

135



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CUANTIFICACION DE LAS REGIONES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES Y ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL NUCLEOLO EN TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL; RELACION CON LOS GRADOS DE MALIGNIDAD.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

CONCEPCION NAVA RUIZ

ASESOR: M. En C. ALMA ORTIZ PLATA

MEXICO, D. F.



288047

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

- A LOS MIEMBROS DEL H. JURADO POR LA REVISION DE ESTE TRABAJO Y LAS VALIOSAS APORTACIONES QUE HICIERON AL MISMO PARA LLEGAR A SU CONCLUSIÓN:

M. en C. ALMA ORTIZ PLATA

M. en C. PILAR TORRES

M. en C. MARCO ANTONIO GONZALEZ JIMENEZ

DR. DANIEL REMBAO BOJORQUEZ

BIOL. TERESA SOSA RODRIGUEZ

- UN AGRADECIMIENTO MUY ESPECIAL Y CON TODO MI CARÍÑO PARA LA DRA. FERNANDA TEIXEIRA, POR ENSEÑARNOS A APRECIAR Y A DEFENDER LO QUE SOMOS Y LO QUE HACEMOS.

- A VIKTOR ROMERO PORQUE SIEMPRE QUE LO NECESITE ME APOYO INCONDICIONALMENTE, TANTO ACADEMICAMENTE COMO CON SU AMISTAD.

- A AIDA GUZMAN Y A TERESA URIBE POR TODO SU COMPAÑERISMO Y APOYO.

## **ESTE TRABAJO ES DEDICADO:**

- A MIS PADRES, PORQUE SU MEJOR HERENCIA FUERON SUS ENSEÑANZAS, AMOR Y DEDICACION, ENSEÑÁNDOME CON ESTO A CRECER POR MI MISMA E INTENTAR VENCER EL MIEDO DE IR SOLA POR LA VIDA.

- A MI HERMANO MARIO POR EL SIGNIFICADO QUE TUVO SU PRESENCIA EN MI VIDA YA QUE SIN SU CONFIANZA, APOYO Y CARIÑO NO HUBIERA LOGRADO LO POCO O MUCHO QUE HOY SOY, NO IMPORTA EN DONDE SE ENCUENTRE, YO SE QUE SIEMPRE ESTARA CONMIGO.

- A MIS HERMANOS: ELIA, LIDIA, ENRIQUETA, JOSE E ISABEL PORQUE SIN SU APOYO, EN TODOS LOS SENTIDOS, NUNCA HUBIERA TERMINADO MIS ESTUDIOS.

- A MIS AMIGOS ALEIDA, ZAYIL, CAROLINA, HILDA, NANCY, SALVADOR, JAVIER, CARLOS, LORENA, PATRICIA, GEORGINA, LETICIA Y MA. LUISA POR FORMAR EL GRUPO UNIVERSITARIO DE AMIGOS MAS ENTRAÑABLE, Y PORQUE ACTUALMENTE SON COMO PARTE DE MI FAMILIA.

- A MIS AMIGOS DEL INSTITUTO DE NEUROLOGÍA: MARIO, MARISELA, JUANITA, FERNANDO, MINERVA, LAURITA, ANA JULIA Y QUIQUE, PORQUE TODOS ELLOS CON SU APOYO Y CARIÑO ME ANIMARON (ME ESTUVIERON MOLESTANDO CADA VEZ QUE PODIAN) A TERMINAR CON MI TRABAJO, HACIENDOME VER EL LADO BUENO DE LAS COSAS MALAS.

## INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
1. Antecedentes	2
2. Generalidades	4
a) Sistema nervioso	4
b) Alteraciones del sistema nervioso	6
3. Núcleo	8
4. Nucléolo	13
5. Regiones Organizadoras Nucleolares	15
III. HIPOTESIS	17
IV. OBJETIVOS	17
V. MATERIAL Y METODO	18
a) Microscopía de luz	18
b) Microscopía electrónica	19
VI. RESULTADOS	20
a) Cuantificación de las Regiones Organizadoras Nucleolares	22
b) Análisis Ultraestructural	28
VII. DISCUSION	37
VIII. CONCLUSIONES	43
IX. BIBLIOGRAFIA	44

