

Expresión de los AgNORs en tejidos normales y patológicos

Carbajo-Pérez, Santiago.

Departamento de Anatomía e Histología Humanas.
Universidad de Salamanca.

1.-Introducción

Las Regiones Organizadoras del Nucleolo u Organizadores Nucleolares (NORs) son segmentos del ADN genómico que codifican para el ARN ribosómico (ARNr), responsable a su vez de la producción de proteínas en los ribosomas. Recientemente están adquiriendo popularidad entre investigadores y patólogos, porque suponen una ventana abierta hacia algunos de los procesos más íntimos de la fisiología celular, y son fáciles de identificar morfológicamente, tanto en células interfásicas como en preparaciones de cromosomas, debido a que ligadas a ellos existen unas proteínas argirófilas, demostrables en el laboratorio sin gran dificultad, denominadas genéricamente AgNORs.

Durante los últimos años han sido numerosas las publicaciones acerca de la posible aplicación, en histopatología y citopatología, del conteo de las partículas argirófilas identificables en el interior del núcleo de las células interfásicas. En casi todos los casos, los autores refieren la bondad de este procedimiento como asistente para discriminar entre procesos benignos y malignos, como índice pronóstico en la evaluación de neoplasias malignas, o como predictor de la actividad proliferativa. El objetivo buscado en el momento de escribir este capítulo es un acercamiento a la realidad de este tema, revisando someramente desde las bases bioquímicas hasta los últimos hallazgos y sugerencias en cuanto a interpretación de resultados, centrándonos en la célula interfásica, normal o patológica, pero sin entrar en posibles alteraciones numéricas de los cromosomas que, como ya comprenderemos al ir avanzando en el texto, podrán manifestarse como modificaciones en la expresión de los AgNORs.

2.-Nucleolo y Organizadores Nucleolares

Cada célula diploide contiene una copia de las instrucciones celulares hereditarias o genoma, residente en el ADN, que se duplica a lo largo del ciclo celular (fase S), para escindirse en dos nuevas unidades de genoma, una para cada una de las células hijas. Este es el hecho esencial del ciclo celular, pero además, la célula, para sobrevivir, y también para poder dividirse, necesita de un ciclo de crecimiento celular y preparación para la división. El crecimiento celular comienza tras la división celular y se prolonga hasta el comienzo de la siguiente división celular, denominándose clásicamente a este período interfase, que en una nomenclatura más actual sería la secuencia sucesiva de las fases G1, S y G2 del ciclo celular.

Durante todo este proceso, y de una manera continua a lo largo del ciclo celular, aunque un poco más intensamente cuando la célula es de mayor tamaño, se están sintetizando ARN y proteínas, entre los cuales está el ARN ribosómico (ARNr), un ARN estructural, responsable junto con casi un centenar de proteínas, de la constitución de un complejo multienzimático, el ribosoma, estructura esencial como soporte del mecanismo de síntesis proteica.

La “fabricación” del ribosoma tiene lugar en el nucleolo, una estructura dispersa en el interior del núcleo celular, en la cual se traducen los bucles de ADN (ADNr) donde asientan los genes que codifican el ARNr (45S), y posteriormente se liga el ARNr a proteínas. Esos bucles de ADN son los Organizadores Nucleolares, o Regiones Organizadores del Nucleolo (NORs), aunque por extensión se consideran NORs “todas aquellas estructuras que contienen genes ADNr asociados a la maquinaria necesaria para su transcripción” (Ploton y col., 1990).

En la interfase los cromosomas son filamentos muy extendidos que forman un entramado difuso en el interior del núcleo, la cromatina. De igual manera los Organizadores Nucleolares están también dispersos por el núcleo, en mayor o menor grado, según el número de nucleolos, pero con tendencia a agruparse, puesto que aunque las hebras de ADN estén dispersas, los bucles de las mismas que contienen los genes ADNr, tienden a concentrarse en el nucleolo (Underwood, 1992). Estos bucles de ADNr se corresponden con los centros fibrilares observados en los estudios de microscopía electrónica de transmisión. En esas zonas, los NORs adoptan, según una descripción muy plástica de Ploton y col. (1990), una estructura similar a un “collar de perlas” (Figura 1).

Cuando se estudia el material genético, es costumbre referirlo a su localización en un cromosoma o cromosomas determinados. Los NORs han sido localizados por hibridación “in situ” en las constricciones secundarias de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos -13, 14, 15, 21 y 22- (Morton y col., 1983). Los genes que codifican por el ARNr 5S se sitúan en el cromosoma 1. En estas constricciones secundarias el ADN es un filamento muy extendido (Hernández-Verdún y Derenzini, 1983), de manera que la estructura se mantiene gracias a la ayuda de un rico complejo proteico-enzimático asociado a los NORs, las NORAPs, que aparecen como gránulos a los lados de las estrangulaciones de la cromátide (Figura 2). Las NORAPs se corresponden morfológicamente, en

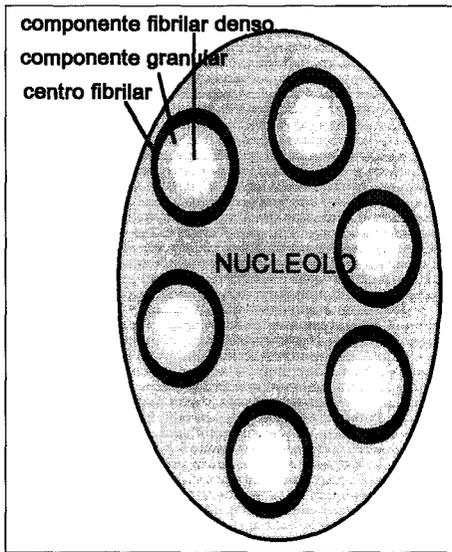


Fig. 1. Representación del nucleolo y los Organizadores Nucleolares sugerida por Plotón y col. (1990). La unión de los distintos NORs por una línea imaginaria tendría el aspecto de un "collar de perlas".

