

Facultad de Medicina
Departamento de Morfología y Biología Celular
Oviedo-España

VALORACIÓN DE LAS REGIONES ORGANIZADORAS NUCLEARES EN LESIONES MELÁNICAS BENIGNAS Y MALIGNAS DE PIEL

Dr. Alfonso López-Muñiz,¹ Dr. Agustín Triviño López,² Dr. Luis Hernández González³ y Dr. Agustín Herrero Zapatero⁴

RESUMEN

Se valoraron las regiones organizadoras nucleares (AgNORs), especialmente el número de partículas por núcleo en *nevus* melanocíticos y en melanomas malignos, y su correlación con los factores pronósticos y la supervivencia. Se estudiaron 29 casos de melanoma maligno en fase de crecimiento vertical (MMFCV), 30 *nevus* melanocíticos (20 intradérmicos y 10 compuestos) y 30 biopsias cutáneas sanas. Se halló que en piel normal y en NM, el número de partículas de AgNORs por célula era, respectivamente, $1,22 \pm 0,41$ y $1,35 \pm 0,54$ (menos 3 por núcleo), que los AgNORs estaban bien definidos, pequeños e independientes. Los AgNORs por núcleo en los MMFCV mostraba un número de $8,02 \pm 5,31$ y su morfología estaba mal definida, mayor tamaño y tendencia a confluir. El número de AgNORs en los MMFCV depende significativamente del espesor (Breslow) y del número de mitosis, pero resulta independiente del nivel infiltrante (Clark) del tumor. El número de AgNORs estaba correlacionado con la supervivencia teórica, pero era independiente de la supervivencia real. Estos resultados sugieren que los AgNORs, especialmente su número y morfología, es un claro indicador diagnóstico y tiene interés como parámetro pronóstico en los MMFCV, es además una técnica rápida, barata y asequible, por lo cual debe incorporarse a la rutina oncológica del melanoma maligno.

DeCS: REGION ORGANIZADORA DEL NUCLEOLO; NEVO PIGMENTADO; MELANOMA/diagnóstico; MELANOMA/patología; TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DIAGNOSTICOS; NEOPLASMAS CUTANEOS; TASA DE SUPERVIVENCIA.

La evolución de los melanomas en fase de crecimiento vertical es discutida, el grosor de los melanomas malignos es el fac-

tor pronóstico más fiable, lo que evidencia la necesidad de desarrollar nuevos parámetros biológicos. Por este motivo se

¹ Director del Departamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo.

² Anatomopatólogo. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Central Universitario de Asturias. Oviedo. E-SPAIN.

³ Profesor de Anatomía. Departamento de Morfología y Biología Celular. Facultad de Medicina.

⁴ Catedrático de la Universidad. Jefe del Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Central Universitario. Oviedo. SPAIN.

han buscado distintas técnicas que permitan vaticinar la evolución tumoral, entre las que destaca la técnica de los organizadores nucleolares argirófilos, por ser una técnica rápida y económica con alta fiabilidad.

Las regiones organizadoras del nucléolo (NORs) son bucles de ADN ribosómico (ADNr) que tienen por misión la codificación del ARN ribosómico para realizar la síntesis de las proteínas.¹ Los NORs han sido localizados mediante técnicas de hibridación *in situ*, en las constricciones secundarias de los cromosomas acrocéntricos.² Estos NORs han podido ser demostrados mediante técnicas de tinción de plata (AgNOR), por la argirofilia de algunas de las proteínas asociadas a los NORs (NORAPs),³ con este vínculo se conoce la proteína RNA polimerasa I, nucleolina (c23), B23, Mr58K, Mr80K y Mr40K 12.²

La distinción entre linfomas de alto y bajo grado de malignidad ha sido una de las primeras aplicaciones de la técnica de cuantificación de AGNORS.⁴ La expresión de los AgNORs también ha sido empleada en carcinomas de distintas localizaciones (mamarios, glandulares, orales, renales, vesicales, faríngeos, mielomas...), se emplea para diferenciar entre lesiones benignas y malignas, así como para establecer el grado de malignidad y el consecuente pronóstico.⁵⁻⁷ Nosotros empleamos esta técnica en la valoración de lesiones orales premalignas, en carcinomas orales de células escamosas⁸ y en lesiones benignas y malignas de mama en comparación con el p53⁹ y hemos obtenido sugerentes resultados sobre su interés pronóstico.

