado inflamatorio de neutrofilos en casi todos los casos. Los casos teñidos con plata coloidal mostraron un promedio de 3 a 7.5 AgNORs por célula en los casos observados de mucosa yugal y de 2.1 a 4.3 en los casos de lengua. Al estudiar los casos por separado, se obtuvieron promedios mayores de AgNORs por célula en mucosa yugal en la mayoría de los casos, lo que no es común, pues se esperaba que el promedio mayor fuera observado en lengua. Estos resultados mostraron mediante el análisis de relaciones de Pearson un margen de error de .20% de acuerdo a las desviaciones con respecto a la media total de los promedios de AgNORs por célula para los casos de mucosa yugal y de lengua.

## INTRODUCCIÓN

EL tabaco ha sido hasta hoy un problema de salud pública con repercusiones nocivas en la salud general de los pacientes afectados por esta dependencia. Es preocupante la manera en que cada día más personas comienzan a fumar a una edad temprana, al igual que alarmante el número de muertes ocurridas en el grupo de fumadores crónicos.

El cáncer bucal es una de las manifestaciones clínicas más tardías en fumadores crónicos, desgraciadamente cuando estas lesiones son descubiertas mediante la inspección del propio paciente o del Cirujano Dentista, la lesión ya está en estadios avanzados.

Las Regiones de Organizadores Nucleolares están relacionadas con los procesos de proliferación celular, es por eso que en este estudio se decidió realizar la observación cualitativa de células de descamación de mucosa yugal y mucosa de la cara dorsal de la lengua a través de la técnica de Papanicolau y la determinación de AgNORs en casos de fumadores crónicos para observar la relación que tiene el tabaco con cambios celulares morfológicos a nivel del núcleo y con el incremento en el número de AgNORs de las células.

El procedimiento realizado no es caro y no es difícil de realizar, por lo cual consideramos que puede convertirse en una herramienta para diagnosticar o pronosticar lesiones malignas en pacientes de alto riesgo, como lo son los fumadores crónicos.

## ANTECEDENTES

### Importancia del núcleo celular

El crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos dependen de la proliferación y la multiplicación de sus células. En los organismos unicelulares, la división celular implica una verdadera reproducción y por este proceso, a partir de la célula primitiva, se originan dos o más individuos. Por el contrario, los organismos multicelulares provienen de una sola célula y la repetida multiplicación de ésta y de sus descendientes, determina el desarrollo y el crecimiento del individuo<sup>1</sup>.

Todas las células poseen un material genético que alberga la información necesaria para regular todas sus actividades y que es transmitido de generación en generación. En células procarióticas, casi todo el material genético está constituido por una hebra de ADN desnuda (no unido a otras proteínas que no sean las implicadas exclusivamente en su regulación). En bacterias, se denomina cromosoma bacteriano o nucleóide y se localiza inmerso en el seno del hialoplasma, anclado a la membrana plasmática. En células eucarióticas, la información genética está impresa en estructuras independientes de doble membrana, denominada núcleo<sup>3</sup>.

Las células eucarióticas pasan por dos fases a lo largo de su vida: la interfase y la división. Ambas etapas, que constituyen lo que se conoce como ciclo celular, implican una serie de cambios de la estructura de la célula que atañen fundamentalmente al núcleo. Durante la interfase, dividida a su vez en varias etapas ( $G_1$ , S y  $G_2$ ), la célula muestra el núcleo rodeado de una doble membrana que encierra en su interior un entramado de estructura fibrilar denominado cromatina. Cuando se inicia la división, la cual también atraviesa diferentes etapas (profase, metafase, anafase y telofase), la cubierta membranosa del núcleo

desaparece y su contenido fibrilar se transforma en un conjunto de filamentos independientes que se condensan en estructuras con aspecto de bastoncitos, los cromosomas. Al final de la división, los cromosomas se descondensan de nuevo y se vuelven a transformar en un entramado de cromatina, en la cual ya no se observa la individualidad de los cromosomas, que no vuelven a aparecer como tales hasta la división siguiente. Así, pues, se llegó rápidamente a la conclusión de que cromosomas y cromatina son dos estados morfológicos de la misma entidad, el primero del período de división y el segundo de la interfase o período que separa dos divisiones sucesivas<sup>3</sup>.

Las investigaciones bioquímicas y moleculares más recientes han demostrado que el núcleo es el lugar de almacenamiento de la mayor parte de la información requerida para dirigir la totalidad de las actividades celulares<sup>3</sup>. Por lo que el núcleo es el centro de control de la célula eucariótica. Las instrucciones genéticas para el crecimiento y desarrollo están codificadas en el ADN, que constituye parte de la fibra cromosómica de nucleoproteína. La replicación del ADN ocurre en el núcleo y su transcripción en ARN en el nucleolo, de modo que las diferentes formas de ARN deben procesarse ahí antes de ser canalizadas a sus sitios de actividad en el citoplasma. Los cromosomas empaquetan los genes, participan en la regulación de la expresión génica y constituyen el almacén físico y químico para que los genes replicados sean distribuidos a los núcleos de la progenie durante la reproducción<sup>2</sup>.

### **El nucleolo y su relación con el núcleo en la transcripción del ARN**

Los nucleolos fueron descritos por primera vez en 1781 por Fontana como gránulos intranucleares densos<sup>2,3</sup>.

A fines del siglo pasado creyó advertirse una relación entre el tamaño del nucleolo y la actividad sintética de la célula. En las células con escasa síntesis

proteica (espermatozoides, blastómeros, células musculares) los nucleolos eran pequeños o habían desaparecido; en cambio, eran voluminosos en ovocitos, neuronas y células secretoras, en las cuales la síntesis de proteínas es importante<sup>1</sup>.

El número de nucleolos generalmente suele ser de uno por núcleo, aunque existen tipos celulares que suelen presentar dos; este último, es el caso de neuronas y hepatocitos. Un caso extremo respecto a este parámetro, tiene lugar en oocitos de Anfibios, que en determinadas etapas de su maduración pueden llegar a presentar hasta 1.000 nucleolos por núcleo<sup>3</sup>.

El nucleolo fue aislado de ovocitos de animales marinos, así como de células hepáticas. Los nucleolos poseen de 3 a 5 por ciento de ARN; esta es una cantidad menor de la que indican las observaciones citoquímicas, pero podría haber cierta pérdida durante la extracción. En nucleolos de embriones de guisantes, el contenido de ARN es del 10 % y representa al 20 % del ARN total del núcleo<sup>1</sup>.

El nucleolo es la fábrica virtual para la síntesis de ARN ribosómicos y el ensamblaje de subunidades del ribosoma en forma de precursor<sup>2</sup>. Ha sido demostrada la función del nucleolo como sede de los procesos de transcripción y maduración de los precursores ribosómicos. Ya en 1940 Brachet demostró por técnicas de espectrofotometría, la existencia a nivel del nucleolo de grandes cantidades de ARN. En 1960 Perry realizó un experimento consistente en destruir el nucleolo mediante el empleo de radiación ultravioleta dirigida al lugar de ubicación del mismo en la célula. En estas células anucleoladas, observó que el flujo de ARN ribosómico de nueva síntesis cesaba en el citoplasma, demostrando así que la producción de ARN ribosómico dependía de un nucleolo intacto<sup>3</sup>.

El ARN ribosómico presente en el nucleolo se origina por transcripción, a partir de ciertas regiones del ADN del cromosoma denominadas organizadores nucleolares<sup>3</sup>, por lo tanto, se puede deducir que cada nucleolo es producido por una región de organizador nucleolar (NOR) u organizador nucleolar específico<sup>2</sup>; dichas estructuras serán mencionadas más adelante.