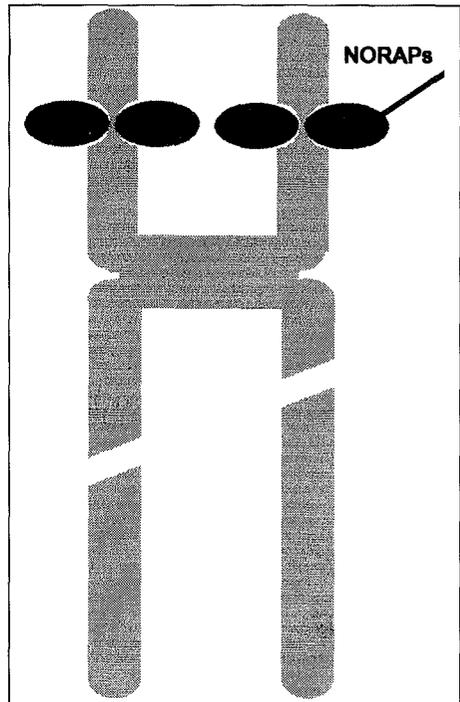


Fig. 2. Disposición de las NORAPs a los lados de las constricciones secundarias de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos

microscopía electrónica, con el componente fibrilar denso que rodea al centro fibrilar del nucleolo, y ahí es donde tiene lugar la transcripción de ARNr.

Como ya hemos mencionado en un párrafo precedente, en la constitución de las NORAPs participan múltiples proteínas, algunas de las cuales son detectables por su argirofilia, cualidad que permite su demostración, y consecuentemente su evaluación, tanto en preparaciones de cromosomas aislados (Howell y Black, 1980) como en secciones de tejido (Ploton y col., 1986) o en núcleos aislados de células interfásicas (Carbajo y col., 1991). El hecho de que la representación de las NORAPs sean masas argirófilas en el interior del núcleo celular o asociadas a algunos cromosomas, hace que genéricamente se denomine a estas formaciones AgNORs. Entre todas las NORAPs, la proteína con mayor responsabilidad en la argirofilia nuclear es la nucleolina o proteína C23 (Daskal y col., 1980).

3.-Demostración de los NORs

Los NORs pueden demostrarse por técnicas de hibridación "in situ", isotópicas o no isotópicas, utilizando ARNr marcado para detectar las secuencias com-

plementarias de ADNr; por procedimientos inmunohistoquímicos en los que se utilizan anticuerpos específicos contra las NORAPs; o por un método histoquímico basado en la argirofilia de algunas de las NORAPs.

Las técnicas de hibridación "in situ" son las más precisas, dado que marcan selectivamente la porción del genoma que constituye los NORs, y sus resultados son independientes de la actividad transcripcional, a diferencia de los otros dos procedimientos (inmunohistoquímico e histoquímico) que pueden sobreestimar la expresión de los NORs, dado que las áreas reactivas son más extensas cuando la transcripción es más activa (por estar demostrándose la expresión de las NORAPs, si hay un incremento de la actividad transcripcional del ADNr, existe también un incremento de las proteínas no históricas asociadas a ese proceso, por lo cual es mayor la extensión de la reacción).

La hibridación "in situ" y los estudios inmunohistoquímicos de las NORAPs son procedimientos costosos, tanto por los materiales utilizados como por el tiempo de realización. El procedimiento histoquímico, de bajo costo y corto tiempo de realización, es el que ha popularizado la demostración de los NORs en histopatología y citopatología, y a él dedicaremos las próximas páginas de este capítulo. Se han descrito numerosas variaciones del protocolo básico publicado por Ploton y col. (1986). La técnica por nosotros empleada, muy similar a la utilizada por Rüschoff y col. (1990) y Mingazzini y col. (1991), ha proporcionado imágenes nítidas de las partículas teñidas, con mínima tinción de fondo, permitiendo una identificación clara de las masas argirófilas. Las variaciones menores en la metodología son múltiples, por ello expondremos aquí, como muestra, el método que seguimos en nuestro laboratorio.

Si se desea aplicar la técnica sobre secciones de tejido congelado, tras el desecado de las secciones, éstas se fijan durante 5 minutos en etanol 70%, tras lo cual se procederá al lavado en agua corriente. Sobre secciones de tejido parafinado, se sigue el procedimiento habitual para la desparafinación e hidratación de la sección. La tinción de las proteínas argirófilas asociadas al nucleolo la realizamos de acuerdo con la rutina presentada a continuación:

- 1.-Lavado profuso en agua corriente.
- 2.-Lavado durante 15 minutos en agua destilada.
- 3.-Incubación (10 minutos a 37°C, en cámara de humedad, y en la oscuridad, en la solución de revelado preparada según Ploton y col. (1986): dos partes de solución A (gelatina al 1% -peso/volumen-en ácido fórmico) y una parte de solución B (solución acuosa de nitrato de plata al 50% -peso/volumen-).

Esta etapa del proceso es crítica, y de su adecuada ejecución depende en gran parte la calidad de la tinción. El problema más serio que puede presentarse es la concentración (por evaporación del agua) de la solución de plata. En este caso, aparecerá un precipitado inespecífico sobre la sección de tejido con intensidad variable que impedirá, o al menos entorpecerá, la evaluación de la reacción. Para solventar este problema, en nuestro labora-

torio procedemos al revelado con una pequeña cantidad de coloide (aproximadamente 100 μ l), aislando el área expuesta del coloide de plata del medio externo (ambiente de la cámara de humedad) con un cubreobjetos.