El objeto fundamental del trabajo consiste en valorar los resultados alcanzados al aplicar el estudio morfológico y el posterior análisis cuantitativo de las regiones organizadoras nucleolares (AgNORs) en

lesiones melánicas benignas y en melanomas malignos en fase de crecimiento y establecer su capacidad pronóstica en el melanoma maligno.

MÉTODOS

Se han estudiado 59 lesiones melánicas benignas y malignas de piel. Las benignas han sido 30 lesiones melanocíticas benignas (20 nevus melanocíticos intradérmicos y 10 *nevus* melanocíticos compuestos).

Las lesiones malignas recogidas han sido 29 melanomas malignos en fase de crecimiento vertical (MMFCV): 14 melanomas de extensión superficial, 9 tipo melanoma léntigo maligno, 3 melanomas lentiginosos acrales y 3 melanomas nodulares. Todos ellos fueron diagnosticados básicamente por métodos histológicos rutinarios, los analizaron 2 observadores distintos. Todos estos pacientes eran de raza blanca. La edad de los pacientes con melanoma maligno variaba desde los 26 a los 91 años, 8 casos del sexo masculino y los 21 casos restantes del femenino. En ningún caso había constancia de antecedentes familiares o personales de melanoma maligno ni de *nevus* displásico. En 18 de los 29 casos de MMFCV se pudo realizar un seguimiento superior a 5 años.

Los tumores se valoraron mediante parámetros clásicos: estudio del espesor tumoral o grosor del tumor expresado en milímetros (Breslow), nivel de infiltración según la clasificación de Clark (5 niveles) y la presencia de mitosis considerada positiva si había más de una mitosis por campo de gran aumento (600x).

La supervivencia se analizó por 2 métodos: Supervivencia teórica de la serie de MMFCV (mediante un análisis del grosor de los tumores comparándole con la supervivencia descrita en otras series); y

supervivencia renal, relacionando la misma con el número de AgNORs en los pacientes cuyo seguimiento fue al menos de 5 años (18 de los 29 casos).

El procedimiento para la técnica de los organizadores nucleolares argirófilos, según la metodología de *Ploton et al*,¹⁰ se realiza incubándose las preparaciones durante 30 min a 37° en una cámara húmeda en una mezcla compuesta por 2 partes de una solución A (gelatina al 1 % en ácido fórmico) y una parte de la solución B (solución acuosa de nitrato de plata). Para la valoración de los NORs, las preparaciones fueron estudiadas en un microscopio marca Leitz Wetzlar 307-148 con objetivo de inmersión, 100X, se cuantifica el número de AgNORs en cada célula, se seleccionan 100 núcleos tumorales en cada caso (los núcleos que no mostraban AgNORs discernibles fueron excluidos). El microscopio fue equipado con 2 cabezales y los contajes fueron realizados por separado por dos observadores.

Análisis estadístico: Para el estudio comparativo de las medias de las muestras en las distintas variables cuantitativas continuas, se utilizó la "t" de Student-Fisher, tanto para datos independientes como para datos apareados. Previamente se realizó análisis de la varianza de las muestras como condicionantes de validez de esta prueba paramétrica. También se empleó como prueba no paramétrica el modelo de la regresión múltiple para la supervivencia real y la supervivencia teórica con el número de AgNORs (en cada uno de los casos se comparó el número de gránulos de AgNORs con la supervivencia real en meses y la supervivencia teórica en meses).¹¹

RESULTADOS

PIEL NORMAL: AgNORs

En la piel normal es fácil demostrar AgNORs (en los 30 casos). En algunos

casos fue preciso distinguir las micropartículas de melanina con los auténticos AgNORs (2 de los 30 casos). Las partículas AgNORs eran de pequeño tamaño, simples y bien delimitadas. El número de partículas variaba entre 1-3 ($1,22 \pm 0,41$).

