

Análisis del marcador tisular AgNOR en leucoplasia y carcinoma escamocelular oral

AUTORES/AUTHORS

Luis Carlos Cano Montoya (1), Gloria Jeanethe Álvarez Gómez (2), Walter Augusto Valencia Londoño (3), Jorge Adolfo Ramírez España (3), Carlos Alberto Prada Navas (3).

- (1) Médico Patólogo, Jefe del Departamento de Patología del Hospital Universitario San Vicente de Paúl Profesor Titular. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia.
- (2) Odontóloga, Especialista en Estomatología y Cirugía Oral, Profesora. Facultad de Odontología, Hospital Universitario San Vicente de Paúl. Universidad de Antioquia. Medellín.
- (3) Odontólogos, Especialistas en Cirugía Oral y Maxilofacial. Facultad de Odontología. Universidad de Antioquia. Medellín.

Cano LC, Álvarez GJ, Valencia WA, Ramírez JA Prada CA. Análisis del marcador AgNOR en leucoplasia carcinoma escamocelular oral. Medicina Oral 2002; 7: 17-25
© Medicina Oral. B-96689336
ISSN 1137-2834.

RESUMEN

Objetivos: Se diseñó este estudio retrospectivo con el fin de determinar la importancia pronóstica de las AgNORs y del ki-67 en lesiones premalignas y malignas de la cavidad oral.

Diseño del estudio: Se utilizaron 98 cortes histológicos (26 de displasia epitelial leve DEL, 15 de displasia epitelial moderada DEM y 57 de carcinoma escamocelular oral invasor CECO) les realizamos tinción con plata coloidal para determinar el número promedio y el tipo de AgNORs, e inmunotinción con Ki-67 para obtener el porcentaje de células Ki-67 (+).

Resultados: En ambas fases el número promedio de las AgNORs y de células Ki-67 (+) fue significativamente mayor en los casos de CECO, comparado con las displasias. Las AgNORs tipo 1 predominaron en los casos de DEL y el tipo 2 en los casos de CECO. No se encontró una correlación estadísticamente significativa (correlación simple por Rangos de Sperman) entre los números promedios de AgNORs y el porcentaje de células Ki-67 (+) en las tres lesiones estudiadas. (DEL: $p = 0,5113$, DEM: $p = 0,92$ y CECO: $p = 0,2584$).

Recibido: 15/05/01. Aceptado: 21/10/01.

Received: 15/05/01. Accepted: 21/10/01.

Conclusiones: Los resultados sugieren que el marcador tisular AgNOR puede utilizarse como complemento del estudio histopatológico rutinario, ya que las variaciones en su número y distribución indican que existen alteraciones celulares en una lesión determinada y ésta es una técnica fácil y económica de realizar.

Palabras clave: Regiones Argirofílicas Organizadoras del Nucléolo (AgNORs), Ki-67, displasias epiteliales, carcinoma escamocelular oral, marcadores tisulares.

INTRODUCCIÓN

En el Hospital Universitario San Vicente de Paúl, es alto el número de pacientes atendidos con lesiones premalignas y malignas de cavidad oral; a estos pacientes, por la ubicación geográfica de sus viviendas y por su bajo nivel cultural resulta en ocasiones difícil realizarles los controles adecuados y por ello cuando vuelven a la consulta ya existe una transformación maligna de la lesión o un estadio muy avanzado y en otros casos el paciente no regresa. Con el reconocimiento de las Regiones Organizadoras del Nucléolo (NORs), como una posible alternativa para la detección precoz del CECO, se podrían realizar diagnósticos y tratamientos definitivos o radicales desde el inicio de la enfermedad. Al realizar esta investigación pretendemos conocer si las AgNORS son realmente marcadores de la actividad proliferativa celular indicando precozmente el potencial de malignidad de una lesión establecida o previamente tratada.

Las NORs se han definido como anillos de ADN ribosomal que codifican para el ARN ribosomal. En el hombre, las NORs están localizadas en el brazo corto de cinco cromosomas acrocéntricos: 13, 14, 15, 21, y 22; éstas contienen genes que codifican para la producción de las sub-unidades 18S y 28S del RNAr, las cuales son de importancia vital para la síntesis de proteínas (1).

Las NORs son argirofílicas debido a su asociación con proteínas acídicas (C23, B23 y posiblemente la ARN polimerasa 1), las que contienen abundantes grupos sulfhidrilo y carboxilo que precipitan los iones de plata; de este modo, los tejidos teñidos con plata coloidal permiten observar en el microscopio de luz las NORs argirofílicas (AgNORs), como puntos negros y café dentro del núcleo (2).

Mourad (3) ha observado que el número normal de las AgNORs por núcleo en las células diploides en descanso oscila entre 1 y 2; cuando este número está por encima de 2 indica un aumento en el contenido del ADN o aneuploidismo. Las variaciones en el tamaño y en el número de las AgNORs visualizadas dependen del nivel de la actividad transcripcional, del número de cromosomas relacionados con las NORs en el cariotipo y de la fase del ciclo celular, puesto que el nucléolo se dispersa antes de la mitosis y se reorganiza posteriormente (1,4).