Esta artimaña, además de dificultar la evaporación de la solución de revelado (por disminución de la superficie susceptible de evaporación), facilita la observación de la muestra durante los últimos minutos del proceso de revelado, permitiendo la modificación del tiempo de reacción a fin de conseguir el contraste ideal.

4.-Lavado profuso en agua destilada.

5.-Inmersión durante 5 minutos en una solución acuosa de tiosulfato sódico (5% -peso/volumen-). Este paso puede evitarse, aunque es aconsejable su inclusión en la rutina dado que la solución aplicada tiene dos funciones importantes: eliminación de la plata no fijada específicamente a proteínas, y fijación de la reacción específica.

6.-Lavado en agua corriente.

7.-Tinción de contraste con verde metilo (solución al 1%, durante 3 a 5 minutos). Es posible la contratinción con cualquier otro colorante, no obstante, en nuestra experiencia, el más adecuado es el verde de metilo, pues es el que mejor contraste aporta, tanto para la observación directa al microscopio como en estudios instrumentales con técnicas de proceso digital de imagen.

8.-Deshidratación y montaje con DPX. (Hay que recordar que la tinción con verde de metilo desaparece cuando la deshidratación se hace progresivamente en alcoholes de concentración creciente, por ello debe hacerse directamente con alcohol etílico absoluto).

4.-Relación entre los AgNORs y el ciclo celular

Quizá las referencias bibliográficas a propósito de los AgNORs que llaman más la atención del investigador sean aquellas que tratan de relacionar su extensión o número, a fin de cuentas su expresión, con la proliferación celular. Como muestra de este hecho han de citarse artículos como los de Crocker y col. (1988), Hall y col. (1988) y Giri y col. (1989), entre otros muchos.

Durante el ciclo celular, como es de todos conocido, existen variaciones en la estructura nucleolar. De la misma forma, están descritas variaciones en el patrón de argirofilia de las estructuras nucleolares (Field y col. 1984).

La evolución histórica del estudio de la relación entre la expresión de los NORs y el ciclo celular refleja un cierto empirismo, ya que generalmente se ha llevado a cabo sobre muestras de tejidos patológicos en los que se apreciaba un incremento de la actividad proliferativa. En este sentido, se observó un aumento del número de AgNORs en tumores que presentaban una mayor fracción de fase

S (Crocker y col., 1988) o en casos de linfomas (Cibull y col., 1989) o lesiones malignas de mama (Giri y col., 1989) en los que es mayor la reactividad al suero Ki-67. Son referencias muy sugestivas en favor de la relación directa entre el incremento de la expresión de los NORs y el incremento de la actividad proliferativa, sin embargo es necesario hacer algunas consideraciones. Se trata de estudios realizados sobre tejidos tumorales, lo cual lleva a pensar que la expresión de los NORs puede estar influenciada por el grado de diferenciación o dediferenciación de las células tumorales. Además, se trata de aproximaciones estadísticas a la realidad, ya que no son las mismas células las utilizadas para la evaluación de los AgNORs que las empleadas para el estudio de la reactividad al suero Ki-67 o del contenido nuclear en ADN.

La literatura científica recoge múltiples fenómenos biológicos que pueden condicionar en alguna manera, o tal vez definir, la existencia de modificaciones en la expresión de los AgNORs. A lo largo de la última década se ha tratado de establecer una relación entre las modificaciones en el número de los AgNORs y diferentes aspectos de la actividad celular, bien relacionándolas con funciones metabólicas (De Capoa y col., 1985; Peebles y McNicol, 1989; Rodríguez, 1992) o con diferentes estadios de diferenciación (Smetana y Likovsky, 1984; Hernández, 1992; Carballo y col., 1993b). Asimismo se ha tratado de establecer una relación entre las modificaciones en el número de los AgNORs y la actividad proliferativa de la muestra objeto de estudio (Crocker y col., 1988; Giri y col., 1989; Hall y col. 1988).

También son numerosos los estudios que tratan de definir una relación entre la expresión de los AgNORs y el grado de malignidad. Se ha descrito que la expresión de los AgNORs, que está aumentada en lesiones neoplásicas de diferentes tejidos, puede ser útil para el diagnóstico de malignidad en lesiones hepáticas (Crocker y McGovern, 1988), en tumores de cervix (Rowlands, 1988), de endometrio (Coumbe y col., 1990; Wilkinson y col., 1990, Niwa y col., 1991), en tumores de vejiga (Karakitsos y col., 1992; Rüschoff y col., 1992), en meningiomas y astrocitomas (Martin y col., 1992), en neoplasias escamosas de la piel (Balasubramanian col., 1992) y lesiones melánicas (Crocker y Skilbeck, 1987), en tejido linfoide (Hall y col., 1988; Boldy y col., 1989) y, desde un punto de vista experimental, en lesiones preneoplásicas y neoplásicas inducidas en el hígado de la rata (Tanaka y col., 1989).

A pesar de que existen numerosas evidencias que apoyan la existencia de una estrecha relación entre la expresión de los AgNORs y el grado de malignidad, no puede decirse que esta relación sea universal, dado que en algunos tejidos esta relación no puede demostrarse. Así, Colecchia y col. (1992) no encuentran relación alguna entre la expresión de los AgNORs y el grado de malignidad o la evolución clínica de lesiones neoplásicas de las glándulas paratiroides. A conclusiones similares llegan McNicol y col. (1989) tras estudiar la expresión de los AgNORs en adenomas hipofisarios.