NEVUS MELANOCÍTICOS: AgNORs

Se ha podido valorar el número de AgNORs en el 96,66 % de los casos de *nevus* (29 de los 30 casos). En el caso restante, la presencia de micropartículas de melanina se confundía con los auténticos AgNORs. Las micropartículas AgNORs eran de pequeñas dimensiones, independientes y con claros límites, con un modelo similar al observado en los controles. El número de partículas AgNORs osciló entre 1 y 3 ($1,35 \pm 0,54$). La valoración de los AgNORs, se hacía mejor en aquellos localizados en células de las tecas más superficiales de los *nevus* melanocíticos que en los de ubicación más profunda.

La variación en el número de AgNORs entre los *nevus* melanocíticos y la piel sana no es significativa ($t=0,1566, p > 0,05$).

MELANOMA MALIGNO: AgNORs

La técnica para AgNORs se pudo valorar en los 29 MM. El análisis *de visu* de los AgNORs en los melanomas malignos mostró un nuevo modelo con presencia de mayor número, tamaño e irregularidad que en las lesiones benignas, en ellos se observa tendencia a la agregación de las partículas de AgNORs, que en las lesiones benignas. La presencia de pigmento melánico en grandes cantidades dificultaba en algunos casos el recuento de las partículas argirófilas (es más fácil su valoración por

los bordes de la lesión). Se observó un mayor número de AgNORs en aquellas células que presentaban nucléolos grandes. El estudio citométrico aportó que el número de AgNORs por célula tenía una media de $8,02 \pm 5,31$. En la mayoría de los casos, el recuento de los AgNORs variaba, dependiendo del tamaño de los mismos, entre 5 y 20 por núcleo, aunque cuando eran tan abundantes, los AgNORs se manifestaban como micropuntos difícilmente calculables pues tendían a confluir. También se estimó que en las células de predominio epitelioide, los AgNORs se contabilizaban con mayor facilidad que en el componente fusocelular.

Las diferencias en el número de AgNORs fueron muy significativas entre el tejido sano y el melanoma maligno ($t=8,5836$, $p<0,001$); y entre los *nevus* melanocíticos y los melanomas malignos ($t=7,9523$, $p<0,001$).

MELANOMA MALIGNO: PARÁMETROS MORFOLÓGICOS PRONÓSTICOS

La infiltración tumoral variaba entre 0,73 mm y 10,2 mm (5 casos tenían un grosor menor de 3 mm y los 24 casos restantes un grosor mayor de 3 mm).

Según la clasificación de Clark: 6 casos se encontraban en el nivel 2; 9 en el nivel 3; 8 en el nivel 4 y 6 en el 5.

El índice mitótico era positivo en todos los melanomas malignos observados, se pudo clasificar entre escasamente positivo: menos de 3 mitosis por campo (en 6 casos) y muy positivo: más de 3 mitosis por campo (23 casos).

MELANOMAS MALIGNOS: PARÁMETROS MORFOLÓGICOS PRONÓSTICOS Y AgNORs

Los tumores de menos de 3 mm tenían menor número de partículas de

AgNORs que los tumores de más de 3 mm (tabla 1). Esta variación es estadísticamente significativa para $p<0,05$, aunque no significativa para $p<0,01$ (tabla 2).

TABLA 1.

-3 mm (5 casos)	5,13 \pm 2,82
+3 mm (24 casos)	8,62 \pm 4,74
Nivel 2 de Clark (6 casos)	5,14 \pm 2,92
Nivel 3 de Clark (9 casos)	7,34 \pm 3,96
Nivel 4 de Clark (8 casos)	8,72 \pm 4,70
Nivel 5 de Clark (6 casos)	10,98 \pm 6,16
Índice mitótico -/+ (6 casos)	5,02 \pm 2,76
Índice mitótico +++ (23 casos)	8,81 \pm 4,84

TABLA 2. Valor de la *t* de Student y grado de significación de las variaciones en el número de AgNORs