## **¿Qué son las Regiones de Organizadores Nucleolares (NORs)?**

Como ya se ha mencionado, cada nucleolo es producido por una región de organizador nucleolar (NOR), estas se localizan en un sitio particular de un cromosoma organizador del nucleolo específico. Además, dicho organelo permanece adherido a la NOR. Un genoma puede incluir uno o más organizadores del nucleolo y, por tanto, puede haber uno o más nucleolos en el mismo núcleo. Sin embargo, los nucleolos se fusionan, de modo que un recuento nucleolar no es una indicación del número de cromosomas organizadores del nucleolo en un complemento de cromosomas. Por lo general la NOR está localizada en el brazo corto de los cromosomas acrocéntricos, y una pequeña perilla o satélite del cromosoma se proyecta más allá de la NOR<sup>2</sup>. En el caso de las células humanas, son 5 los cromosomas que contienen los genes del organizador nucleolar (13, 14, 15, 21 y 22) como se muestra en la figura 1; en casos como éste, a partir de cada cromosoma se forma un pequeño nucleolo<sup>3</sup>; cada uno de estos cromosomas contiene dos NORs, por consiguiente, el número normal de NORs en células diploides es de 20, típicamente agregados en uno o dos nucleolos durante la interfase celular<sup>19</sup>. Estos distintos nucleolos terminarán reuniéndose en una única estructura<sup>3</sup>, como ya se había mencionado anteriormente. Durante la mitosis, sin embargo, la fragmentación nucleolar ocurre, resultando en la dispersión de las NORs a lo largo del núcleo<sup>20</sup>.

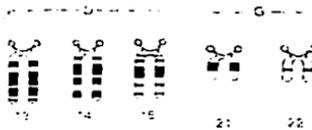


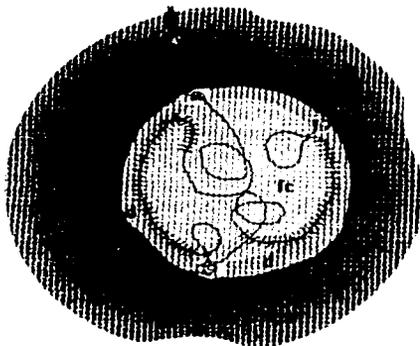
Fig.1. Cromosomas acrocéntricos.  
(Tomado de: J. Avers, Charlotte:  
*Biología Celular*)

En otras palabras, las regiones de organizadores nucleolares son porciones de ADN que contienen genes que codifican la síntesis de ARNr. Estos genes son transcritos por la ARN polimerasa I y son de vital importancia en la síntesis de proteínas<sup>15</sup>, ya que variaciones en el patrón normal de los NORs indican cambios cualitativos y cuantitativos en dicha síntesis de proteínas. Un incremento en el número de NORs en el núcleo interfásico indica hiperactividad, y esto puede sugerir diferentes condiciones patológicas, proporción de proliferación incrementada, cambios en los procesos de diferenciación celular y actividad secretora. Estos cambios pueden estar asociados con los procesos que involucran transformación maligna<sup>11, 14</sup>. El análisis cuantitativo de los NORs en interfase ha probado ser una herramienta útil en patología tumoral para distinguir lesiones malignas y benignas con un mismo origen<sup>12</sup>, esto será analizado más adelante.

### **Papel que juegan las NORs en el metabolismo nuclear**

La organización estructural del nucleolo refleja su adhesión cromosómica y sus funciones en la producción de la subunidad del ribosoma. En micrografías electrónicas de cortes delgados de células pueden distinguirse sus cuatro componentes: (1) Una zona granular (g), que contiene partículas difusas de alrededor de 15 nm de ancho, las cuales representan subunidades ribosómicas próximas a completarse; (2) una zona fibrilar (d), con fibrillas mal definidas de

transcritos de RNA en forma de nucleoproteína, que miden unos 5 nm de diámetro; (3) una zona de cromatina nucleolar (c), que consta de asas cromosómicas de 10 nm de ancho que se extienden fuera de su punto de adhesión en la NOR del cromosoma, y (4) una matriz nucleolar sin estructura en la cual están distribuidos todos estos materiales. En la figura 2 se muestran esquematizados los componentes del nucleolo a excepción de la matriz nucleolar debido a que es la zona en donde se localizan los componentes restantes.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2. Componentes del nucleolo: (g) zona granular, (d) zona fibrilar, (c) cromatina nucleolar. (Tomado de: Thiry, Marc; Goessens, Guy: *The nucleolus during the cell cycle*)

El nucleolo puede agrandarse en células activas y reducirse en células inactivas, debido principalmente a expansión o reducción de la zona granular. Sin duda, estos cambios en dimensiones resultan de velocidades diferentes en la producción de la subunidad ribosómica respecto a actividades celulares biosintéticas<sup>2</sup>.

Diferentes técnicas de biología molecular como la utilización de sondas, contra técnicas de microscopía electrónica, han permitido identificar, no sólo a las regiones cromosómicas que contienen el organizador nucleolar, sino también la estructura del ADN y el número de genes que las integran<sup>3</sup>. En base a esta información se ha determinado que si se aíslan ARN ribosómicos, previamente marcados con isótopos radiactivos, estos pueden ser utilizados como sondas moleculares para identificar por homología de bases los genes a partir de los que se transcribieron. Así pues, estas sondas permiten identificar en el cromosoma o cromosomas, las regiones donde se encuentran los genes del organizador nucleolar. Para ello, los cromosomas son sometidos a distintos procesos que permiten la desnaturalización de la doble hélice del ADN; de esta forma la molécula, que es bicatenaria, pasa a ser monocatenaria. A continuación, esta única cadena de ADN que puede hibridarse con los ARN ribosómicos marcados, los cuales actúan como auténticas sondas a nivel molecular, en función de la radiactividad detectada en la autoradiografía correspondiente, se puede determinar no sólo la zona del cromosoma donde se encuentran, sino también la cantidad de ARN ribosómico hibridado<sup>3</sup>.

Si se estudian los oocitos de anfibios, por medio de amplificación génica se observa que presentan un elevado número de nucleolos en estado condensado. Cuando se aíslan nucleolos de oocitos y se hacen estallar en soluciones de baja fuerza iónica, todo el material cromatínico se desorganiza y por consiguiente también los nucleolos. Concretamente en estos casos, la porción granular del nucleolo se dispersa y la porción fibrilar se extiende y desarrolla, permitiendo su observación bajo la alta resolución que ofrece la microscopía electrónica. Estas porciones fibrilares distendidas, muestran forma circular y se encuentran periódicamente recubiertas de secuencias fibrilares idénticas que alternan como regiones desnudas. El eje de la fibra corresponde a una cadena de ADN unida a histonas (presenta la típica estructura de la fibra nucleosómica) y las secuencias fibrilares que la decoran periódicamente, corresponden a unidades genéticas o

unidades de transcripción. Estas unidades genéticas se parecen a arbolitos de navidad (Figura 3) y representan regiones de ADN en actividad transcripcional que por consiguiente muestran fibrillas de ARN en crecimiento. Cada unidad genética lleva la información para la síntesis de una molécula de ARNr con un coeficiente de sedimentación de 45s, y es la base para la constitución de las subunidades ribosómicas. Entre cada dos unidades de transcripción aparece una zona que no se transcribe denominada espaciador y en la que se observa la fibra nucleosómica desnuda.