Hay divergencia en las opiniones de distintos grupos de investigadores en relación con la "utilidad diagnóstica" de la cuantificación de la expresión de los

AgNORs. Mientras que Grigolato y col. (1992), sobre una serie de 55 casos de lesiones mamarias de distintas características histológicas, describen una clara relación entre la expresión de los AgNORs y el grado de malignidad; en una serie previa, mucho más amplia (214 casos), Giri y col. (1989) concluían que el método de la tinción argirófila de los NORs no proporciona datos que permitan "per se" discriminar entre lesiones benignas y malignas en la mama.

Si bien el gran número de referencias parece indicar una difusión amplia de la técnica de los AgNORs en los laboratorios de Anatomía Patológica, es preciso tener en cuenta que trabajos realizados con gran rigor metodológico discuten la utilidad de la misma. Muestra de ello es el artículo de Cibull y col. (1989), en el cual, tras analizar la relación entre la expresión de los AgNORs en muestras biópsicas de pacientes con linfomas foliculares, y la evolución clínica de los mismos, los autores señalaban que, aunque la expresión de los AgNORs podría identificar un grupo de pacientes con peor pronóstico a corto plazo, se podía obtener una relación similar tras analizar las muestras biópsicas utilizando el procedimiento de la Working Formulation of Non Hodgkin Lymphomas o la clasificación de Berard. Estos mismos autores reconocen que el conteo de los AgNORs puede proporcionar información suplementaria a la que ofrecen las técnicas de análisis del ciclo celular por citometría de flujo, en lo que al pronóstico de la lesión se refiere.

La relación existente entre modificaciones en la expresión de los AgNORs y la malignidad y mayor agresividad de las lesiones neoplásicas, se ha basado, generalmente, en la relación que existe entre la proliferación celular y la expresión de los AgNORs, considerando que cuando aumenta el número de partículas AgNOR por célula, también aumenta la actividad proliferativa (Boldy y col., 1989; Niwa y col., 1991). Como punto de partida acerca de la relación entre actividad proliferativa y número de partículas AgNOR se han citado, en numerosas ocasiones, los datos obtenidos por Crocker y col. (1988) y Hall y col. (1988) quienes demostraron, estudiando linfomas no hodgkinianos, que existía una correlación estadísticamente significativa entre la fracción de fase S obtenida por citometría de flujo (los primeros), o la reactividad al suero Ki67 (los segundos), con el número medio de partículas AgNOR por célula. Recientemente se ha demostrado una correlación similar en neoplasias escamosas de la piel enfrentando el número de AgNORs y la expresión de PCNAs (Balasubramaniam y col., 1992).

Sin embargo, como señalaban Hall y col. (1988) estos estudios proporcionan solo evidencia indirecta sobre el significado funcional de los AgNORs. Por una parte, debe tenerse en cuenta que en los estudios anteriormente citados, se analizaron muestras de tejido en las que existían dos poblaciones celulares diferentes, células tumorales y células no tumorales, presumiblemente con diferente actividad proliferativa. Este hecho conlleva una dificultad para comparar de forma directa una media estimada del número de partículas AgNOR por célula (cuando en el cálculo de ésta, la proporción de células tumorales y normales puede ser muy diferente en linfomas de alto y bajo grado) con la proporción de células en

fase S del ciclo celular, o células reactivas al suero Ki67. Por otra parte, otras variables como el índice de ADN -ploidía- (Hubbel y Hsu, 1977; Trent y col., 1981), la actividad celular (Reeves y col., 1982) e incluso la diferenciación celular (Smetana y Likovsky, 1984), pueden modificarse en gran medida en las poblaciones tumorales, y pueden estar también relacionadas con la expresión de los AgNORs.

La relación de las modificaciones en la expresión de los AgNORs con la actividad proliferativa ha quedado recientemente demostrada de forma directa al identificarse un incremento sostenido en la expresión de los AgNORs con la progresión de las células a lo largo del ciclo celular (desde la fase G0/G1 a la fase G2/M, cuando se utiliza la nómina propia de las técnicas de citometría para el análisis del ciclo celular). A esta conclusión se ha llegado mediante dos aproximaciones técnicas diferentes.

Por una parte, se ha procedido al análisis cuantitativo de los AgNORs por técnicas de citometría de imagen en citodispersados de células tímicas de ratas normales, previamente separadas en diferentes fases del ciclo celular en función del contenido de ADN (Carbajo y col., 1991; Orfao y col., 1992; Carbajo y col., 1993a). En estos trabajos se describe un aumento del número medio y área media de las partículas AgNOR por célula desde la fase G0/G1 hacia la fase S (Carbajo y col., 1991), incremento que persiste a lo largo de la fase S, desde el inicio al final de la misma (Orfao y col., 1992).

También se ha podido constatar de forma directa la relación entre la expresión de los AgNORs y la actividad proliferativa, procediendo, sobre la misma preparación celular, al análisis simultáneo del contenido de ADN y a la cuantificación de los AgNORs por medio de técnicas de análisis de imagen (Guillaud y col., 1992). En este estudio se demuestra un aumento progresivo del área media de los AgNORs por célula desde la fase G0/G1 a la fase G2/M analizando muestras de extensiones celulares de linfomas no hodgkinianos y de la línea celular MCF-7.

En el momento actual existen evidencias experimentales suficientes para afirmar que, de forma directa o indirecta, la expresión de los AgNORs está relacionada con la síntesis de ADN y, por tanto, puede ser considerada como un marcador de proliferación celular (Carbajo y Carbajo-Pérez, 1993).