De acuerdo con las observaciones de algunos autores, se han clasificado diferentes tipos de AgNORs según su distribución dentro del núcleo. Una de las más representativas es

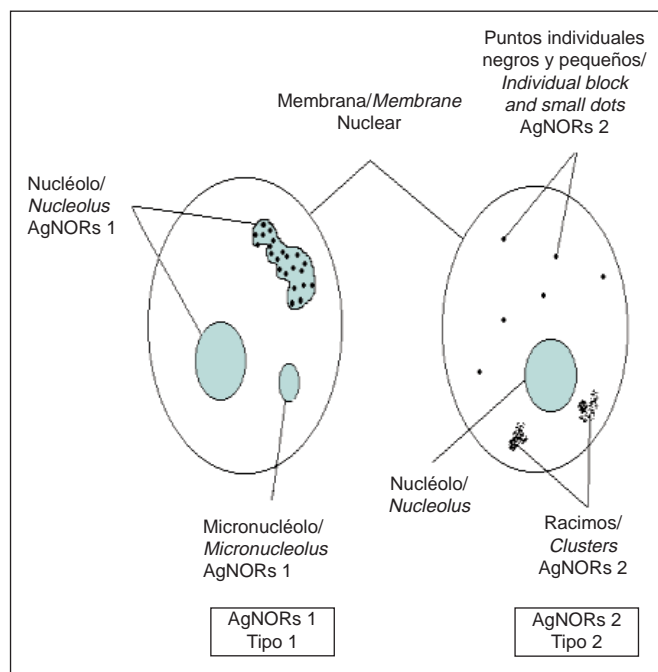


Fig. 1.

Diferentes tipos de AgNORs según su distribución dentro del núcleo.

Different types of AgNORs depending on distribution with the nucleus.

la realizada por Shiro *et al.* (1), (Figura 1):

- AgNORs Tipo 1: Puntos teñidos de color café de varios tamaños con márgenes bien definidos.
- AgNORs Tipo 2: Puntos pequeños de color negro, aislados o agrupados en racimos y sin márgenes bien definidas.

Varios autores propusieron que el número y las características morfológicas de las AgNORs proveen un índice de la agresividad biológica y de la actividad proliferativa de un tumor. Crocker y Nar (5) fueron los primeros en reportar un número más alto de AgNORs por núcleo en los linfomas a medida que estos se hacían más agresivos. Desde entonces, este método ha sido utilizado ampliamente para evaluar varias patologías incluyendo lesiones benignas y malignas.

Warnakulasuriya y Johnson (6) en 1993 encontraron que fue más útil el tipo que el número de las AgNORs para la diferenciación entre lesiones carcinomatosas, displásicas y reactivas de la cavidad oral; sin embargo, existía la posibilidad de que aquellas lesiones displásicas con un conteo más alto y una mayor dispersión representaban un mayor riesgo de transformación maligna.

La relación entre la cuantificación de las AgNORs y la proliferación celular ha sido estudiada mediante técnicas de inmunohistoquímica con diversas sustancias como el Ki-67, el MIB-1, el PCNA (antígeno nuclear de la célula proliferante) y la bromodeoxiuridina, entre otras, que permiten conocer la actividad transcripcional y metabólica celular aumentada (7, 8). Estudios que han analizado el anticuerpo monoclonal

Ki-67, el cual reconoce un antígeno nuclear presente en las células proliferantes permitiendo identificar a las células que están en la fase S del ciclo de división celular, han demostrado su alta confiabilidad (9).

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio es de carácter descriptivo retro-prospectivo. La población objeto de estudio en la fase retrospectiva fue 60 biopsias seleccionadas aleatoriamente y analizadas encontradas desde 1990 hasta 1996 en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia; éstas se distribuyeron así: quince (15) con diagnóstico histopatológico de hiperqueratosis con displasia epitelial leve (DEL); quince (15) con diagnóstico histopatológico de hiperqueratosis con displasia epitelial moderada (DEM), correspondientes a un diagnóstico clínico de leucoplasia oral; las treinta (30) restantes correspondían al diagnóstico de carcinoma escamocelular invasor oral (CECO). En la fase prospectiva, la población objeto de estudio fueron los pacientes que acudieron a consulta en la Unidad de Cirugía Maxilofacial y Estomatología del Hospital Universitario San Vicente de Paúl (H.U.S.V.P.) de la ciudad de Medellín, durante el período comprendido entre agosto de 1996- diciembre de 1997 y a quienes se les confirmó el diagnóstico clínico de leucoplasia oral mediante estudio histopatológico en el que se determinó hiperqueratosis con DEL y CECO. En esta fase del estudio no se analizaron los casos de DEM debido a que sólo se encontró una biopsia con este reporte.

A los cortes de las biopsias, se les realizó tinción con plata coloidal según la técnica descrita por Ploton *et al.* en 1986 (10, 11) y se procesó con inmunohistoquímica para hacer marcación con el anticuerpo monoclonal Ki-67 (Dako, California, código M-7187).

Con la coloración de las AgNORs se observaron las células al microscopio de luz con una magnificación total x 1000 y se tomaron microfotografías de al menos 6 campos (los de mayor concentración de AgNORs) separados entre sí por dos campos de 10 X. Las fotografías se ampliaron a 13 x 18 centímetros y a color, en éstas se contó el número de las AgNORs y se evaluó su distribución (tipo). El método para realizar la cuantificación de las AgNORs fue aquél en el que un racimo de AgNORs se cuenta como una sola.

Para determinar el porcentaje de las células Ki-67 positivas (Ki-67 (+)) se utilizó un microscopio de luz empleando un aumento x 400 y estableciendo en 10 campos microscópicos un promedio de las células Ki-67 (+), es decir, células que presentaron mayor intensidad en la inmunotinción y de las células negativas (-), es decir que no presentaron tinción o ésta fue muy leve.

Las variables utilizadas fueron las siguientes: número de las AgNORs, distribución de las AgNOR, porcentaje de células Ki-67 positivas y evolución de la leucoplasia y del carcinoma escamocelular oral -solamente en la fase prospectiva-.