-3 mm (5 casos)	
+ 3 mm (24 casos)	$t = 1,748$; $p < 0,05$ / $p > 0,01$ *
Nivel 2 de Clark (6 casos)	Nivel 2/3: $t = 1,085$; $p > 0,05$ Nivel 2/4: $t = 1,521$; $p > 0,05$
Nivel 3 de Clark (9 casos)	Nivel 2/5: $t = 3,153$; $p < 0,05$ * Nivel 3/4: $t = 0,617$; $p > 0,05$
Nivel 4 de Clark (8 casos)	Nivel 3/5: $t = 1,298$; $p > 0,05$ Nivel 4/5: $t = 0,721$; $p > 0,05$
Nivel 5 de Clark (6 casos)	
Índice mitótico -/+ (6 casos)	
Índice mitótico +++ (23 casos)	$t = 1,777$; $p < 0,05$ / $p > 0,01$ *

*Dependencia estadísticamente significativa.

El número de partículas de AgNORs era mayor al aumentar el nivel de infiltración (tabla 1). El análisis de la varianza demostró diferencias significativas en esta muestra, pero estas se limitaban al comparar los melanomas de nivel de infiltración 2 con del nivel 5 (tabla 2).

El número de partículas de AgNORs era más elevado en los melanomas malignos con mayor número de mitosis (tabla 1). Esta diferencia es significativa (tabla 2).

MELANOMAS MALIGNOS: SUPERVIVENCIAS Y AgNORs

El estudio de la regresión entre el número de AgNORs y la supervivencia teórica

reflejaba una relación estadísticamente significativa para $p < 0,05$; pero no para $p < 0,01$ (tabla 3). La supervivencia real documentada en el seguimiento clínico de 18 casos no mostró dependencia significativa con el número de AgNORs (tabla 3).

TABLA 3. Relación entre las supervivencias real y teórica y el número de AgNORs

	Número AgNORs	Número AgNORs	Número AgNORs
Supervivencia teórica	$r=0,38$	$t=2,13466$	$p < 0,05$ $p > 0,01$
Supervivencia real	$r=0,31$	$t=1,49397$	$p > 0,05$

r: Coeficiente de correlación múltiple. t: t de Student. p: Grado de significación.

DISCUSIÓN

La aplicación de métodos morfológicos al estudio de la proliferación celular está sujeta a variantes que se pueden escapar a cualquier observador. Actualmente, es preciso no limitarse a la demostración de un marcaje sino establecer métodos cuantitativos que permitan objetividad en su evaluación, lo cual permitirá además de establecer un acertado diagnóstico, conocer la evolución pronóstica e incluso proponer actitudes terapéuticas.

El modelo morfológico de AgNORs era diferente entre **piel sana/lesión benigna y melanoma maligno**. En el primer grupo, las partículas estaban bien delimitadas, definidas y eran pequeñas; mientras que en el segundo, los conglomerados tenían tendencia a confluir, estaban mal delimitados y eran de mayor tamaño. Esta diferencia en su presentación ratifica los hallazgos de otros autores,^{12,13} aunque para los mismos resultaría insuficiente este dato para un diagnóstico exacto.¹²

El número de AgNORs en las células epidérmicas **de biopsias normales y de las lesiones névicas benignas**, tanto en los estratos basales como en intermedios, es generalmente igual o inferior a 3 por célula, dato paralelo a lo observado por otros autores en lesiones premalignas, primarias o benignas.¹⁴ Por el contrario, en nuestros resultados, el número de gránulos de AgNORs en los **melanomas malignos** es siempre superior a 3. Este resultado concuerda con anteriores estudios que han descrito un número variable de AgNORs por núcleo celular (más de 4,26,¹⁴ más de 5,3;¹⁵ media de $7,65 \pm 2,35$ en la fase de crecimiento vertical;¹⁶ media de $5,44 \pm 1,70$ en fase de crecimiento horizontal;¹⁶ más de 3,73,¹⁷ media de $4,889 \pm 1,403$ ¹⁸ ...). Este parámetro resulta muy significativo, hasta el punto que coincidimos con los autores que piensan que un simple conteo de los AgNORs sirve para establecer el diagnóstico entre una lesión benigna y un melanoma maligno.¹³ Sin embargo para este autor, el simple parámetro numérico no tendría valor diferencial entre los *nevus* displásicos, *nevus* de Spitz y melanoma maligno, aunque sería significativo al combinarse con el tamaño y el modelo de dispersión.¹³