Se sabe que el número de centros fibrilares del nucleolo no está en relación con el número de cromosomas que tienen NORs (Mirre y Knibiehler, 1982), y también que el número de centros fibrilares, y por tanto de AgNORs, no tiene una relación numérica con el ADN (Cataldo y col., 1985), por tanto, es lógico pensar que el incremento en la expresión de los NORs durante la fase S, sea debido a un mecanismo indirecto, más en relación con el crecimiento celular que con la síntesis de ADN, atribuible al esfuerzo transcripcional que realiza la célula a fin de producir todos los ribosomas necesarios para llegar a la división celular.

En observaciones realizadas recientemente en nuestro laboratorio (Carbajo-Pérez y col., 1993) y en estrecha relación con los estudios anteriormente citados, se describe como característico de las células en fase S del ciclo celular la presen-

cia de agregados de material argirófilo en los que no es fácil identificar el número de elementos que los constituyen. Este dato condiciona el que el área media de los AgNOR por célula sea el parámetro más fiable para la cuantificación de la expresión de estas estructuras, por ser medido con facilidad y estar libre de interpretaciones subjetivas. Estos hallazgos están íntimamente ligados a las descripciones de Field y col. (1984) de diferentes patrones de tinción argirófila en linfocitos estimulados con fitohemaglutinina analizados en distintas fases del ciclo celular y con la descripción de la existencia de tres patrones diferentes de la configuración de los AgNORs en células de tejido linfoide (Crocker y col., 1989). Estos autores consideran un patrón de AgNORs propio de linfocitos en reposo, en los que aparecen una o dos pequeñas masas argirófilas. Por otra parte, describen un patrón que se caracteriza por la presencia de mayor número de partículas argirófilas, algunas formando agregados dentro del nucleolo, que es muy frecuente en células que están proliferando de forma activa. Finalmente, describen un tercer patrón en el que aparecen numerosas partículas argirófilas dispersas en el núcleo que podría identificarse como el patrón propio de células malignas.

5.-Evaluación de la reacción AgNOR

En relación con los estudios de los AgNORs se han planteado dos problemas fundamentales: la estandarización para el procesado de las muestras y la estrategia a seguir para la cuantificación de las masas argirófilas. De los procedimientos tintoriales ya hicimos mención en un apartado anterior, por lo cual nos queda ahora referirnos a la evaluación de la reacción.

En lo que al proceso de cuantificación se refiere, es importante señalar que, fundamentalmente en los estudios pioneros en este campo, se ha utilizado la cuantificación del número de AgNORs, y su expresión como número medio por célula, como el parámetro fundamental para la valoración de esta técnica (Crocker y Nar, 1987; Hall y col., 1988; Crocker y col., 1988; McNicol y col., 1988; Boldy y col., 1989; Niwa y col., 1991; Kindermann y Ketter, 1992, entre otros). Sin embargo, el número total de partículas AgNOR por célula es difícil de valorar. Por una parte requiere de un gran esfuerzo por parte del observador, cuando el análisis se hace de forma directa al microscopio, siendo un trabajo laborioso por la necesidad de comprobar mediante enfoque cuidadoso la presencia de una o más partículas en pequeños agregados (Figura 3). A pesar del laborioso proceso de conteo, el esfuerzo para la identificación exacta del número total de masas argirófilas puede resultar infructuoso debido a la superposición de partículas que se presentan como una masa única en los estudios convencionales con microscopía de luz transmitida pero que resultan evidentes si se analizan con técnicas de microscopía confocal (Rodríguez, 1992). Por otra parte, es evidente que cuando se analizan secciones de tejido el número total de partículas, al igual que cualquier otro parámetro derivado del estudio de las masas argirófilas no es sino un estudio aproximativo, dado que lo que se analizan son casquetes nucleares y no la masa nuclear íntegra. Por ser imposible en la prácti-

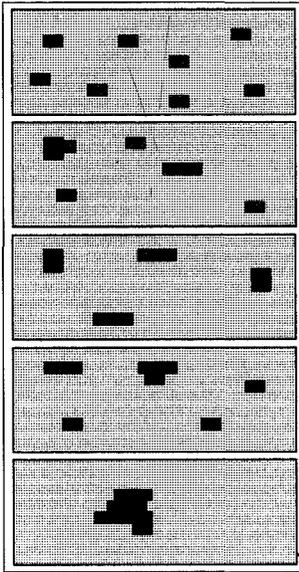


Fig. 3. En los cinco ejemplos presentados no hay modificaciones ni en el número de partículas ni en el área total de las mismas (elementos negros), no obstante, da la impresión de que existen diferencias en la expresión del color negro entre los distintos cuadros. Se excluyen posibles fenómenos de solapamiento).

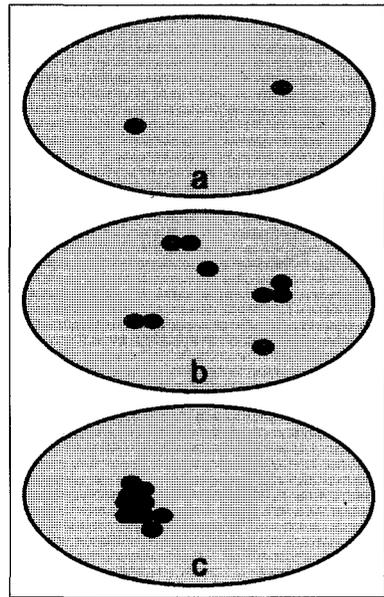


Fig. 4. Las diferencias entre los núcleos de las células tipo I (a) y los de las células tipo II (b y c) es notoria. El patrón de distribución de la argiofilia en las células tipo II puede ser disperso (b) o agrupado (c)

ca valorar de forma precisa y fiable el número de partículas AgNOR en un agregado, se ha sugerido, en un intento de estandarizar el contaje, que los pequeños agregados sean valorados como unidades, tanto si se procede al análisis directo al microscopio (Giri y col., 1989), como si se analiza la muestra por medio de técnicas de análisis automático o semiautomático de imagen (Carbajo y col., 1991).