Realizadas las tinciones y la valoración cuantitativa y cua-

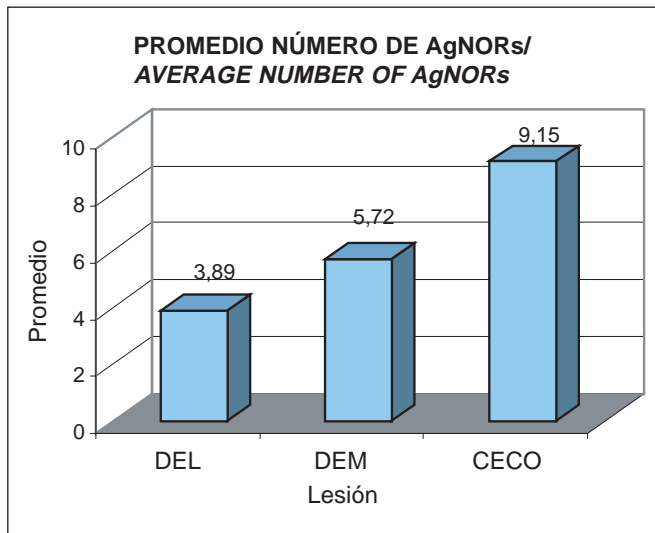


Figura 2. Promedio de AgNORs.

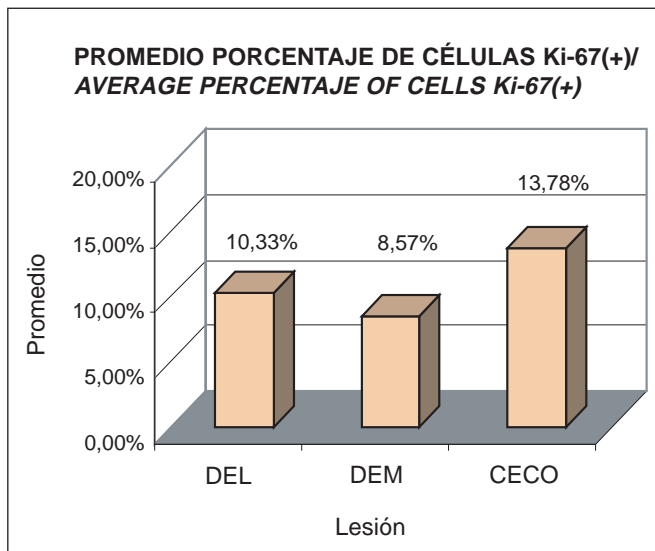


Figura 4. Promedio porcentaje de células Ki-67(+).

litativa de las muestras, se inició el análisis fue realizado así:

- Comparación entre el número y el tipo de las AgNORs con cada diagnóstico histopatológico.
- Comparación entre el porcentaje de células Ki-67 (+) con cada diagnóstico histopatológico.
- Correlación entre el número de las AgNORs con el porcentaje de células Ki-67(+).
- Comparación entre el número y tipo de las AgNORs de las lesiones iniciales vs. recidivas y/o progresiones.
- Comparación entre el porcentaje de células Ki-67 (+) en las lesiones iniciales vs. recidivas y/o progresiones.
- Comparación entre el número y tipo de las AgNORs de las biopsias iniciales y finales con el mismo diagnóstico en

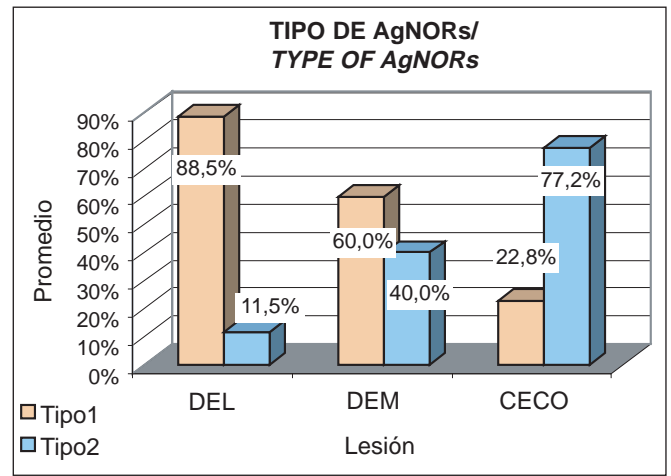


Figura 3. Tipo de AgNORs.

los casos que no progresaron.

METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Se realizó según el nivel de medición de sus variables de la siguiente manera:

- Medidas de resumen en las variables de tipo cuantitativo (número de las AgNORs y porcentaje de células Ki-67(+)).
- Porcentaje en las variables de tipo cualitativo (distribución de las AgNORs y evolución de las enfermedades).
- Análisis de Varianza (ANOVA) y la Prueba de Rangos Múltiples para muestras de tamaño diferente y con un 95% de confiabilidad, con el fin de comparar el número de las AgNORs y el porcentaje de células Ki-67 (+) según el tipo de diagnóstico.
- Correlación simple por Rangos de Sperman para medir el grado de asociación entre el número de las AgNORs con el porcentaje de células Ki-67(+).

RESULTADOS

Número de las AgNORs: Ver Figura 2. Los promedios para el número de las AgNORs en DEL y en DEM difieren significativamente de los encontrados en los casos de CECO, donde se observa un aumento de las mismas. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los dos grados de displasias estudiadas.

Distribución de las AgNORs: En cuanto a la distribución de las AgNORs (Figura 3) en los tres tipos de entidades estudiadas, se observó que en ambas fases de nuestro estudio predominaron las AgNORs tipo 1 en DEL (Figura 5a), mientras que las AgNORs tipo 2 predominaron en el CECO (Figura 6a) y en los casos de DEM predominaron las AgNORs tipo 1.