El **valor pronóstico de los AgNORs** en los melanomas malignos es muy discutido. En un seguimiento durante 73 meses de las metástasis de pacientes con melanoma maligno se observó una diferencia significativa en el número de AgNORs según hubiese o no metástasis, hasta el punto que si el número de estos era superior a 3,62 había 82 % de probabilidades de que apareciesen metástasis;¹⁸ teniendo para este autor los AgNORs un valor pronóstico superior al nivel de Clark o al grosor de Breslow.¹⁸ Por el contrario, otros autores no encontraron valor pronós-

tico al no existir diferencias significativas, en el número de AgNORs entre pacientes que estaban sanos y pacientes fallecidos a los 5 años¹⁷ o según la evolución de las metástasis.¹⁵ Sin embargo, para la mayoría de los autores, el valor pronóstico de los AgNORs en el melanoma maligno no se conoce suficientemente y es necesario realizar nuevos estudios que establezcan su significación.^{13,19,20}

En nuestro trabajo, al establecer la correlación entre los parámetros pronósticos clásicos y el número de AgNORs, hemos encontrado dependencia de los AgNORs con el grosor del melanoma (Breslow) y con el número de mitosis, pero no con el nivel de infiltración de Clark (salvo en los casos extremos), lo que ratifica otros estudios.²⁰ Estos resultados muestran que un elevado número de AgNORs es signo de mal pronóstico en la evolución de los melanomas malignos. Por otro lado, la supervivencia teórica también es dependiente de los AgNORs mientras que la supervivencia real fue independiente. Este hecho se puede explicar porque la supervivencia teórica se calcula según el grosor del tumor, que ya hemos indicado sufre

cambios significativos; mientras que la supervivencia real, aunque muestra marcadas variaciones, estas no resultan significativas posiblemente por el poco número de casos del que pudimos disponer. En cualquier caso, ambos parámetros señalarían que el número de AgNORs sería un indicador de mal pronóstico en los melanomas malignos.

Como **conclusiones**, se destaca que a la vista de los resultados expuestos, nos parece indicado emplear la técnica descrita para establecer parámetros estrictos de benignidad o malignidad en las lesiones melanocíticas. Aunque en el diagnóstico de proliferaciones melánicas benignas o malignas los pilares clásicos microscópicos siguen siendo interesantes, esta técnica debe añadirse en la rutina histopatológica de los melanomas malignos por su valor pronóstico, pero su uso debe ser combinado con técnicas citométricas, que aporten datos cuantitativos. Además, esta técnica, a diferencia de las histoinmunológicas o moleculares, *es muy sencilla, barata, rápida, reproducible*, fácilmente disponible y asequible.

SUMMARY

Nucleolar organizer regions (AgNORs) were assessed, specially the number of particles by nucleus in melanocytic nevus (MN) and malignant melanomas, and their correlation with prognostic factors and survival rate. Twenty-nine cases of malignant melanoma in vertically growth phase (MMVGPh), 30 melanocytic nevus (20 intradermal and 10 compound) and 30 healthy skin biopsies were studied. It was found that in normal fact and in MN the number of AgNORs particles per cell was $1,22 \pm 0,41$ and $1,35 \pm 0,54$ respectively and that AgNORs were well-defined, small and independent whereas AgNORs per nucleus in MMVGPh showed $8,02 \pm 5,31$ and were poorly-defined, bigger and tending to converging. The number of AgNORs in MMVGPh greatly depends on thickness (Breslow) and number of mitoses but is not associated with the infiltrating level clark of a tumor. The number of AgNORs was correlated with theoretical survival rate but not with the real survival rate. These results suggest that the number and morphology of AgNORs are specially a clear indication which is of interest as a prognostic factor in MMVGPh and also a rapid, cheap and accessible technique; therefore, it should be incorporated to the oncologic routine procedure of malignant melanoma.