La utilización de técnicas de procesado automático y semiautomático para el análisis de imagen digitalizada, ha permitido la cuantificación de otros parámetros de las partículas AgNOR, tales como el tamaño medio de partícula, el área total de los AgNORs por célula y la relación de ésta con el área nuclear (Rüschoff y col., 1990; Bravencova y col., 1991; Carbajo y col., 1991; Mingazzini y col., 1991; Grigolato y col., 1992, entre otros).

Teniendo en cuenta las relaciones descritas previamente entre las modificaciones en la expresión de los AgNORs y la fase del ciclo celular (área media de los AgNORs por célula; mayor en células en fase S que en células en fase G0/G1 del ciclo celular -Carbajo y col., 1991; Guillaud y col., 1992-), y la presencia de patrones de AgNORs que podrían ser considerados como característicos de las células en fase S del ciclo celular (Crocker y col., 1989; Carbajo y col., 1993b), se

llegó a plantear la posibilidad de que la expresión de los AgNORs pudiera ser utilizada como criterio de identificación de diferentes poblaciones celulares, asumiendo que las células con una mayor expresión de los mismos deberían corresponderse con células en fase S.

Según nuestra experiencia, el examen directo al microscopio óptico de secciones de timo de rata, permite la diferenciación de dos tipos celulares de acuerdo con la expresión de los AgNORs (Figura 4): células tipo I, caracterizadas por una baja expresión de los AgNORs, y células tipo II, definidas por una amplia masa argirófila en el interior de su núcleo (Carbajo-Pérez y col., 1993). La gran diferencia existente en los valores medios del área total de AgNORs por núcleo, tras la evaluación instrumental de los dos tipos celulares (el área total de los AgNORs es al menos 4 veces mayor en las células tipo II que en las células tipo I -resultados aún no publicados-), soporta la viabilidad de la identificación de los dos tipos celulares en el examen directo de las muestras al microscopio (Figura 5).

Por otra parte, hemos observado una correlación altamente significativa entre la proporción de células tipo II y el IM con BrdU en muestras de timo de rata de diferentes edades, siendo mayores los valores de ambas variables en muestras de timo de ratas de 4 días, en los que es intensa la actividad proliferativa, que en timos de rata de 30 días de edad, en los que se aprecia una considerable disminu-

ción de la proliferación celular. Estos datos refuerzan la idea de que la expresión de los AgNORs, considerada en este caso como porcentaje de células tipo II (células con alta expresión de los AgNORs), puede ser considerado como un índice de la actividad proliferativa, de una manera similar, en cuanto a interpretación se refiere, al IM con BrdU.

La conclusión final es que dado que existe una relación entre la expresión de los NORs y el ciclo celular, la técnica de análisis de los AgNORs, podría utilizarse en un futuro próximo como marcador de la proliferación celular, de la misma forma que hoy se aplican en la clínica la reacción al suero Ki-67 (Gerdes y col., 1983), la evaluación de PCNA (Waseem y col., 1990), o de la captación de BrdU (Carbajo y col., 1992)

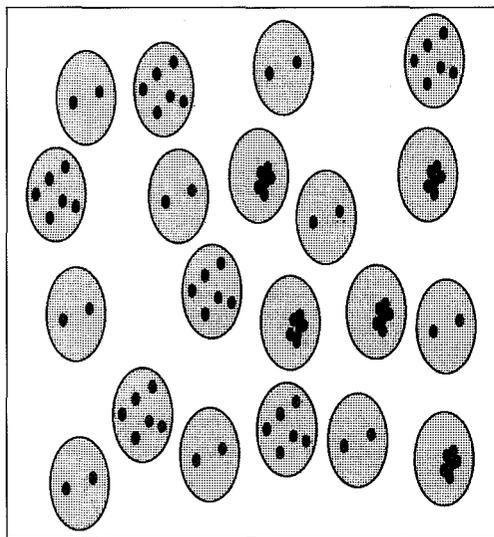


Fig. 5. En esta representación esquemática de los núcleos de una sección de tejido teñidos con una técnica de plata, se identifican claramente las células proliferantes (células tipo II), que suponen un 55% del total de células del campo