Porcentaje de células Ki-67(+): Los promedios de los porcentajes de células Ki-67(+) para cada una de las fases del estudio en las tres entidades se observan en el Figura 4. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de la DEL (Figura 5b) y el CECO (Figura 6b),

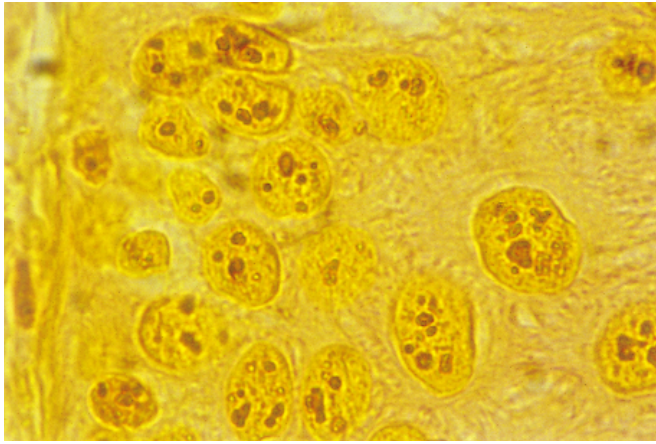


Fig. 5a.

Caso de displasia epitelial leve - DEL, con una distribución de AgNORs tipo 1 (Fig. 5a: x 1000) y su respectiva inmunotinción con el anticuerpo monoclonal Ki-67 (Fig. 5b: x 100).

Mild epithelial dysplasia case - DEL, with a distribution of AgNORs type 1 (Fig. 5a: x 1000) and its respective immunomarking with the monoclonal Ki-67 (Fig. 5b: x 100).

entre la DEM y el CECO, pero sin diferencia significativa entre los dos grados de displasia.

Correlación entre el número de las AgNORS y el porcentaje de las células Ki-67(+): El análisis por rangos de Sperman, determinó que no existe correlación significativa entre el porcentaje de células Ki-67(+) y el número de las AgNORS en ninguna de las tres lesiones estudiadas.

Recidivas y/o progresiones: No se presentó ningún caso de progresión ni de recidiva de ninguna de las lesiones estudiadas, por lo anterior no fue necesario realizar las correlaciones entre el número y tipo de las AgNORS y el porcentaje de células ki-67 (+) de las lesiones iniciales vs. las recidivas y las progresiones.

DISCUSIÓN

El estudio de la cuantificación, distribución y morfometría de las AgNORS en lesiones de la cavidad oral ha sido variado pero no ampliamente realizado. Algunas de las lesiones estudiadas han sido el carcinoma escamocelular, lesiones positivas para el papiloma virus humano, liquen plano, lesiones premalignas con o sin displasia, hiperplasia epitelial, lesiones reactivas, queratosis benignas, lesiones de glándulas salivares, quistes y tumores odontogénicos (6, 12-15).

Nuestros resultados son muy similares a los reportados por algunos autores, entre ellos el estudio realizado por Warnakulasuriya y Johnson (6) quienes analizaron las AgNORS en biopsias de lesiones carcinomatosas, displásicas y reactivas de la cavidad oral, con el fin de determinar si el conteo de las AgNORS era útil para diferenciarlas. Ellos encontraron que el conteo promedio fue más alto en carcino-

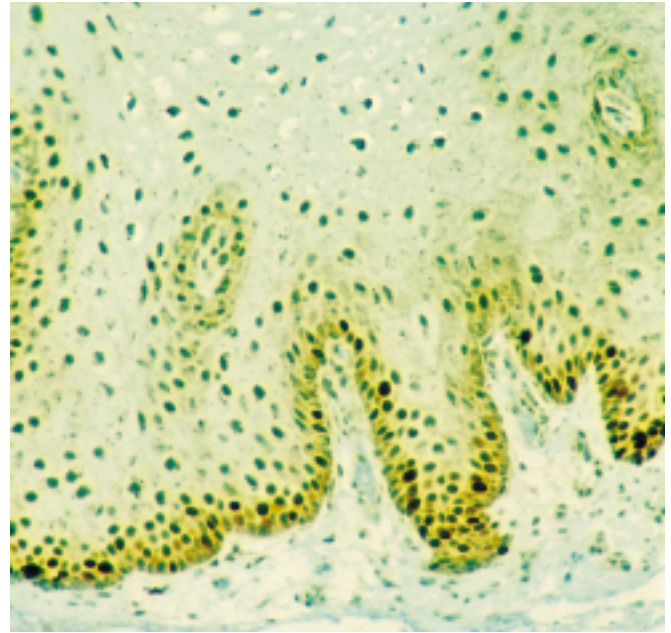


Fig. 5b.

mas, comparado con las displasias epiteliales o con las queratosis benignas. Según estos autores, el conteo más alto encontrado en muchos carcinomas se debía a la dispersión de las AgNORS dentro del nucleoplasma.

Kahn *et al.* (13) en lesiones orales premalignas sugirieron que el número de las AgNORS no puede utilizarse como una ayuda diagnóstica entre los grados de displasia de la mucosa oral. Similarmente, nuestros resultados indican que aunque la cuantificación de las AgNORS puede ser una ayuda visual subjetiva en las displasias observadas con el microscopio de luz, no es una ayuda diagnóstica objetiva en el grado de displasia de la mucosa oral. A pesar de no ser un parámetro diagnóstico, la cuantificación de las AgNORS aumenta en los estadios de proliferación celular activa, cuando aumenta el número de células ploidie y con la actividad transcripcional elevada; es así como los factores hormonales y las infecciones por virus, entre otros, afectan su número (6, 7).