Subject headings: NUCLEOLUS ORGANIZER REGION; NEVUS, PIGMENTED; MELANOMA/diagnosis; MELANOMA/pathology; LABORATORY TECHNIQUES AND PROCEDURES; SKIN NEOPLASMS; SURVIVAL RATE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NORs. A new method for the pathologist. *Lancet* 1987;1:1413-4.
2. Morton CC, Brown JA, Holmes WN, Nance WE, Wolfe B. Stain intensity of human nucleolus organizer regions reflects incorporation of uridine into mature ribosomal RNA. *Exp Cell Res* 1983;145:405-13.
3. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ. How should we count AgNORs?. Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989;158:185-8.
4. Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 1987;151:111-8.
5. Kumar A, Kushwaha AK, Kumar M, Gupta S. Argyrophilic nucleolar organizer regions: their value and correlation with clinical prognostic factors in breast carcinoma. *J Surg Oncol* 1997;65:201-4.
6. Willie FP, Heerden WFP van, Raubenheimer EJ. Evaluation of the nucleolar organizer regions associated proteins in minor salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med* 1991;20:291-5.
7. Pich A, Chiusa L, Margaria E. Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis. *Cancer Detect Prev* 1995;19:282-91.
8. Anitua MJ, López-Muñiz A, Bardán J, García Pola MJ. Análisis cuantitativo de las regiones organizadoras nucleolares (AgNORs) en lesiones orales premalignas y en carcinomas orales de células escamosas. *Stoma* 1997;44:41-8.
9. López-Muñiz A, Triviño A, Hernández L, Pérez A, Bengoechea E, Clarós I. Expresión p53 en lesiones benignas y malignas de mama. Análisis inmunocitoquímico semicuantitativo y su correlación con factores morfológicos y pronósticos. *Oncología* 1997;20:11-8.
10. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet, JJ. Improvement in the staining and visualization of argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986;18:5-14.
11. Kleinbaum DG, Kuipper LL, Muller KE. Basic statistics, the correlation coefficient and straightline analysis. En: Kent PWA, ed. *Applied regression analysis and other multivariate methods*. Boston: PW Kent, 1998:335-717.
12. Fallowfield ME, Cook MG. The value of nucleolar organizer regions staining in the differential diagnosis of borderline melanocytic lesions. *Histopathology* 1989;14:299-304.
13. Pfau A, Eckert F, Schropfer T, Ruschoff J. Value of nucleolus organizer regions (AgNORs) in dermatologic oncology. *Hautarzt* 1994;45:762-8.
14. Naik R, Raghuvver CV, Jacob DL. Silver staining nucleolar organizer region (AgNOR) study in melanocytic skin tumours. *J Indian Med Assoc* 1997;95:420-1.
15. Howat AJ, Giri DD, Wright AL, Underwood JC. Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer region counts are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. *J Pathol* 1988;156:227-32.
16. Albrecht S, Jambrosic JA, Kahn HJ. Nucleolar organizer regions in superficial spreading melanoma with nodule. *Mod Pathol* 1989;2:666-70.
17. Ronan SG, Farolan MJ, McDonald A, Manaligod JR, Das Gupta TK. Prognostic significance of nucleolar organizer regions (NORS) in malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1994;21:494-9.
18. Gambini C, Casazza S, Borgiani L, Canepa M, Rovida S, Rongioletti F, et al. Counting the nucleolar organizer region-associated proteins is a prognostic clue of malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1992;128:487-90.
19. Nagatani T, Iemoto G, Miyakawa K, Ichiyama S, Takahashi Y, Uchiyama M, et al. AgNOR (nucleolar organizer regions) staining in malignant melanoma. *J Dermatol* 1991;18:731-5.
20. Barzilai A, Goldberg I, Yulash M, Pavlotsky F, Zuckerman A, Trau H, et al. Silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as a prognostic value in malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1998;20:473-7.

Recibido: 6 de julio de 2000. Aprobado: 26 de diciembre de 2000.

Dr. Alfonso López-Muñiz. Departamento de Morfología y Biología Celular. Facultad de Medicina. Oviedo, España.