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Balasubramaniam, G.S., Vergis, J. y Rode, J. (1992). Diagnostic value of silver stained nucleolar organiser regions (AgNORs) and proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in squamous neoplasms of skin. *Analytical Cell. Pathol.*, 4: 130.
- 2.-Boldy, D.A., Cocker, J. y Ayres, J.G. (1989). Application of the AgNOR method to cell imprints of lymphoid tissue. *J. Pathol.*, 157: 75-79.
- 3.-Brabencova, E., Lorenzato, M., Visseaux Coletto, B., Barhoum, K., Ploton, D., Bonnet, N. y Adnet, J.J. (1991). Comparison of two techniques of measurement: microscope and image analysis to count nucleolar organizers (AgNORS) on histological and cytological material. *Biol. Cell.*, 73: 45a.
- 4.-Carbajo, S. y Carbajo-Pérez, E. (1993). NORs and the Cell Cycle. En: *DNA cytometric analysis*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo. pgs. 251 a 260.
- 5.-Carbajo, S., Gonzalez del Pozo, F. y Carbajo-Pérez, E. (1992). Quantification of the cellular proliferation on freshly dispersed cells from rat anterior pituitaries after in vivo and in vitro labelling with bromodeoxyuridine. *Histochem. J.* 24: 137-143
- 6.-Carbajo, S., Orfao, A. y Carbajo-Pérez, E. (1991). Relationship between AgNORs and cell proliferation studied by flow and image cytometry. *Biol. Cell.*, 73: 45a.
- 7.-Carbajo, S., Orfao, A., Vicente-Villardón, J.L. y Carbajo-Pérez, E. (1993a). Expression of silver-stained nucleolar organizer regions is coupled to cell cycle in rat thymic cells. *Cytometry*, 14: 46-52.
- 8.-Carbajo, S., Carvajal, J.C., Rodríguez, J. y Carbajo-Pérez, E. (1993b). Cellular proliferation and/or differentiation can condition modifications in the expression of AgNORs in rat pituitary cells during growth. *Histol. and Histopath.*, 8: 317-321.
- 9.-Carbajo-Pérez, E., Alberca, V., Vicente-Villardón, J.L., Flores, T. y Carbajo, S. (1993). Expression of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) can be used to assess cellular proliferation as shown in rat thymic sections. *Histochem. J.*, 25: 548-553.
- 10.-Cataldo, C., Souchier, C., Vasserot, M., Calisti, A., Vagner-Capodano, A.M. y Stahl, A. (1985). Three-dimensional analysis of fibrillar centers and associated chromatin in the nucleolus of human oocytes in primordial follicles. *Biol. Cell.*, 54: 91-194.
- 11.-Cibull, M.L., Heryet, A., Gatter, K.C. y Mason, D.Y. (1989). The utility of Ki-67 immunostaining, nucleolar organizer region counting, and morphology in the assesment of follicular lymphomas. *J.Pathol.*, 158: 189-193.
- 12.-Colecchia, M., Frigo, B., Prian, E., Zucchi, A. y Leopardi (1992). AgNOR counts in parathyroid pathology. *Analytical Cell. Pathol.*, 4: 143.

- 13.-Coulombe, A., Mills, B.P. y Brown, C.L. (1990). Nucleolar organiser regions in endometrial hyperplasia. *Pathol. Res. Pract.*, 186: 254-259.
- 14.-Crocker, J. y McGovern, J. (1988). Nucleolar organiser regions in normal cirrhotic, and carcinomatous livers. *J. Clin. Pathol.*, 41: 1044-1048.
- 15.-Crocker, J. y Skilbeck, N.Q. (1987). Nucleolar organizer region-associated proteins in melanotic lesions of the skin. A quantitative study. *J. Clin. Pathol.*, 40: 885-889.
- 16.-Crocker, J. y Nar, P. (1987). Nucleolar organiser regions in lymphomas. *J. Pathol.*, 151: 111-118.
- 17.-Crocker, J., Macartney, J.C. y Smith, P.J. (1988). Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. *J. Pathol.*, 154: 151-156.
- 18.-Crocker, J., Boldy, D.A.R. y Egan, M.J. (1989). How should we count AgNORs. Proposals for a standardized approach. *J. Pathol.*, 158: 185-188.
- 19.-Daskal, Y., Smetana, K. y Bussch, H. (1980). Evidence from studies on segregated nucleoli that nucleolar silver-staining proteins C23 and B23 are in the fibrillar component. *Exp. Cell. Res.*, 127: 285-291.
- 20.-De Capoa, A., Baldini, A., Marlekaj, P., Natoli, C., Rocchi, M., Archidiacono, N., Cianfarani, S., Spadoni, G.L. y Boscherini, B. (1985). Hormone-modulated rRNA gene activity is visualised by selective staining of the NORs. *Cell. Biol. (Int. Rep.)*, 9: 791-796.
- 21.-Field, D.H., Fitzgerald, P.H. y Sin, F.Y.T. (1984). Nucleolar silver-staining patterns related to cell cycle phase and cell generation of PHA-stimulated human lymphocytes. *Cytobios.*, 41: 23-33.
- 22.-Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. y Stein, H. (1983). Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer*, 31: 13-20.
- 23.-Giri, D.D., Nottingham, J.F., Lawry, J., Dundas, S.A.C. y Underwood, J.C.E. (1989). Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions. Correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J. Pathol.*, 157: 307-313.
- 24.-Grigolato, P., Chioda, C., Facchetti, F. y Valagussa, E. (1992). Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins (NORs) using a computer aided device (CAD). *Analytical Cell. Pathol.*, 4: 162.
- 25.-Guillaud, P., Wozniak, Z. y Seigneurin, D. (1992). Simultaneous quantification of DNA and NORs by microscopic image analysis. *Biol. Cell.*, 73: 45a.
- 26.-Hall, P.A., Crocker, J., Watts, A. y Stansfeld, A.G. (1988). A comparison of nucleolar organizer region staining and ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*, 12: 373-381.
- 27.-Hernandez-Verdun, D. y Derenzini, M. (1983). Non-nucleosomal configuration of chromatin in nucleolar organizer regions of metaphase chromosomes in situ. *Eur. J. Cell. Biol.*, 31: 360-365.