## I. RESUMEN

Se sabe que las regiones organizadoras nucleolares (RON) son una parte esencial de la maquinaria del nucléolo, éstas pueden ser vistas a nivel de microscopía de luz, usando una técnica argéntica, la cual es afin a proteínas asociadas a las regiones organizadoras nucleolares (RON), conocidas como AgNOR. Las AgNOR están involucradas en la producción de ribosomas y potencialmente en cambios cuali y cuantitativos. En interfase pueden ser visibles en relación a la actividad proliferativa o de transformación, observándose como una sola estructura conocida como nucléolo. En situaciones de normalidad podemos encontrar 1 o 2 nucléolos por núcleo.

A través de microscopía electrónica, pueden apreciarse los cambios del nucléolo en situaciones anormales, como es el caso de los tumores, haciendo un análisis de sus componentes.

En este trabajo se realizó un estudio sobre 16 muestras de tumores del sistema nervioso central con diferente origen celular, las cuales fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía; estos tumores fueron procesados para microscopía de luz y microscopía electrónica: para ser diagnosticados, determinar su grado de malignidad y observar los cambios ocurridos en los elementos nucleolares a nivel ultraestructural, encontrándose que existe un incremento estadísticamente significativo en el número de AgNOR por núcleo en tumores que presentan un grado de malignidad histológicamente más alto, por el contrario, cuando el tejido mostró características neoplásicas o marcada desdiferenciación de acuerdo a su sitio de origen, entonces se observaron números bajos de AgNOR.

Con respecto a la microscopía electrónica, el componente fibrilar denso fué el que predominó en los tejidos con mayor grado de malignidad, es decir, el componente que corresponde al lugar en donde se lleva a cabo la transcripción de genes de ADNr, en cambio en los tejidos con menor grado de malignidad el componente predominante fué el granular que estructuralmente corresponde a las unidades prerribosómicas.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan nuestra hipótesis de que un número mayor de AgNOR, es indicativo de que también existe un mayor grado histológico de malignidad en el tejido.

## II. INTRODUCCION.

### 1. Antecedentes.

El nucléolo fué descrito por primera vez por Fontana en 1781, y ya hacia fines del siglo pasado se especuló acerca de la relación entre el tamaño del nucléolo y la actividad sintética de la célula, ya que en las células que mostraban poca actividad sintética como espermatozoides, blastómeras o células musculares, los nucléolos eran pequeños o habían desaparecido, en cambio en células con alta actividad sintética como los ovocitos, neuronas o células secretoras los nucléolos eran voluminosos (De Robertis, 1983). Y precisamente porque se creyó advertir esta situación se comenzó a investigar la relación existente entre las células normales y las de tejido en circunstancias patológicas extremas, con la consecuente observación del núcleo y nucléolo en un intento por obtener información adicional del estado de la célula en estas circunstancias.

De acuerdo a un estudio realizado en 1964, se obtuvo evidencia directa de que el nucléolo es el responsable de la síntesis de los ARNs ribosómicos, ésto se observó cuando se utilizaron tres tipos de *Xenopus laevis*: una especie silvestre de sapo que contiene 2 nucléolos por núcleo (2-nu), un mutante heterocigoto que tiene solo un nucléolo (1-nu) y un mutante homocigoto que carece de nucléolo (0-nu), cuando se cruzan dos heterocigotos 1-nu el 25% de la progenie es 0-nu y esta condición es letal ya que los organismos mueren a la semana de haber nacido. Lo que quiere decir que el ARN que los había mantenido antes de su muerte se obtuvo del citoplasma del huevo (en un huevo de *Xenopus* hay  $10^{12}$  ribosomas) (Robertis, 1983).