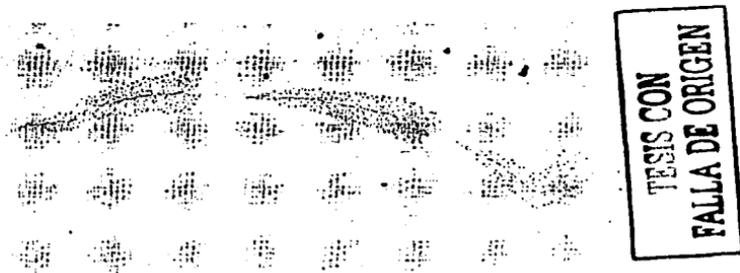


Fig. 3. Típica disposición en forma de arbolitos de navidad que representa ADN en actividad transcripcional con sus consecuentes fibrillas de ARN en crecimiento. (Tomado de: Thiry, Marc; Goessens, Guy: *The nucleolus during the cell cycle*)

Como consecuencia de los estudios realizados hasta hoy, se ha determinado que el organizador nucleolar está constituido por un elevado número de genes (unidades de transcripción) todos ellos con la misma información genética cuyo ADN es abundante en pares citosina/guanina. Estos genes repetidos en tándem a lo largo de toda la secuencia fibrilar, están separados por zonas de material genético que no se transcribe (espaciadores). Cada unidad de transcripción contiene la información para la síntesis de ARNr<sub>45s</sub>, que posteriormente madurará, fragmentándose en varias moléculas de ARNr, concretamente de 18s, otra de 5.8s y finalmente una de 28s, todas ellas

integrantes de los ribosomas. Estas cadenas de ARNr sufren una serie de cambios postranscripcionales que implican pérdida de nucleótidos, metilaciones de otros y unión a proteínas; finalmente se originarán las dos partículas ribonucleoproteicas 40s y 60s, constituyentes de los ribosomas eucarióticos. Conforme se van sintetizando las fibrillas de ARN45s se van uniendo a proteínas y acaban desprendiéndose del ADN molde; éstas van formando partículas ribonucleoproteicas que constituyen la porción del nucleolo<sup>3</sup>.

No se sintetizan proteínas en el nucleolo ni en parte alguna del núcleo. Los ribosomas maduros están ausentes en este último, de modo que ningún mecanismo está disponible para la síntesis de proteínas nucleares. Todas éstas se producen en los ribosomas citoplasmáticos y deben ser transportadas a través de la envoltura nuclear al núcleo. Las proteínas importadas pasan a formar parte de cromosomas, subunidades ribosómicas, lámina nuclear y otras estructuras. O realizan una función catalítica o reguladora en la replicación y transcripción del ADN<sup>2</sup>.

Durante la división nuclear por mitosis o meiosis, los nucleolos desaparecen en el momento de la metafase y reaparecen durante la reorganización nuclear en la telofase. Toda síntesis de macromoléculas se detiene, incluyendo la de ARN, cuando los cromosomas se condensan y los nucleolos desaparecen de las células en división. Cuando empieza la telofase, en la NOR de cada cromosoma se forman nucleolos pequeños que crecen y se fusionan para formar uno o más nucleolos grandes. La síntesis macromolecular se reanuda y continúa en toda la interfase; es decir, en las fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> del ciclo celular<sup>2</sup>.

Como hemos mencionado, las regiones de organizadores nucleolares tienen un papel importante en la transcripción de ARNr.

## Técnica de AgNORs

Hemos descrito que las NORs, representan regiones de ADN que se encuentran transcribiendo activamente ARN ribosomal, para que más adelante se formen los ribosomas, quienes se encargaran de realizar la síntesis de proteínas en el citoplasma celular<sup>5</sup>.

Pues bien, las NORs están asociadas con proteínas no histónicas argirofílicas que interactúan específicamente con sales de plata, por lo tanto son visualizadas mediante el uso de técnicas que utilicen una tinción de plata, dicha técnica se conoce como técnica AgNOR. Dos proteínas argirofílicas están relacionadas con la transcripción de ARNr y su procesamiento: la nucleolina y la nucleofosmina; están asociadas con los AgNORs interfásicos y son responsables de su afinidad a los métodos de tinción con plata, así, permite a los AgNORs interfásicos ser visualizados a la luz del microscopio en las preparaciones histopatológicas de rutina<sup>16</sup>.

Estas regiones nucleolares teñidas con plata coloidal se observan como puntos negros en el área física del nucleolo. Estos organizadores son estimados de acuerdo a su forma, número y tamaño<sup>8</sup>. En la figura 4 se observan las Regiones de Organizadores Nucleolares teñidas con plata.



Fig. 4. Regiones de Organizadores Nucleolares (Tomado de: L. E. B. Rosa, M. M. M. Jaeger, R. G. Jaeger: *Morphometric Study of Nucleolar Organizer Regions in Ameloblastoma and Basal Cell Carcinoma*)

Esta técnica se ha utilizado en biopsia y en citología; en biopsia, las muestras de tejido son fijadas con una solución de formalina neutra al 10% durante 24 hrs., después se incluyen en parafina, y son cortadas a 4  $\mu\text{m}$  de espesor para posteriormente ser tratadas con tinción de plata<sup>23</sup>; o bien, las muestras pueden ser fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% por 12 hrs. en parafina y realizar cortes transversales de 2  $\mu\text{m}$  de espesor<sup>22</sup>. En citología las muestras son obtenidas a través del raspado firme de la mucosa con un abatelenguas y las células descamadas obtenidas son transferidas a portaobjetos y posteriormente fijadas en etanol al 95% por 12 horas para después ser teñidas con plata<sup>5</sup>.

La técnica de AgNOR no ha sido ampliamente utilizada en muestras citológicas. Sujathan y cols. usaron esta técnica aplicada a preparaciones citológicas para distinguir células mesoteliales reactivas de células malignas en efusiones serosas; estos autores demostraron que las células malignas presentaban irregularidades de forma y tamaño de los AgNORs, mientras que las células benignas presentaban un número comparativamente menor y una forma

regular. Cardilho también mostró una correlación entre los AgNORs en células benignas y malignas por medio de un estudio de los mismos en aspirado citológico de glándulas salivales. Por lo que se llegó a la conclusión de que en las muestras citológicas el análisis de los AgNORs es más preciso porque puede ser evaluado mejor el núcleo entero que sólo una parte de él, tal como ocurre en las secciones de tejidos<sup>5</sup>.

El primer avance en la demostración de los AgNORs fue descrito por Howell y Black, quienes introdujeron el uso de una solución hecha de gelatina y ácido fórmico, la técnica envuelve un sólo paso a 70°C durante 2 minutos. A partir de ese momento se han realizado muchos trabajos para mejorar la sensibilidad y mejorar la precipitación de plata no específica, la cual es la mayor desventaja en las impregnaciones con plata. Ploton y cols. mejoraron el método al emplear temperaturas que van de los 20° a los 50°C y tiempos variables de 14 a 20 minutos de tinción de plata, y la fijación con una solución de tiosulfato de sodio después de la tinción. Estos autores recomiendan el uso meticuloso de cristal limpio y agua altamente pura. Además, Cromie y cols. modificaron la técnica de Howell y Black al introducir una preincubación con glicina para reducir los depósitos no específicos y las muestras fijadas en formalina, y el tratamiento con ácido nítrico seguido de la tinción de plata para remover los depósitos no específicos que se puedan presentar. Howat y colaboradores emplearon una solución de plata filtrada a través de un filtro miliporo para remover detritus que pudieran conducir a una significativa precipitación no específica. Ófner y cols. Introdujeron el pretratamiento de las secciones de tejido con un amortiguador de citrato a pH 6.0 en un autoclave a 120° durante 20 min. Juntas empleó el mismo amortiguador en un horno de microondas a más baja temperatura. Li y cols. Emplearon una mezcla de hexacianoferrato de potasio y tiosulfato de sodio (solución de Farmer) para remover el exceso de plata metálica; estos autores usaron diferentes tipos de gelatina e irradiaron las muestras con microondas para optimizar la especificidad del método<sup>11</sup>.

Orrea<sup>11</sup> sugiere que la técnica de AgNORs debe tener un pretratamiento de las muestras a observar con ácido nítrico al 7% debido a que este procedimiento muestra la imagen de los AgNORs con más contraste, es decir, se observan más oscuros los puntos negros en el fondo amarillo, también afirma que el gradiente de los colores de fondo permite una fácil discriminación de las estructuras nucleolares, nucleares y citoplasmáticas.