En cuanto a la distribución de las AgNORS, se denota la tendencia progresiva a aumentar el grado de dispersión de éstas dentro del núcleo, es decir el aumento de las AgNORS tipo 2 en los casos de DEM con respecto a DEL. Dentro de la revisión de la literatura no encontramos ningún estudio en lesiones orales que haya utilizado este sistema de clasificación; sin embargo, de acuerdo a este grado de dispersión, quienes han estudiado el tipo reportan datos coincidentes con los nuestros (6, 14). Adicionalmente al mayor grado de dispersión de las AgNORS en las lesiones carcinomatosas de ambas fases del estudio y en las DEM con distribución tipo 2 encontramos una forma más irregular y un tamaño más disminuido de las AgNORS en las mismas. La dispersión de las AgNORS sobre el nucleoplasma parece ser un indicador de malignidad como se ha descrito en

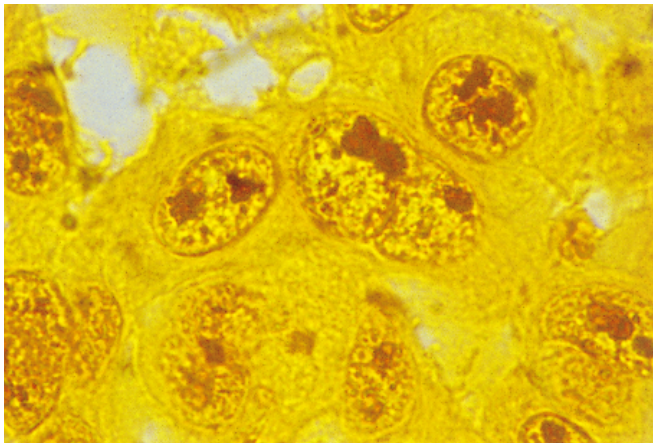


Fig. 6a.

Caso de carcinoma escamocelular oral invasor - CECO, con una distribución de AgNORs tipo 2 (Fig. 6a: x 1000) y su respectiva inmunotinción con el anticuerpo monoclonal Ki-67 (Fig. 6b: x 100).

Invasive squamous cell carcinoma case - CECO, with a distribution of AgNORs type 2 (Fig. 6a: x 1000) and its respective immunomarking with the monoclonal antibody Ki-67 (Fig. 6b: x 100).

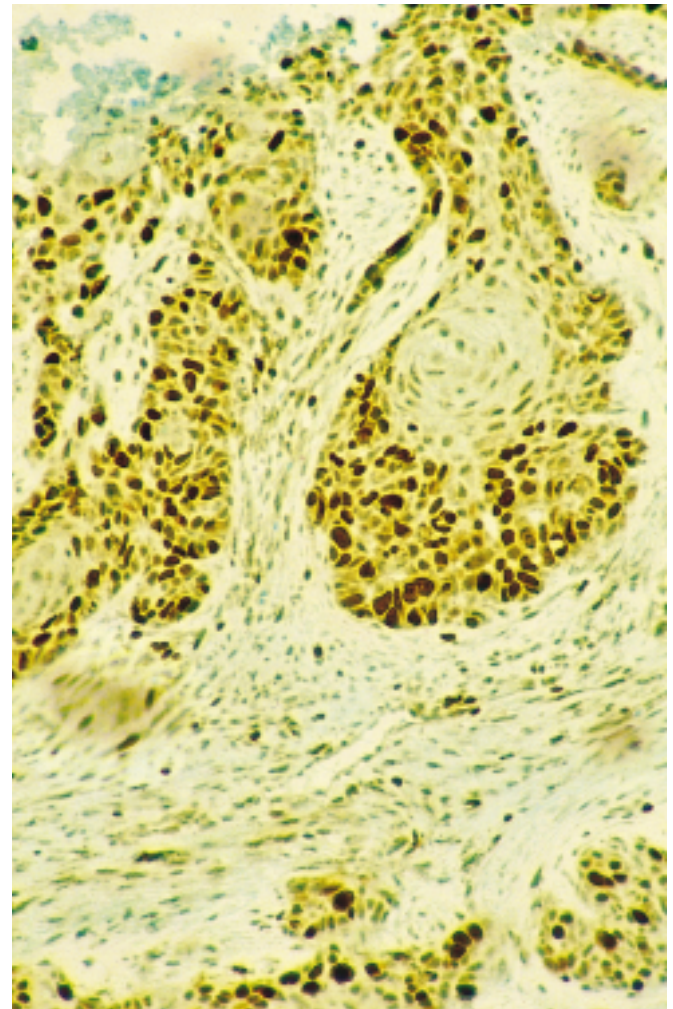


Fig. 6b.

investigaciones anteriores (4, 16).

Nuestros datos en cuanto a porcentaje de células Ki-67(+) difieren de los encontrados por Saito *et al.* (17) quienes reportan en promedio 28,7% de células Ki-67(+) en DEL, 30% en DEM y 63% en CECO. Probablemente la diferencia encontrada entre los datos de nuestro estudio y los otros reportados se debe a la influencia de factores en el procesamiento de la muestra y la interpretación, los cuales habría que estandarizar previamente con fines comparativos (18,19). En nuestro estudio no encontramos una correlación significativa entre el número de las AgNORs y el marcador celular Ki-67 en ninguna de las tres lesiones estudiadas, diferente a otros estudios que han encontrado una correlación positiva entre los dos marcadores en tumores malignos de diverso origen.

En esta investigación, se encontró un porcentaje promedio mayor de células Ki-67(+) en los casos de CECO, lo cual aunque sea menor de lo reportado en la literatura, indica que la actividad proliferativa celular es mayor en estos casos señalando posiblemente un peor pronóstico en los mismos como lo concluyen otros autores.

No es posible concluir acerca de la utilidad de las AgNORs y del Ki-67 en el análisis de la progresión de estas tres enfermedades estudiadas debido al número reducido de los casos en los cuales se pudo realizar seguimiento.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. La cuantificación y distribución de las AgNORs son parámetros subjetivos y no diagnósticos de lesiones específicas, pero son útiles como complemento al estudio histopatológico para conocer el nivel de alteraciones celulares y

nucleares y en cierta medida, podría ser indicativo del grado de malignidad y orientaría el pronóstico de las lesiones premalignas y del CECO.