La estructura nucleolar puede variar en los diferentes estados de las células de un mismo tejido compactándose y perdiendo su disposición nucleolonemal (Vázquez Nín, 1979). Así mismo, en las células en proliferación el nucléolo, en los primeros estadios del ciclo celular (telofase y principios de G-1), presenta esta configuración compacta no nucleolonemal. En muchas células cancerosas o tratadas con sustancias que alteran la transcripción y/o el procesamiento postranscripcional del ARN, existen también nucléolos de este tipo de configuración compacta (Busch y Smetana, 1970). Consecuentemente ha habido creciente

interés por conocer el estado de la célula en estas condiciones, pero en especial el del núcleo y marcadores de proliferación. Uno de los aspectos de interés es el estudio de las Regiones Organizadoras Nucleolares (RON), llamadas así por B. McClinton en 1935, debido a que hay evidencia de que la diferenciación celular por sí misma afecta a las RON pero que, en general, el nivel de proliferación celular parece tener la principal influencia sobre ellos.

En anteriores trabajos, se ha utilizado la impregnación argéntica como un método confiable y rápido para identificar diferentes neoplasias, además de ser un elemento útil en el diagnóstico diferencial de éstas sobre las que no existe un total acuerdo (Wistuba y col. 1993). Entre las técnicas que usan la impregnación argéntica está la llamada AgNOR, la cual es específica para localizar las Regiones Organizadoras Nucleolares. De esta manera, se han obtenido resultados confiables, ya que éstos han sido comparados con pruebas más elaboradas, específicas y costosas, llegando siempre a la conclusión de que la técnica de AgNOR es realmente útil. Las pruebas contra las que ha sido comparada esta técnica son: Expresión del antígeno Ki-67, el cual es un marcador de proliferación celular, hibridación de ADN, inmunolocalización a nivel de microscopía electrónica o inmunofluorescencia (Hall y col, 1998; Hara y col, 1991a; Schedle y col. 1992).

Los estudios realizados con esta técnica han sido hechos en tumores, que son de diferente origen tomando en cuenta solamente su grado de malignidad y se ha encontrado un incremento en el número de regiones organizadoras nucleolares por núcleo en aquellos tumores que presentan un grado de malignidad alto, por el contrario si el tejido no presenta características neoplásicas o marcada desdiferenciación de acuerdo a su sitio de origen, entonces lo que se observa son números bajos de regiones organizadoras nucleolares (Siraisi, 1991).

La microscopía electrónica, es un apoyo importante en el diagnóstico de tumores como complemento de lo observado en la microscopía de luz, principalmente en aquellos casos que no pueden ser resueltos únicamente por este medio. Esto es debido a que el microscopio electrónico proporciona una información más detallada acerca del

comportamiento celular además de ofrecer la posibilidad de la aplicación de otras técnicas para resaltar estructuras que sean de particular interés (Henderson, 1986). Bajo el microscopio electrónico los diferentes tipos de tumores presentan características particulares o específicas, estas características involucran cambios en la morfología y tamaño celular, así como la modificación de sus componentes en la mayoría de los organelos que constituyen a una célula normal como es el caso del núcleo y el nucléolo, de los cuales se reportan alteraciones a nivel ultraestructural, pero no de manera específica. La información acerca del nucléolo o sus componentes en células de tejido tumoral, es escasa y no se refiere en detalle (Henderson, 1986).

De acuerdo a un trabajo que se realizó para comparar, a nivel ultraestructural, los componentes nucleolares de diferentes melanomas, se encontró que existían diferencias en los centros fibrilares de los nucléolos, los cuales corresponden a las regiones organizadoras nucleolares (Derinzini, 1986).

## **2. Generalidades**

### **a) Sistema Nervioso.**

El sistema nervioso tiene como función la comunicación, la cual depende de la capacidad particular de las células nerviosas y de sus prolongaciones de producir y transmitir señales. El sistema nervioso está dividido en 2 partes de acuerdo a su función: Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP). El SNC está constituido por el encéfalo y la médula espinal, contiene gran número de células nerviosas o neuronas. Todos los elementos del SNC se encuentran distribuidos en la sustancia gris y en la sustancia blanca. En la gris se encuentran los cuerpos celulares de las neuronas, sus dendritas y las porciones proximales de los axones; rodeando a la sustancia gris, hay una zona desprovista de cuerpos neuronales, que contiene los axones de las neuronas cuyos cuerpos están

localizados en la sustancia gris o fuera del SNC, esta zona es la sustancia blanca, llamada así porque los axones aquí están revestidos de mielina que tiene un color blanco brillante.