Recientemente Bernard Jaquet<sup>10</sup> y cols. realizaron un estudio en el cual mencionan que existen dos métodos para la realización del conteo de AgNORs. El primero consiste en el conteo del número de puntos teñidos de plata por núcleo, el cual correspondería a la técnica aplicada por Ploton (conteo por análisis de imagen). El segundo consiste en realizar una medida automática o semiautomática del área ocupada por las estructuras teñidas con plata por núcleo, esto se hace con ayuda de un análisis de imagen asistido por computadora, pero con citometría de flujo; sostienen que el conteo de AgNORs por medio de la citometría de flujo es ventajosa sobre el conteo por análisis de imagen debido a que la medición por citometría de flujo consume menos tiempo para la medición de AgNORs, además de esta justificación afirma que la medición por análisis de imagen está limitada a una pequeña fracción de tumores.

## **Relación de las NORs con el cáncer**

Cambios morfológicos del nucleolo son frecuentes en células malignas, y muchos patólogos consideran las alteraciones nucleolares de tamaño y forma como representantes de un importante criterio al momento de diagnosticar malignidad. El nucleolo es con frecuencia descrito más grande y de tamaño irregular en procesos malignos<sup>13</sup>.

La cantidad de proteínas de una región de organizador nucleolar es utilizada actualmente como un marcador de actividad nucleolar y actividad celular<sup>8</sup>. La técnica de AgNOR ha demostrado una correlación entre el número de AgNORs por núcleo y la actividad proliferativa en una gran variedad de entidades patológicas.

Las proteínas argirofílicas asociadas con las NORs pueden ser consideradas como un marcador de la actividad transcripcional del ADN o del potencial transcripcional del mismo, y están relacionados a la actividad proliferativa de la célula. El conteo de AgNORs está asociado con el pronóstico en muchas neoplasias humanas<sup>7</sup>, ya que en el caso de las neoplasias malignas se ha reportado que la cantidad de regiones de organizadores nucleolares se relaciona con su grado de malignidad. Por lo tanto, los niveles elevados de AgNORs indicarán un pronóstico malo, con un índice alto de proliferación. Para entender la relación entre la cantidad de proteínas de organizadores nucleolares y la duración del ciclo celular, las proteínas de regiones de organizadores nucleolares deben ser identificadas y seguidas a lo largo del ciclo celular<sup>8</sup>.

En un estudio realizado por la doctora Sampaio y cols.<sup>5</sup>, se encontró que hay una fuerte relación entre tabaquismo y desarrollo de cáncer bucal, en este caso en particular de carcinoma epidermoide. Dicho estudio ha utilizado la técnica de AgNOR, la cual como ya se explicó con anterioridad sugiere el análisis cuantitativo de AgNORs para estimar la actividad proliferativa de las células. Los resultados de este estudio demostraron una mayor proliferación celular en la mucosa bucal clínicamente normal de pacientes fumadores en comparación con la de los no fumadores. Cabe mencionar que en un estudio realizado por Moreno-López y cols.<sup>24</sup> quedó demostrado que el cepillado diario de los dientes actúa como un factor protector contra el riesgo de cáncer bucal.

## **Tabaquismo y cáncer bucal**

El tabaquismo es la principal causa de enfermedad, incapacidad y muerte prematura evitables en los Estados Unidos. Sin embargo, cada año más de un millón de niños y adolescentes norteamericanos comienzan a fumar y la mayoría de los fumadores establecidos tienen gran dificultad para abandonar el hábito<sup>17</sup>. En China, cerca del 70 % de los hombres y 8% de las mujeres de 20 años en adelante fuman cigarrillos, la prevalencia es alta en las áreas rurales<sup>21</sup>.

Los efectos adictivos de la nicotina son la causa de gran parte de este dilema sanitario, personal y público, persistente. Para un tratamiento eficaz de los pacientes, es esencial reconocer que el consumo de tabaco es una adicción y que la nicotina es la droga adictiva. En el humo de los cigarrillos se han identificado más de 4000 sustancias, que incluyen algunas que son farmacológicamente activas, antigénicas, citotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas; estos efectos biológicos variados brindan un contexto para comprender las consecuencias adversas del tabaquismo. Un fumador de un paquete diario realiza más de 70 000 inhalaciones al año y las membranas de la boca, nariz, faringe y árbol traqueobronquial resultan expuestas de forma repetida al humo del tabaco. Algunos componentes actúan directamente sobre las membranas, mientras que otros son absorbidos a la sangre o se disuelven en la saliva y se degluten. Las respuestas del sistema de órganos y tejidos a la inhalación de humo de cigarrillo son múltiples y complejas. Los datos de estudios prospectivos de varios países muestran que los varones fumadores tienen una tasa de mortalidad global un 70% mayor que los no fumadores. Este efecto sobre la mortalidad es proporcionalmente más acusado en los grupos más jóvenes. La mortalidad de las mujeres fumadoras es algo menor que la de los varones que fuman, pero está aumentando. Existe una clara relación dosis-respuesta entre el tabaquismo y el aumento de la mortalidad, medida por la edad en que se comienza a fumar, número de años de consumo de cigarrillos e intensidad de la inhalación. El dejar

de fumar está asociado con un descenso en la tasa de mortalidad. Los riesgos individuales por el tabaquismo varían mucho de un paciente a otro. Los factores que influyen en estos riesgos son la duración, intensidad y tipo de humo al que se exponen; susceptibilidad mediada genéticamente; exposición profesional y ambiental; uso de medicamentos; y factores de riesgo y enfermedades coexistentes<sup>17</sup>.

El tabaquismo es la causa aislada más importante de mortalidad por cáncer en Estados Unidos, representando 30% de todas las muertes por cáncer. A pesar de la relación comprobada de causa y efecto entre tabaquismo y el cáncer de pulmón, siguen muriendo más norteamericanos por este cáncer que por otros tumores. Se calcula que en 1991 se produjeron 143 000 muertes por cáncer de pulmón en Estados Unidos; el 85% de estas muertes se pueden atribuir al tabaquismo. El riesgo de contraer cáncer de pulmón está cuantitativamente relacionado con la exposición al humo de cigarrillos. Los hombres que fuman una cajetilla diaria aumentan el riesgo diez veces más que los no fumadores; los hombres que fuman dos cajetillas diarias pueden aumentar su riesgo 25 veces más que los no fumadores. Los trabajadores de asbesto que fuman cigarrillos tienen muchas posibilidades de contraer cáncer de pulmón. El consumo de cigarrillos en mujeres ha aumentado muy rápidamente en Estados Unidos durante los últimos 50 años, y la mortalidad por cáncer de pulmón está aumentando más rápidamente en mujeres que en hombres. El cáncer de pulmón ha pasado a ser la causa principal de muerte por cáncer entre las mujeres norteamericanas. El tabaquismo causa cáncer de laringe, boca, vejiga y esófago en hombres y mujeres. Además, es un factor que contribuye considerablemente al desarrollo de cáncer de riñón, hígado y páncreas; también se ha asociado con cáncer de estómago y cervico uterino y con leucemia mielocítica<sup>17</sup>.

Según Herranz González-Botas<sup>9</sup>, el cáncer de cavidad bucal corresponde al 30 % del total de los carcinomas de cabeza y cuello. El 95 % de las lesiones

corresponde a carcinomas epidermoides. El carcinoma de epidermoide bucal es el responsable del 2 al 4% de las enfermedades malignas en Estados Unidos y en la mayoría de los países occidentales, aunque representa hasta el 50% de las mismas en la India. Globalmente, el cáncer bucal es el cuarto de incidencia en varones y el sexto en mujeres<sup>17</sup>. En casi todos los casos es fácil practicar una biopsia para identificación temprana, pero casi la mitad de los pacientes muere antes de 5 años y es posible que ya presenten metástasis cuando la lesión primaria se descubre<sup>18</sup>. La enfermedad guarda relación con la edad, apareciendo en personas mayores de 40 años y aumentando su incidencia con la edad<sup>9, 17</sup>. El cáncer de labio todavía constituye la localización bucal más frecuente, seguido por el de lengua, piso de boca y otras localizaciones intraorales<sup>17</sup>.