2. Podría especularse que al observar en un corte de tejido la variación en el tipo de AgNORs (tipo 1 a tipo 2) se debe pensar en la posibilidad de transformación maligna de una lesión; se necesitarían estudios adicionales utilizando esta misma clasificación de distribución de las AgNORs en lesiones benignas de la cavidad oral.

3. Para poder conocer la verdadera utilidad pronóstica de las AgNORs en lesiones premalignas y malignas de la cavidad oral, deben realizarse estudios longitudinales que contemplen no sólo su número y distribución, sino también su forma y volumen mediante técnicas computarizadas y estandarizadas.

4. Desafortunadamente aún existe debate en cuanto al método manual más apropiado para realizar la cuantificación de las AgNORs y del porcentaje de células Ki-67 (+) y sería necesario un protocolo de conteo estándar.

5. En nuestra investigación el porcentaje de células Ki-67 (+) difiere de algunos de los estudios publicados, siendo con-

Analysis of the tissue marker AgNOR in leukoplakia and oral squamous cell carcinoma

SUMMARY

Objectives: To determine the prognostic importance of AgNORs and ki-67 in premalignant and malignant lesions in the oral cavity, we carried out a study using retrospective phases in which 98 histologic sections

Study design: 26 of mild epithelial dysplasia DEL, 15 of moderate epithelial dysplasia DEM, and 57 of invasive oral squamous cell carcinoma CECO, were stained with silver colloid stain to obtain the average number and type of AgNORs, and immunologic marker Ki-67 to obtain the percentage of cells Ki-67 (+).

Results: In both phases the average number of AgNORs and Ki-67 (+) cells was significantly greater in the CECO cases, compared to the dysplasias. The AgNORs type 1 were predominant in the DEL cases and the type 2 in the CECO cases. No statistically significant correlation (Sperman's simple range correlation) was found between the average numbers of AgNORS and the percentage of Ki-67 (+) cells in the three lesions studied. (DEL: $p=0.5113$, DEM: $p=0.92$ y CECO: $p=0.2584$).

Conclusions: The results suggest that the AgNOR tissue marker can be used as a routine complementary histopathologic study, since the variations in its number and distribution indicate existence of cell alterations in a given lesion and the use of this technique is easy and inexpensive.

Key words: Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions (AgNORs), Ki-67, epithelial dysplasia, oral squamous cell carcinoma, tissue markers.

INTRODUCTION

In the University Hospital San Vicente de Paúl, the number of patients with premalignant and malignant oral lesions is high; due to the geographic location of their houses and their low socioeconomic status, sometimes it is very difficult to have adequate follow ups of these patients and therefore, when they consult again, their lesion is in an advanced state or has progressed into a malignant lesion, and in some cases, the patient never returns. With the recognition of Nucleolar Organizer Regions (NORs), as a possible alternative for an early finding of CECO, definitive or radical diagnoses and treatments could be performed at the onset of the disease. By doing this research we are trying to see if the AgNORS are real markers of proliferative cell activity, indicating in an early state, the potential for malignancy of an established lesion or a previously treated one.

The NORs have been defined as DNA ribosomal rings which codify ribosomal RNA. In human beings, NORs are localized in the short arm of five acrocentric chromosomes: 13, 14, 15, 21, y 22; these contain genes which codify the production of subunits 18S and 28S of rRNA, and these are of vital importance for protein synthesis (1).

The NORs are argyrophilic due to their association with acidic proteins (C23, B23 and possibly RNA polymerase 1), which contain abundant sulfhydryl and carboxyl groups that precipitate the silver ions; in this way, tissues stained with silver colloid allow the light microscope observation of argyrophilic NORs (AgNORs), like black and brown points within the nucleolus (2).

Mourad (3) has observed that the normal number of AgNORs per nucleus in diploid cells at rest, is between 1 and 2; when this number is greater than 2, it indicates an increase in the DNA contents or aneuploidism. The variations in the size and number of visualized AgNORs depends on the level of transcriptional activity, the number of chromosomes related to the NORs in karyotype, and cellular cycle phase, since the nucleolus disperses before mitosis and reorganizes afterwards (1,4).

According to the observations made by some authors, different types of AgNORs have been classified depending on their distribution within the nucleus. One of the most representative is the one from Shiro et al. (1), (Figure 1):

- AgNORs Type 1: Brown stained points of several sizes with well defined borders.
- AgNORs Type 2: Small black points, isolated or grouped in clusters, without well defined borders.

Several authors have proposed that the morphologic characteristics and number of AgNORs provide an index of biologic aggressiveness and of the proliferative activity of a tumor. Crocker and Nar (5) were the first to report a high number of AgNORs per nucleus in lymphomas as these became more aggressive. Since then, this method has been widely used to evaluate various types of pathologies including benign and malignant lesions.

Warnakulasuriya and Johnson (6) in 1993, found that the type of AgNORS is more useful than the number, to differentiate among oral cavity carcinomatous, dysplastic, and reactive lesions; nevertheless, there was a possibility that those dysplastic lesions with a higher number and a greater dispersion would have greater risk of malignant transformation.

The relation between the quantification of AgNORs and cellular proliferation has been studied using immunohistochemical techniques with diverse substances such as Ki-67, the MIB-1, the PCNA (proliferative cell nuclear antigen) and bromodeoxiuridine, among others; with these, the transcriptional activity and the increased cellular metabolism can be observed (7, 8). Studies which have analyzed the monoclonal antibody Ki-67 have demonstrated it has a high confidence level for recognizing the presence of a nuclear antigen in proliferative cells and allows the identification of cells in the S phase of the cellular division cycle (9).