La célula nerviosa o neurona es generalmente una célula grande (hasta  $150\mu\text{m}$ ) al igual que su núcleo ( $5\text{-}10\mu\text{m}$ ), que se observa esférico o ligeramente ovoide, situado en el centro de la célula y, en la mayor parte de los casos, hay un nucléolo con muy pocas partículas de heterocromatina. En el citoplasma se encuentran el citoesqueleto neuronal, los cuerpos de Nissl, el aparato de Golgi, los centriolos y algunas inclusiones. Posee largas ramificaciones citoplásmicas que en casi todas las neuronas son de dos tipos: Dendritas y Axones. Las dendritas son sensitivas y proporcionan la mayor parte de la superficie receptora de la neurona y pueden ser prolongaciones directas del cuerpo neuronal o arborizaciones distantes, juegan un papel determinante en la capacidad de las neuronas para integrar la información recibida desde muchos orígenes diferentes, en la mayoría de las neuronas las dendritas son cortas y pueden tener formas variables. En las neuronas se observa un solo axón, con una función motora, el cual es el encargado de transportar la respuesta de la neurona en forma de un potencial propagado. Un mismo axón puede terminar de diferentes maneras y hacer contactos sinápticos con muchas neuronas diferentes.

El SNC está formado también por células de soporte no nerviosas llamadas células neurogliales (Neuroglía) y células microgliales (Microglia). Las células neurogliales están representadas por los **Astrocitos** y los **Oligodendrocitos**. Los astrocitos son de dos clases: **Protoplasmáticos** y **Fibrosos**: Los **Astrocitos protoplasmáticos** tienen un núcleo mayor que los oligodendrocitos y que la microglía, un citoplasma granular abundante y numerosas prolongaciones gruesas, mientras que los **Astrocitos fibrosos** se distinguen por sus expansiones largas, relativamente delgadas, lisas y con ramificaciones poco frecuentes, poseen abundantes fibras neurogliales en su citoplasma. Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran fundamentalmente en la sustancia gris y los fibrosos en la sustancia blanca. Los astrocitos además de servir de sostén también unen a las neuronas con los vasos sanguíneos, fungiendo como células nodrizas

Los **oligodendrocitos** son más pequeños que los astrocitos, tienen pocas prolongaciones las cuales son delgadas y se ramifican poco, se relacionan estrechamente con las fibras nerviosas proporcionando sostén al formar hileras. Estas células poseen un núcleo pequeño heterocromático, citoplasma denso rico en ribosomas y cisternas de retículo endoplásmico rugoso, gran aparato de Golgi y numerosas mitocondrias; su función es formar la mielina, sustancia que recubre las fibras nerviosas en el sistema nervioso periférico.

En la microglía, de origen mesodérmico las células presentan un núcleo pequeño, rodeado de poco citoplasma, las prolongaciones son cortas, las cuales adquieren diferentes formas, el cuerpo y las ramificaciones están cubiertos por numerosas espinas. La microglía son las células de defensa y se distribuyen por todo el sistema nervioso central, en donde engullen y neutralizan microorganismos y desechos celulares.

#### **b) Alteraciones del sistema nervioso.**

En estado patológico, los elementos neurogliales están activamente implicados en la degeneración y regeneración de las fibras nerviosas, que reaccionan en trastornos vasculares y en diferentes enfermedades infecciosas, además de que son la fuente principal de tumores del SNC, en este tipo de circunstancias, los elementos nerviosos pueden asumir una gran variedad de formas, con capacidad de migración activa (Bloom-Fawcett, 1986).

Los tumores del SNC se encuentran entre las más diversas, interesantes y confusas neoplasias del cuerpo humano; una de las causas de confusión está relacionada con las características de desarrollo y comportamiento clínico de muchos tumores cerebrales, las cuales no se ajustan a las definiciones usuales de benignos y malignos, ya que existen diversos tipos de tumores de diferentes orígenes celulares, además el tejido tumoral aún dentro de una misma línea celular presenta cambios a medida que el tejido muestra características de malignidad (Henderson, 1986).