Aproximadamente el 90% de los pacientes con carcinoma de cavidad bucal son fumadores. El riesgo de padecer un cáncer de cavidad bucal en un fumador es 6 veces superior al de un no fumador. El abuso combinado de alcohol y tabaco ejerce un efecto multiplicador del riesgo a desarrollar un cáncer de cavidad bucal. 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<sup>9</sup>.

En un estudio realizado por Zheng y cols.<sup>21</sup> en Beijing, China; observaron que el fumar tabaco está asociado con el riesgo de padecer cáncer de lengua en esta población. Afirman que los fumadores acarrean el riesgo de padecer cáncer de lengua 2.2 veces más que el riesgo de los que nunca han fumado, y que los fumadores actuales tienen el riesgo de 2.7 veces con respecto a quienes nunca han fumado. El dejar de fumar sugiere una reducción en dicho riesgo.

La incidencia en el sexo femenino va en aumento debido a la mayor incidencia de mujeres fumadoras<sup>9</sup>. La proporción hombre/mujer es de 3:1, aunque la incidencia de cáncer de labio y de boca está descendiendo en los varones de raza blanca y aumentando en los varones de raza negra y en las mujeres. No

obstante, tanto la incidencia global como el porcentaje de fallecimientos son bastante estables. El cáncer de labio ha mostrado una disminución significativa de su incidencia en los últimos años, probablemente debido a cambios en la costumbre de fumadores en pipa, mientras que el cáncer de lengua se ha hecho más frecuente<sup>17</sup>.

Las lesiones iniciales aparecen como un engrosamiento circunscrito en la mucosa, de color blanquecino o gris perla muy parecido a las placas leucoplásicas. A continuación pueden crecer de manera exofítica para producir lesiones nodulares y con el tiempo fungoides fáciles de visualizar y palpar o pueden asumir un patrón endofítico invasivo con necrosis central. Los carcinomas epidermoides casi siempre son tumores queratinizantes moderadamente o bien diferenciados. Antes de que las lesiones avancen puede identificarse en los márgenes atipia epitelial, displasia o carcinoma *in situ*, lo que sugiere un origen en una lesión tipo leucoplasia o eritroplasia. La propagación a ganglios regionales en el momento del diagnóstico inicial se observa sólo raras veces con cáncer de labio, en casi 50% de los casos de cáncer de lengua y en más de 60% de los cánceres del piso de la boca. La propagación a tejidos u órganos más distantes en tórax o abdomen es menos común que una amplia propagación regional. Estas lesiones pueden causar dolor local o dificultad a la masticación, pero muchas son hasta cierto punto asintomáticas y por tanto (muy familiar a la exploración de la lengua) ignoradas. Resulta trágico que en un número elevado de casos no se descubren hasta que son incurables<sup>18</sup>.

En su etiología se encuentra el tabaco fumado en pipas, cigarros y cigarrillos, así como el mascado o "chupado". En el efecto del tabaco fumado en pipa sobre el cáncer de labio pueden influir también el calor y otros irritantes. Otros factores son el alcohol, la deficiencia de hierro (síndrome de Plummer-Vinson) y las deficiencias vitamínicas. Las pruebas que relacionan las lesiones sifilíticas bucales y la candidiasis bucal con el cáncer de boca son circunstanciales, aunque

existe un número creciente de datos indicativo de la influencia del virus del herpes simple y del virus del papiloma humano. No existen pruebas de que la irritación provocada por dientes afilados o por prótesis dentales ocasione cáncer bucal<sup>17</sup>.

## **Planteamiento del problema**

El tabaquismo es un problema de salud pública a nivel mundial con repercusiones en la salud general y bucal; está relacionado con algunos tipos de neoplasias de interés para el Cirujano Dentista, tal es el caso del carcinoma epidermoide con localización en labio y lengua, la displasia epitelial bucal y no de menor importancia la leucoplasia.

El problema al que se enfrentan hoy en día los científicos en relación al cáncer, es principalmente la incapacidad de predecir el momento exacto en el cual las células se vuelven malignas. Hoy en día se conocen muchos de los mecanismos que desencadenan el cáncer, al igual que muchos de los factores de riesgo y predisposición al mismo, lo cual es importante para la prevención y tratamiento de la enfermedad tumoral, sin embargo, cuando esta enfermedad se detecta en la mayor parte de los casos es porque se encuentra en un estadio avanzado.

Es menester por lo tanto encontrar una manera eficaz y sencilla para descubrir cambios celulares que nos hicieran sospechar de malignidad y de esta manera poder tomar medidas preventivas o interceptivas adecuadas.

## **Justificación**

El conteo de AgNORs en muestras citológicas es fácil de realizar, es barato y confiable, por lo cual se puede considerar este tipo de estudio una herramienta para determinar cambios tempranos de la mucosa bucal en pacientes fumadores y

de esta forma interceptar el problema y aplicar tratamientos menos radicales e invasivos que serán por ende más eficaces y lo más importante, que salvarán la vida del paciente.

Es una realidad que el tabaquismo es una adicción que persiste debido a la pobre información acerca de los problemas de salud que acarrea el tabaco destinada al público en general, y es difícil por el momento que este problema de comunicación sea resuelto, por lo tanto es obligación del profesional de la salud hacer énfasis sobre las consecuencias en el deterioro de la salud de los pacientes fumadores e impulsarlos a dejar este pernicioso hábito tomando las medidas necesarias y concientizar a la población en general sobre los efectos nocivos del tabaco.

## **Hipótesis**

El número de AgNORs es mayor en las células de descamación de la mucosa bucal de fumadores crónicos que los reportados en la literatura en condiciones normales.

## **Objetivo general**

Demostrar mediante la técnica de AgNORs que el número de NORs es mayor en las células de descamación de fumadores crónicos.

## **Objetivos específicos**

Analizar las características de las células de descamación mediante el estudio citológico.

Determinar los cambios en el número de AgNORs de las células descamadas de la mucosa bucal de pacientes fumadores crónicos.

Conocer la utilidad de la técnica de AgNORs en citología exfoliativa como una herramienta para diferenciar cambios sugestivos de malignidad de acuerdo al número de AgNORs contabilizados.

## **Metodología**

### **Diseño de la muestra**

Para este estudio se seleccionaron 27 casos de pacientes fumadores crónicos que acudieron a la Clínica de Tabaquismo de la Facultad de Medicina, las muestras tomadas fueron en número de dos por cada paciente; una de la mucosa yugal y otra de la lengua.

### **Tipo de estudio**

Estudio retrospectivo transversal

### **Población de estudio**

Pacientes fumadores crónicos masculinos y femeninos.

### **Criterios de inclusión**

Para el estudio realizado los criterios de aceptación incluyeron pacientes fumadores crónicos que hubieran fumado más de una cajetilla diaria durante por lo menos 20 años, el sexo no fue tomado en cuenta como criterio de aceptación para

la toma de muestras. Estos pacientes acudieron a consulta en la Clínica de Tabaquismo de la Facultad de Medicina.

### **Criterios de exclusión**

Los criterios de exclusión para el estudio fueron pacientes que fumaban menos de una cajetilla diaria o que habían fumado durante un tiempo inferior a los 20 años, al igual que pacientes que han dejado de fumar.

### **Métodos**

Se seleccionaron 27 casos de fumadores crónicos que asistieron a la Clínica de Tabaquismo de la Facultad de Medicina para tomarles muestras de la cavidad bucal, a cada paciente se le tomó una muestra de la mucosa yugal y una de la mucosa de la lengua para ser teñidas mediante la técnica de Papanicolau, de estos 27 casos fueron seleccionados 10 para ser estudiados con la técnica de AgNORs.