MATERIALS AND METHODS

This was a retrospective descriptive study. The sample population for the retrospective phase of the study was constituted by 60 biopsies selected at random and analyzed between 1990 and 1996 in the Pathology Laboratory of the School of Dentistry of the University of Antioquia. The sample had the following distribution: fifteen (15) had a histopathologic diagnosis of hyperkeratosis with mild epithelial dysplasia (DEL); fifteen (15) had a histopathologic diagnosis of hyperkeratosis with moderate epithelial dysplasia (DEM), corresponding to a clinical diagnosis of oral leukoplakia; the other thirty (30) had a diagnosis of oral invasive squamous cell carcinoma (CECO). In the prospective phase, the sample population were the patients who consulted the Unit of Maxillofacial Surgery and Stomatology at the University Hospital San Vicente de Paul (H.U.S.V.P.) in the city of Medellín, between August 1996 - December 1997, who had a clinical diagnosis of oral leukoplakia confirmed by a histopathological study which showed hyperkeratosis with DEL and CECO. In this phase DEM cases were not analyzed since only one biopsy had this report.

The biopsy sections were stained with silver colloid using the technique described by Ploton et al. in 1986 (10, 11) and they were processed immunohistochemically to mark the monoclonal antibody Ki-67 (Dako, California, code M-7187).

After staining the AgNORs the cells were observed under light microscope with a total magnification X 1000 and microphotographs were taken of at least 6 fields (those with the greatest concentration of AgNORs) separated among themselves by two 10 X fields. The color photographs were amplified to 13 x 18 centimeters and in them the number of AgNORs was counted and their distribution (type) was evaluated. The method to quantify the AgNORs was the one in which a cluster of AgNORs is counted as one.

The percentage of Ki-67 positive cells (Ki-67 (+)) was determined by using a light microscope with a magnification of X400 and by establishing in ten microscopic fields the average of Ki-67 (+) cells (i.e. cells with greater immunomarker intensity) and of negative cells (-) (i.e. those with no stain or mildly stained).

The variables used were the following: Number of AgNORs, distribution of AgNORs, percentage of Ki-67 positive cells, and evolution of leukoplakia and of the oral squamous cell carcinoma – only in the prospective phase -

Once the samples were stained and evaluated qualitatively and quantitatively, the analysis was carried out in the following way:

- Comparison of the number and type of AgNORs with each histopathologic diagnosis.
- Comparison between the percentage of Ki-67 (+) cells and each histopathologic diagnosis.
- Correlation among the number of AgNORs and the percentage of Ki-67(+) cells.
- Comparison between the number and type of AgNORs in the initial lesions vs. progressions and/or recurrences.
- Comparison between the percentage of Ki-67 (+) cells in the initial lesions vs. progressions and/or recurrences.

- Comparison between the number and type of AgNORs in the initial and final biopsies of the cases which did not progress.

STATISTIC METHODOLOGY

It was done according to the level of measurement of the variables, as follows:

- Summary measurements in quantitative variables (number of AgNORs and percentage of Ki-67(+) cells).
- Percentage of qualitative variables (distribution of AgNORs and evolution of diseases).
- Variance Analysis (ANOVA) and the Test of Multiple Ranges for samples of different size with a 95% level of confidence, used to compare the number of AgNORs and the percentage of Ki-67 (+) cells according to the diagnosis.
- Sperman's Simple Range Correlation to measure the degree of association between the number of AgNORs and the percentage of Ki-67(+) cells.

RESULTS

Number of AgNORs: See Figure 2. The averages for the number of AgNORs in DEL and in DEM are significantly different to the ones found in the cases of CECO, where there was an increase in the number. There was no significant statistical difference among the two degrees of dysplasias studied.

Distribution of AgNORs: In the three studied entities, the distribution of AgNORs (Figure 3) observed in both phases of our study, was predominantly the AgNORs type 1 in DEL (Figure 5a), AgNORs type 2 in CECO (Figure 6a), and in the cases of DEM AgNORs type 1.

Percentage of Ki-67(+) cells: Figure 4 shows the percentage average of Ki-67(+) cells for the three entities in each of the phases of our study. There was significant statistical difference between the averages of DEL (Figure 5b) and CECO (Figure 6b), and between DEM and CECO. There was no significant statistical difference among the two degrees of dysplasia.

Correlation between the number of AgNORs and the percentage of Ki-67(+) cells: Sperman's range analysis, determined that there was no significant correlation between the percentage Ki-67(+) cells and the number of AgNORs in any of the three lesions studied.

Recurrences and/or progressions: There were no cases of progression or recurrences in any of the lesions studied. For this reason, it was not necessary to analyze the correlation between the number and type of AgNORs and the percentage of Ki-67 (+) cells in initial lesions vs. the recurrences and the progressions.

DISCUSSION

The quantification, distribution, and morphometry of AgNORs in oral cavity lesions has been studied in various ways but not widely applied. Some of the studied lesions have

been squamous cell carcinoma, positive lesions for human papilloma virus, lichen planus, premalignant lesions with or without dysplasia, epithelial dysplasias, reactive lesions, benign keratoses, salivary gland lesions, odontogenic cysts and tumors (6, 12-15).

Our results are very similar to those reported by some authors, including the study carried out by Warnakulasuriya and Johnson (6) who analyzed the AgNORs in biopsies of carcinomatous, dysplastic, and reactive lesions in the oral cavity, with the purpose of determining if the AgNORs count was useful to differentiate between them. They found that the average count was higher in carcinomas, compared to epithelial dysplasias or to benign keratoses. According to these authors, the highest count found in most carcinomas was due to the dispersion of AgNORs within the nucleoplasm.