- 28.-Hernández, J.L. (1992). Evolución postnatal del Lóbulo Intermedio de la hipófisis. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.
- 29.-Howell, W.M. y Black, D.A. (1980). Controlled silver staining of nucleolus with protective colloidal developer: a one step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.
- 30.-Hubbel, H.R. y Hsu, T.C. (1977). Identification of nucleolar organizer regions (NORs) in normal and neoplastic cells by the silver staining technique. *Cytogenet Cell. Genet.*, 19: 185-196.
- 31.-Karakitsos, P., Liossi, A., Kyrkou, K., Pantazopoulos, D., Aroni, K., Georgoulakis, J., Stergiou, C., Goulandris, N. y Dimopoulos, K. (1992). Ploidy, Ki-67, AgNORs and EGFRs in bladder tumor imprint. *Analytical Cell. Pathol.*, 4: 180.
- 32.-Kindermann, D. y Ketter, G. (1992). Prognostic implications of AgNORs and DNA cytometry in relapsing breast cancer. *Analytical Cell. Pathol.*, 4: 182.
- 33.-Martin, H., Hufnagl, P., Beil, M., Wenzelides, K., Gottschalk, J. y Rahn, W. (1992). Silver-stained nucleolar organizer proteins (AgNORs) in cancer cells; quantitative investigations in gliomas, meningiomas, bladder carcinomas and pleural lesions. *Analytical Cell. Pathol.*, 4: 199.
- 34.-McNicol, A.M., Colgan, J., McMeekin, W. y Teasdale, G.M. (1988). Nucleolar organizer regions in pituitary adenomas. *J. Pathol.*, 154: 106A.
- 35.-McNicol, A.M., Colgan, J., McMeekin, W. y Teasdale, G.M. (1989). Nucleolar organizer regions in pituitary adenomas. *Acta Neuropathol.*, 77: 547-549.
- 36.-Mingazzini, P.L., Scucchi, L., Di Stefano, D., Malchiodi Albedi, F., Ciaralli, F., Falchi, M. y Marinozzi, V. (1991). Expression of interphasic nucleolar organizer regions in normal, dysplastic and neoplastic colorectal mucosa. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, 419: 487-491.
- 37.-Mirre, C. y Knibiehler, B. (1982). A re-evaluation of the relationships between the fibrillar centres and the nucleolus-organizing regions in reticulated nucleoli: ultrastructural organization, number and distribution of the fibrillar centres in the nucleolus of the mouse Sertoli cell. *J. Cell. Sci.*, 55: 261-276.
- 38.-Morton, C.C., Brown, J.A., Holmes, W.M., Nance, W.E. y Wolf, B. (1983). Stain intensity of human nucleolus organizer region reflects incorporation of uridine into mature ribosomal RNA. *Exp. Cell. Res.*, 145: 405-413.
- 39.-Niwa, K., Yokoyama, Y., Tanaka, T., Mori, H., Mori, H. y Tamaya, T. (1991). Silver-stained nucleolar organizer regions in the normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, 419: 493-497.
- 40.-Orfao, A., Carbajo, S., Ciudad, J., Vicente-Villardón, J.L. y Carbajo-Pérez, E. (1992). Expression of AgNORs is directly coupled to DNA synthesis. *Anal. Cell. Pathol.*, 4: 208.
- 41.-Peebles, S.E. y McNicol, A.M. (1989). AgNOR numbers in rat pituitary corticotrophs following adrenalectomy or corticotrophin releasing factor administration. *Virchows Archiv. B. Cell. Pathol.*, 57: 209-212.

- 42.-Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F. y Adnet, J.J. (1986). Improvement in the staining and visualization of argyrophilic proteins of the nucleolar organiser region at the optical level. *Histochem. J.*, 18: 5-14.
- 43.-Ploton, D., Menager, M. y Adnett, J.J. (1990). Les organisateurs nucleolaires (NORs): Definition et mise en evidence cytochimique. Colloque INSERM: Analyse d'images biologiques en microscopie optique et electronique. Reims, 3-5 Avril 1990.
- 44.-Reeves, B.R., Casey, G. y Harris, H. (1982). Variation in the activity of nucleolar organisers in different tissues, demonstrated by silver staining of human normal and leukaemic cells. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 6: 223-230.
- 45.-Rodríguez, F.J. (1992). Estudio de la relación entre los distintos estadios funcionales de las células gonadotropas hipofisarias y los organizadores nucleolares argirófilos (AgNORs). Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.
- 46.-Rowlands, D.C. (1988). Nucleolar organising regions in cervical intraepithelial neoplasia. *J. Clin. Pathol.*, 41: 1200-1202.
- 47.-Rüschhoff, J., Plate, K.H., Contractor, H. Kern, S., Zimmermann, R., y Thomas, C. (1990). Evaluation of nucleolus organizer regions (NORs) by automatic image analysis: a contribution to standardization. *J. Pathol.*, 161: 113-118.
- 48.-Rüschhoff, J., Bittinger, A., Gogolok, A. y Ulshöfer, B. (1992). Diagnostic value of AgNORs image cytometry in urinary cytology. *Analytical Cell. Pathol.*, 4: 221.
- 49.-Smetana, K. y Likovsky, Z. (1984). Nucleolar silver-stained granules in maturing erythroid and granulocytic cells. *Cell. Tissue Res.*, 237: 367-370.
- 50.-Tanaka, T., Takeuchi, T., Nishikawa, A., Takami, T. y Mori, H. (1989). Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenylaceta-mide in rats: comparison with bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80: 1047-1051.
- 51.-Trent, J.M., Carlin, D.A. y Davies, J.R. (1981). Expression of silver stained nucleolar organizing regions (Ag-NORs) in human cancer. *Cytogenet Cell. Genet.*, 30: 31-38.
- 52.-Underwood, J.C.E. (1992). Nucleolar Organiser Regions. En: *Assessment of cell proliferation in clinical practice*. Hall, P.A., Levison D.A. y Wright, A. (eds.). Springer-Verlag. New York. pp 161 a 175.
- 53.-Waseem, N.H. y Lane, D.P. (1990). Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J. Cell. Sci.*, 96: 121-129.
- 54.-Wilkinson, N., Buckley, C.H., Chawner, L. y Fox, H. (1990). Nucleolar organiser regions in normal, hyperplastic, and neoplastic endometrium. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 9: 55-59.