Antes de la toma de las muestras, se les pidió a los pacientes que realizaran enjuagues con un colutorio con la finalidad de eliminar restos de alimento y exceso de saliva. Las muestras de cada paciente fueron recolectadas directamente de la mucosa yugal y de la lengua mediante el raspado de la misma con un abatelenguas. Las muestras fueron colocadas en un portaobjetos y fijadas con spray para citología para ser teñidas por la técnica de Papanicolau y la tinción de plata para posteriormente poder ser vistas al microscopio y realizar el análisis cualitativo a través de la observación de las muestras teñidas con el método de Papanicolau y el análisis cuantitativo mediante la determinación de AgNORs a través del conteo en microscopio de campo claro a 100x.

La técnica de Papanicolau es el método estandar para el estudio citológico de las muestras. En dicha técnica el núcleo es teñido con hematoxilina de Harris, la cuál parece dar una tinción más precisa a las células de descamación; después de la tinción con hematoxilina, las muestras son teñidas con OG 6, esta solución contiene tinta amarillo anaranjado G la cual tiñe queratina; la etapa final es en la cual el citoplasma de las células son teñidas con una solución que puede variar de EA 36 a EA 50, estas soluciones de EA contienen eosina, verde claro y café de Bismarck<sup>29</sup>. Las laminillas fueron teñidas de acuerdo a la siguiente fórmula: Hematoxilina de Harris: OG 6; 0.15 gr. de anaranjado G, 0.05 gr. de Ácido fosfotungstico, 100 ml. de etanol al 95%. EA 50; 45 ml. de verde claro SF al 0.1% en etanol al 95%, 45 ml. de eosina ws amarilla al 0.5 % en etanol al 95%, 45 ml. de café de Bismarck al 0.5% en etanol al 95%, 0.2 gr. de Ácido fosfotungstico, 1 gota de carbonato de litio acuoso saturado<sup>29</sup>.

Con este método pudimos observar en las laminillas células de descamación, colonias de microorganismos, así como corroborar la presencia de infiltrado inflamatorio.

Se seleccionaron diez casos para ser teñidos y estudiados con la técnica de AgNOR de acuerdo a la técnica de Ploton con la siguiente fórmula: 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.

Se desparafinaron e hidrataron las laminillas en agua destilada utilizando:

- Xilol 1 durante 10 min.
- Xilol 2 durante 10 min.
- Alcohol Xilol, 10 a 15 baños.
- Alcohol 100% (1), 10 a 15 baños.

-Alcohol 100% (2), 10 a 15 baños.

-Alcohol 96° (1), 10 a 15 baños.

-Alcohol 96° (2), 10 a 15 baños.

Se colocaron las laminillas en vasos de Coplin y se hidrataron durante un minuto; mientras 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 esto con dos partes de Nitrato de Plata acuoso al 50%, la cual fue la solución de trabajo (la solución de trabajo fue preparada justo antes de teñir).

La solución de trabajo se manejó en un cuarto oscuro a una temperatura de 20 a 25°C; se colocó la solución de trabajo en vasos de Coplin y se sumergieron las laminillas dejándose durante 45 min.

Después se lavaron con agua bidestilada y se deshidratan en:

-Alcohol 96° (2), 10 a 15 baños.

-Alcohol 96° (1), 10 a 15 baños.

-Alcohol 100% (2), 10 a 15 baños.

-Alcohol 100% (1), 10 a 15 baños.

-Alcohol Xilol, 10 a 15 baños.

-Xilol 1, 10 a 15 baños.

-Xilol 2.

Se procedió a realizar el conteo de NORs 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 AgNORs por célula de cada caso<sup>30</sup>.

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

## **Resultados**

Como ya fue mencionado anteriormente, fueron seleccionados 27 casos de los cuales se tomaron muestras de la mucosa yugal y de la mucosa de la lengua; esto nos dio un total de 54 laminillas para ser observadas por medio de la Técnica de Papanicolau y de los 10 casos observados con la técnica de AgNORs obtuvimos 20 laminillas para realizar la determinación de AgNORs.

En la revisión microscópica de las citologías teñidas con Papanicolau, se observaron abundantes células de descamación en todos los casos de mucosa de lengua excepto en uno, en el cual fueron escasas. Para todos los casos de la mucosa yugal observamos células de descamación escasas; en la figura 5 observamos un ejemplo de las células de descamación vista con un objetivo 40x. En 7 casos de mucosa de lengua fue observado pleomorfismo nuclear al igual que en 5 casos de mucosa yugal; tal como se ejemplifica en la figura 6.

En las tablas 1, 2 y 3 se encuentran los hallazgos de la observación de las laminillas teñidas por la técnica de Papanicolau, así como su representación estadística puede ser vista en las gráficas 1, 2 y 3.

Tabla 1  
Células de descamación en el total de los casos

<b>Células de descamación</b>	<b>Lengua (# casos)</b>	<b>Mucosa yugal (# casos)</b>
Abundantes y normales	19	3
Escasas y normales	1	19
Pleomorfismo nuclear	7	5

Fuente directa

Tabla 2  
Infiltrado inflamatorio en los casos estudiados

<b>Tipo celular</b>	<b>Lengua (# casos)</b>	<b>Mucosa yugal (# casos)</b>
Neutrófilos	7	10
Linfocitos	5	7
Macrófagos	0	1
Mixto	13	8
Escasos	5	5
No hay	1	3

Fuente directa

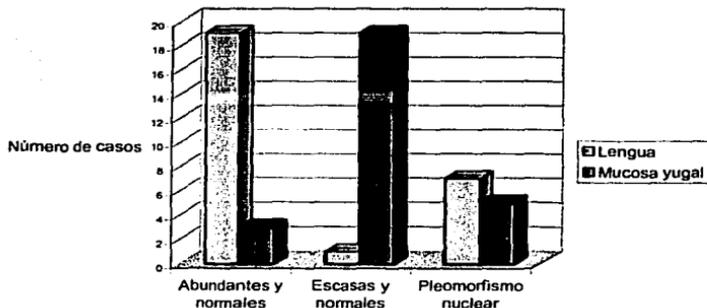
Tabla 3  
Colonias de microorganismos en las muestras obtenidas

Tipo de microorganismo	Lengua (# casos)	Mucosa yugal (# casos)
Cocos en racimo	27	4
Cocos aislados	4	14
Cocos abundantes	25	2
Cocos escasos	2	25
Bacilos	4	0

Fuente directa

Gráfica 1

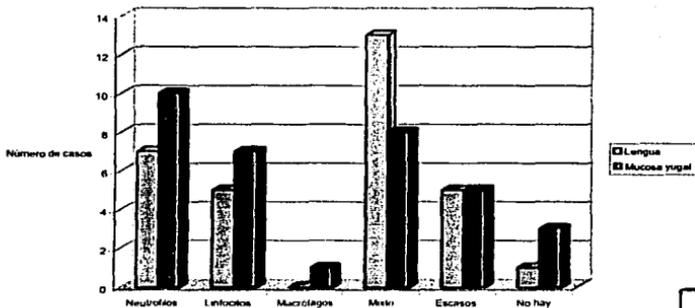
Células de descamación en el total de los casos



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

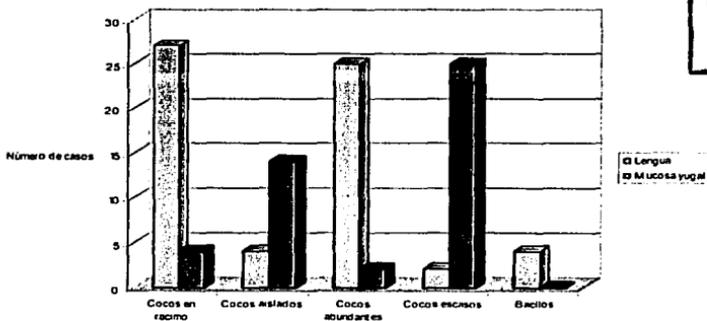
Gráfica 2

Infiltrado inflamatorio en los casos estudiados



Gráfica 3

Colonias de microorganismos en las muestras obtenidas



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Fig.5. Células de descamación de la lengua. Papanicolaou 400x.