Kahn et al. (13) suggested that in oral premalignant lesions, the number of AgNORs can not be used as a diagnostic aid for the degrees of dysplasia in the oral mucosa. In a similar way, our results indicate that although the quantification of the AgNORs can be a subjective visual help when observing dysplasias under the light microscope, it is not an objective diagnostic aid for the degree of dysplasia in the oral mucosa. Even though the quantification of AgNORS is not a diagnostic parameter, it does increase in the active cell proliferation phases, when the number of haploid cells increases, and with increased transcriptional activity; this is why hormonal factors and virus infections, among others, affect their number (6, 7).

With respect to the distribution of the AgNORs, we found a progressive trend towards increasing their degree of dispersion within the nucleus, that is, an increase of AgNORS type 2 in DEM cases with respect to DEL cases. Among the reviewed literature we did not find any studies on oral lesions that has used this classification system; nevertheless, according to this degree of dispersion, those who have studied the type, report similar data to ours (6, 14). We also found a greater degree of dispersion of the AgNORS in carcinomatous lesions in both phases of our study, and in the DEM with type 2 distribution we also found a more irregular shape and a smaller size of the AgNORS. As it has been described in previous studies, the dispersion of AgNORS on the nucleoplasm seems to be an indicator of malignancy (4, 16).

With respect to the percentage of Ki-67(+) cells, our data differs from the findings of Saito et al. (17) who reported an average of 28.7% of Ki-67(+) cells in DEL, 30% in DEM and 63% in CECO. Probably the difference found in our study and other reports, is due to the influence of diverse factors in the sample processing and interpretation, which would have to be standardized for comparison (18,19). Our study showed no significant correlation between the number of AgNORS and the cell marker Ki-67 in any of the three studied lesions. This differs from other studies which have found a positive

correlation between these two markers in malignant tumors of diverse origin.

In this investigation, we found a greater average percentage of Ki-67(+) cells in the CECO cases, although it is lower than what has been reported in the literature, it indicates that cell proliferation activity is greater in these cases. This is possibly pointing towards a worse prognosis in such cases, as has been reported by other authors.

It is not possible to conclude on the usefulness of the AgNORS and Ki-67 in the progression analysis of the three diseases studied, due to the small number of cases in which it was possible to do a follow up.

CONCLUSIONS AND RECOMENDATIONS

1. The quantification and distribution of the AgNORS are subjective parameters and not diagnostic parameters of specific lesions, but they are useful as a complement to the histopathologic study to find the level of cellular and nuclear alterations. To a certain point, it could indicate the degree of malignancy and could guide the prognosis of premalignant lesions and CECO.

2. It could be speculated that when observing in a tissue section a variation in the AgNORS type (type 1 to type 2) we could think in the possibility of a malignant transformation of the lesion; additional studies are needed using the same distribution classification of the AgNORS in benign lesions of the oral cavity.

3. Longitudinal studies which take into consideration, not only, the number and distribution, but also the shape and volume of AgNORS using computerized and standardized techniques should be carried out to find the real prognostic use of the AgNORS in premalignant and malignant oral cavity lesions.

4. Unfortunately there is still an ongoing debate trying to find the most appropriate manual method to do the quantification of AgNORS and the percentage of Ki-67 (+) cells and what is really needed is a protocol for a standardized count.

5. In our study the percentage of Ki-67 (+) cells differs from other published studies, being controversial; to be able to compare results there must be a full control of all factors and processes that alter the technique.

CORRESPONDENCIA/CORRESPONDENCE

Gloria J. Álvarez Gómez
Facultad de Odontología Universidad de Antioquia
Calle 64 # 52 – 59 Medellín, Antioquia, Colombia
Tfno.: (94) 5106700. Fax: (94) 2631230
E-mail: gloria@alvarez.nu

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

1. Shiro T, Seki T, Naitoh Y, Inowe K, Okamura A.
2. Kling H, Lepore L, Krone W, Olert J, Sawatzki G.
3. Mourad WA, Erkman-Balis B, Livingston S, Shoukri M, Cox CE, Nicosia SV, et al.
4. Underwood JCE, Giri DD. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* 1988; 155: 95-6.
5. Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 1987; 151: 111-8.
6. Warnakulasuriya K, Johnson NW. Nucleolar organizer regions (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol Med* 1993; 22: 77-81.
7. Migaldi M, Criscuolo M, Zunarelli E, Lo Bianco L, Martinelli AM, Barbolini G.
8. Yue I, Iwai M, Furuta I. Evaluation of argyrophilic nucleolar organizer regions in tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, 1999; 35: 70-6.
9. Kuenen-Boumester V *et al.* Ki-67 staining in histological subtypes of breast carcinoma and fine needle aspiration smears. *J Clin Pathol*, 1991; 44: 208-10.
10. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ.
11. Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. New York, Churchill Livingstone 1996: 388-9.
12. Coleman HG, Altini M, Groeneveld HT. Nucleolar organizer regions (AgNORs) in odontogenic cysts and ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 436-40.
13. Kahn MA, Mincer HH, Dockter ME, Hermann-Petrin JM.
14. Sano K, Takahashi H, Fujita S, Inokuchi T, Pe MB, Okabe H et al.
15. Landini G. Nucleolar organizing regions (NORs) in pleomorphic adenomas of the salivary glands. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 257-60.
16. Howart AJ *et al.* Silver staining nucleoli and nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. *J Pathol*, 1988; 156: 227-32.
17. Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p-16, pRb, p-53, p-27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Path Med* 1999; 28: 226-32.
18. Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT. Diagnostic immunopathology. New York: Raven Press 1995: 669-84.
19. Xie X, De Angelis P, Clausen OP, Boysen M.