Fig.6. Pleomorfismo nuclear en las células de descamación. Papanicolaou 1000x.

En la figura 7 podemos observar el infiltrado inflamatorio, el cual fue localizado en casi todos los casos, principalmente de neutrofilos, sólo un caso presentó áreas de macrófagos. Las colonias de microorganismos pueden ser observadas en las figuras 8 y 9; estuvieron presentes prácticamente en todos los

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

casos observados, principalmente fueron localizados cocos abundantes en racimo, en cadena, algunos casos presentaron diplococos, y otros pocos casos presentaron bacilos.

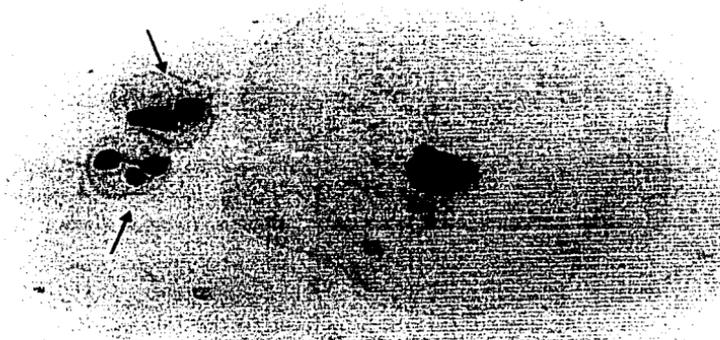


Fig.7. Infiltrado inflamatorio. Papanicolau 1000x.



Fig. 8 Colonias de microorganismos, cocos en racimo. Papanicolau 1000x

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Fig. 9. Colonias de microorganismos, bacilos. Papanicolau 1000x.

Los AgNORs fueron localizados buscando puntos negros dentro del núcleo, estos fueron de diferente tamaño y número, hubo algunos casos donde únicamente encontramos 1 ó 2 y otros en donde encontramos hasta 11. En este estudio el número de AgNORs varió desde un promedio de 3 hasta 7.5 por célula para los casos observados en las muestras de mucosa yugal y de 2.1 hasta 4.3 para los casos de las muestras de lengua. En la tabla 4 podemos observar el número de células observadas, el número de AgNORs contabilizados y el promedio de AgNORs por célula de cada caso para las muestras observadas de mucosa yugal, así como para las muestras observadas de mucosa de la lengua en la tabla 5.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4  
Promedio de AgNORs en mucosa yugal

Caso	# Células	# AgNORs	Promedio	Desviación
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

Tabla 5  
Promedio de AgNORs en cara dorsal de la lengua

Caso	# Células	# AgNORs	Promedio	Desviación
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	-1.43
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

En las figuras 10, 11, 12 y 13 podemos observar algunas muestras de células de descamación en las cuales se identifican los AgNORs como puntos negros, nótese la variabilidad en cuanto al tamaño y número.



Fig. 10. Células de descamación que presentan 2 y 3 AgNORs.  
Técnica de AgNORs 1000x .



Fig. 11. Células de descamación que presentan 2 AgNORs.  
Técnica de AgNORs 1000x.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Fig. 12. Células de descamación que presentan 3, 4 y 5 AgNORs y pleomorfismo nuclear.  
Técnica de AgNORs 1000x.



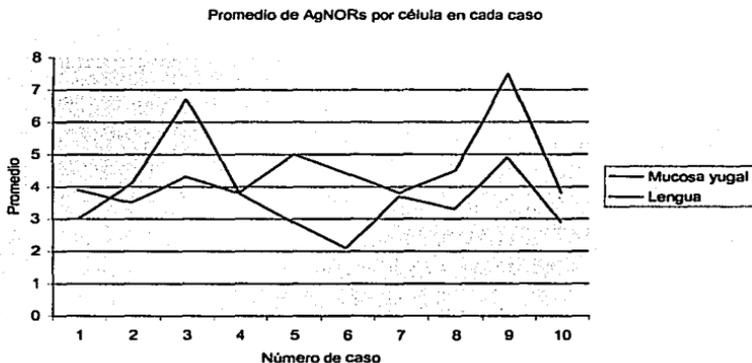
Fig. 13. Célula de descamación que presenta 6 AgNORs.  
Técnica de AgNORs 1000x.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En este estudio el promedio de AgNORs por núcleo en las muestras de mucosa yugal fue estadísticamente mayor en comparación al promedio de AgNORs por núcleo de muestras de lengua.

En la gráfica 4 podemos observar la distribución que tuvieron los AgNORs en cada caso estudiado para las muestras de mucosa yugal y mucosa de la lengua.

Gráfica 4



Estadísticamente el análisis de relaciones de Pearson demostró un margen de error de .20% de acuerdo a las desviaciones con respecto a las medias de los promedios del número de AgNORs por célula para los casos de mucosa yugal y de lengua. Este margen de error ha sido debido al método de conteo el cual no ha contado con los modernos software de computadora que ahora existen y también al incrementado número de precipitados de plata en algunos casos pudo dar pie a confusión a la hora del conteo de los AgNORs.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Discusión

La determinación de AgNORs ha sido utilizada en diversos estudios para distinguir entre lesiones malignas y benignas así como ha sido una herramienta importante para el diagnóstico de algunas patologías tumorales, ya que como ha sido bien presentado en diversos estudios realizados, el número de AgNORs está aumentado en las células con alta actividad proliferativa. Muchos autores han relacionado el conteo principal de AgNORs con el comportamiento de la lesión<sup>15</sup>.

Prácticamente el método de tinción de plata para la identificación de NORs ha sido introducido recientemente en patología. La citología exfoliativa no ha sido frecuentemente utilizada para evaluar los efectos del cigarro en los fumadores en la mucosa bucal normal; por consiguiente, el presente estudio se ha realizado para observar los cambios celulares que son provocados por el tabaco en la mucosa bucal de fumadores crónicos.

La determinación de AgNORs ha sido utilizada en patología de cabeza y cuello para estudiar principalmente casos de carcinoma basaloide escamoso<sup>31</sup>, ameloblastoma y carcinoma basal celular<sup>20</sup>.

La relación del cigarro y ciertos tipos de lesiones cancerosas y precancerosas, tales como la displasia epitelial<sup>27</sup> ha sido estudiada ampliamente con anterioridad. En un estudio realizado por Sampaio y cols.<sup>5</sup> se encontró una diferencia significativa en el número de AgNORs por núcleo de un grupo de pacientes fumadores en comparación al número de AgNORs por núcleo del grupo de pacientes no fumadores. Nosotros obtuvimos en pacientes fumadores que el número de AgNORs varió 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, se esperaba que el promedio mayor fuera en lengua.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se ha sugerido que el hábito de fumar es el principal factor en la aparición de cambios celulares, aunque también hay estudios que demuestran que hay una sinergia con el alcohol<sup>21</sup> y con una mala higiene. En un estudio realizado por Moreno y cols.<sup>24</sup> se encontró que el cepillado diario de los dientes es un factor protector para la aparición de cáncer bucal.

A pesar de esto, sigue siendo el tabaco el principal factor desencadenante de dichos cambios en la estructura de la célula.

Los cambios observados en el presente estudio fueron sobre todo en el número de AgNORs presentes en el núcleo.

Van Oijen y cols.<sup>26</sup> encontraron un incremento en el número de células proliferativas en el epitelio adyacente normal al epitelio del tumor, y esto está correlacionado con el uso del tabaco; aún aquellas personas que dejaron de fumar mostraron un incremento de células proliferativas en su epitelio.

Los resultados del presente estudio concuerdan con estudios precedentes al mismo acerca de que la cuantificación de AgNORs es importante para la demostración de actividad celular aumentada que en cualquier momento puede desencadenar procesos cancerosos o precancerosos.

En este estudio encontramos en su mayoría células con un elevado número de AgNORs, aunque se debe mencionar que en casi la totalidad de los casos no se observaron características celulares que presumieran algún proceso maligno, salvo los casos en los cuales se observó pleomorfismo nuclear. Lo importante para este estudio es que existe relación del tabaco con el aumento de actividad celular a través del incremento de las regiones de organizadores nucleolares contabilizadas.

¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡  
¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡  
¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡¡

Cabe señalar que en nuestro estudio encontramos un número más elevado en el número de AgNORS de las muestras de la mucosa yugal en comparación con el número de AgNORS por célula en la mucosa de lengua, lo que es poco común.

## **Conclusiones**

La técnica de AgNORS en citología exfoliativa ha demostrado ser una herramienta para la demostración de una mayor proliferación celular a través de los cambios celulares de la mucosa clínicamente sana de los pacientes fumadores crónicos.

Es recomendable realizar el conteo de AgNORS por análisis de imagen apoyado en técnicas de pretratamiento de las muestras para eliminar los precipitados de plata y microorganismos inherentes a la saliva y de esta manera obtener resultados más específicos. Y también es recomendable cuando sea posible realizar el conteo apoyándose en algún software para la obtención de resultados más fidedignos.

## Bibliografía

1. de Robertis E. D. P., Sáez F. A., de Robertis E. M. F.: **Biología Celular**. 9ª edición. "El ateneo" editorial, Argentina 1978 (229-233).
2. J. Avers, Charlotte: **Biología Celular**. 2ª edición. Grupo Editorial Iberoamérica, Estados Unidos 1991 (533-541).
3. Peinado H. M. A., Pedrosa R. J. A., Aranda H. F., Martínez M. M., Ríos G. A.: **Biología Celular**. 1ª edición. Publicaciones de la Universidad de Jaén, Jaén 1994 (201-240).
4. Lennhinger A.: **Principios de Bioquímica**. 2ª edición. Editorial Omega, España 1995.
5. de Castro S. H., Motta L. A., Santiago G. R., Alves M. R.: **AgNOR Count in Exfoliative Cytology of Normal Buccal Mucosa, Effect of Smoking**. Acta Cytologica 1999; Volume 43: 117-120
6. Vigneswaran N., Tilashalki K., Rodu B., Cole P.: **Tobacco Use and Cancer**. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontics 1995; Volume 80: 178-182.
7. Pich A., Chiarle A., Chiusa L., Ponti R., Geuna M., et al: **Long-term survival of thymoma patients by histologic pattern and proliferative activity**. The American Journal of Surgical Pathology 1995; 19 (8): 918-926
8. Teixeira G., Antonangelo L., Kowaski L., Saldiva, P., Ferraz A., Silva G.: **Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions staining is useful in predicting recurrence-free interval in oral tongue and floor of mouth**

- squamous cell carcinoma.** The American Journal of Surgery 1996; Vol. 172.
9. Herranz G. B. J.: **Diagnóstico precoz del cáncer de la cavidad oral:** [http://www.fisterra.com/guias2/cancer\\_oral.htm](http://www.fisterra.com/guias2/cancer_oral.htm)
10. Jaquet B., Canet V., Giroud F., Montmasson M. P., Brugal. G.: **Quantitation of AgNORs by Flow versus Image Cytometry.** The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2001 Volume 49 (4): 433-437.
11. Orrea SC, Tomasi VH, Schwint AE, Itoiz ME: **Modified silver staining of nucleolar organizer regions to improve the accuracy of image analysis.** Biotechnic & Histochemistry 2001, 76 (2): 67-73.
12. Costa ALL, Araújo NS, Pinto Jr. DS, Araújo VC: **PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma.** J. Oral Pathology & Medicine 1999; 28: 438-41.
13. Migaldi M., Criscuolo M., Zunarelli E., Lo Bianco L., Martinelli A. M., Barbolini G. : **p120 and AgNOR nucleolar protein expression. A comparison with nuclear proliferation markers in oral pathology.** Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics 1998; 85: 189-96.
14. Hamakawa H., Bao Y., Takarada M., Tanioka H.: **Histological effects and predictive biomarkers of TPP induction chemotherapy for oral carcinoma.** J. Oral Pathology & Medicine 1998; 27: 87-94.

- 15.do Carmo MAV, Silva EC: **Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumours (AOTs)**. J. Oral Pathology & Medicine 1998; 27: 153-6.
- 16.Derenzini M.: **The AgNORs**. Micron 2000; 31(2): 117-20. ABSTRACT.
- 17.Harrison: **Principios de medicina interna**; 13ª edición, McGraw-Hill Interamericana, 1994 (237-241; 2808-2811)
- 18.Kumar, Cotran, Robbins: **Patología Humana**; 6ª edición, McGraw-Hill Interamericana,1997 (516-517)
- 19.L. Lo Muzio, M. D. Minogna, S. Staibano, G. de Vico, G. Salvatore, et. al.: **Morphometric Study of Nucleolar Organiser Regions (AgNOR) in HPV-associated Precancerous Lesions and Microinvasive Carcinoma of the Oral Cavity**. Oral Oncology 1997, Volume 33 (4): 247-259.
- 20.L. E. B. Rosa, M. M. M. Jaeger, R. G. Jaeger: **Morphometric Study of Nucleolar Organiser Regions in Ameloblastoma and Basal Cell Carcinoma**. Oral Oncology 1997, Volume 33 (3): 209-214
- 21.Zheng T., Holford T., Chen Y., Jiang P., Zhang B., Boyle P.: **Risk of Tongue Cancer Associated with Tobacco Smoking and Alcohol Consumption, A case-control Study**. Oral Oncology 1997, Volume 33 (2): 82-85.
- 22.Hara T., Sato T., Mori S., Shirai H., Maruo Y., Minagi S.: **Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in mucosal epithelium under experimental denture bases in rats**. Journal of Oral Pathology and Medicine 2000; 29: 33-38.

TESIS CON 4  
FALLA DE ORIGEN

23. Yue L., Iwai M., Furuta I.: **Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in tongue squamous cell carcinomas.** Oral Oncology 1999; 35: 70-76.
24. Moreno-López L. A., Esparza-Gómez G. C., González-Navarro A., Cerero-Lapiedra R., González-Hernández M. J., Domínguez-Rojas V.: **Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain.** Oral Oncology 2000; 36: 170-174.
25. de Rosa I., Staibano S., Lo Muzio L., Delfino M., Lucariello A. et al: **Potentially malignant and malignant lesions of the lip. Role of silver staining nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen, p53, and c-myc in differentiation and prognosis.** Journal of Oral Pathology and Medicine 1999; 28: 252-258.
26. van Oijen M. G. C. T., Gilsing M. M. A., Rijkse G., Hordijk G. J., Slootweg P. J.: **Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and ex-smokers.** Oral Oncology 1998; 34: 297-303.
27. Jaber M. A., Porter S. R., Gilthorpe M. S., Bedi R., Scully.: **Risk factors for oral epithelial dysplasia- the role of smoking and alcohol.** Oral Oncology 1999; 35: 151-156.
28. Thiry M., Goessens G.: **The nucleolus during the cell cycle.** 1ª Edición. Ed. Chapman & Hall. Estados Unidos 1996. pp. 7, 108.
29. Bancroft J. D., et al.: **Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application.** Ed. Churchill. Livongstone: pp. 325, 326

30. Leyva E., Flores G., Barrera R., Aldape.: **Regiones de Organizadores Nucleolares y Examen por PCR de RNAr 18s en 19 casos de Carcinoma Epidermoide de Cavidad Bucal.** División de Estudios de Posgrado e Investigación 1998; 7: 17-25.
31. D. Coletta R., Cotrim P., Vargas, P. A., Villalba A., Pires F. R., et al: **Basaloid Squamous Carcinoma of the Oral Cavity : Report of 2 cases and study of AgNOR, PCNA, p53 and MMP expression.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontics 2001; 91: 563-9.

TESIS CON  
FECHA DE ORIGEN