No se dispone de estadísticas que registren con precisión la frecuencia de las neoplasias del SNC, pero se estima que un 9% de las neoplasias primarias (excluyendo las de la piel) son

tumores primarios del SNC: Los múltiples sistemas de nomenclatura, han causado una confusión significativa para el entendimiento de las neoplasias. Las teorías referentes al desarrollo de los tumores de otras partes del organismo son las mismas que las referentes a los del SNC.

Las primeras clasificaciones de los tumores se basaron en la teoría de la célula en reposo Conheim, la cual postulaba que las neoplasias se originarían a través de una activación de células inmaduras aberrantes. Las clasificaciones posteriores se basaron en la creencia de que las células totalmente maduras podrían ser estimuladas para reproducirse y sufrir un proceso de anaplasia. El tema se ha complicado aún más, debido a datos que indican que la estructura de estos tumores podría estar relacionada con su posición en el interior del SNC y que a menudo existe una combinación de elementos gliales, por lo que la mayor parte de las clasificaciones modernas utilizan ambas teorías (Anderson, 1986).

La nomenclatura elaborada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha dado un paso significativo hacia un sistema lógico para nombrar estas lesiones, agrupándolas de acuerdo a su origen o línea celular (VandenBerg 1992).

El tejido tumoral se va desdiferenciando, indicando con esto un cambio en la malignidad del tumor, pero a la vez, representando una diferente entidad tumoral que habrá que designar o nombrar de otra manera para saber el grado de malignidad que ese tejido tiene, por lo que la OMS ha diseñado una escala de malignidad específica para los tumores del SNC de acuerdo a las características histológicas que presenta cada tejido tumoral, estas características son principalmente: atipia celular, mitosis, proliferación endotelial y necrosis, aunque existen otros elementos específicos en el tejido tumoral que ayudan en su diagnóstico. La escala de malignidad dada por la OMS es la siguiente:

**GRADO 1.-** Lesiones que generalmente incluyen tumores con un potencial proliferativo bajo y la posibilidad de cura por medio de métodos quirúrgicos.

GRADO 2.- Tumores que están generalmente infiltrando el tejido nervioso y tienen una baja actividad mitótica, además pueden ser recurrentes. En este grado algunos tipos de tumores tienden a progresar como lesiones con altos grados de malignidad.

GRADO 3.- Este grado está reservado para lesiones con evidencia histológica de malignidad, generalmente en la forma de actividad mitótica con capacidad infiltrativa y anaplasia.

GRADO 4.- Fue asignado a tumores mitóticamente activos, neoplasias propensas a necrosis, generalmente asociadas con una rápida evolución pre y postquirúrgica de la enfermedad.

Aunque no es un criterio de diagnóstico para el tumor de grado 4, la infiltración de tejido adyacente y tendencia a diseminarse en el sistema nervioso central, en algunos casos es una característica común de los tumores de este grado (VandenBerg, 1992).

### 3. NUCLEO

El núcleo contiene el material genético de la célula desde donde se transmite la información para dirigir las actividades sintéticas de ésta.

#### - Membrana celular

El contenido del núcleo (nucleoplasma) está separado del citoplasma celular por la envoltura o membrana nuclear, la cual está compuesta por dos bicapas lipídicas separadas por un espacio de 20-40 nm conocido como cisterna perinuclear. Al microscopio electrónico la membrana nuclear externa se continúa con la membrana del retículo endoplásmico del citoplasma celular y a menudo la superficie exterior de la membrana nuclear externa contienen numerosos ribosomas ocupados en la síntesis proteica. En determinadas regiones, la membrana externa está conectada a la membrana nuclear interna,

la cual está en contacto con la cromatina y otros elementos nucleares. Durante la mitosis la membrana nuclear se fragmenta y posteriormente se reconstruye antes o durante la telofase. El área de la membrana nuclear aumenta en gran medida cuando un núcleo que se encontraba en reposo empieza a sintetizar rápidamente ADN o ARN. Una ventaja de la doble membrana estriba en que están especializadas para interactuar con los componentes del nucleoplasma o citoplasma según sea el caso. Así por ejemplo, se cree que unas proteínas específicas de la membrana interna interactúan con un conjunto de proteínas que forman la lámina nuclear subyacente.

#### **- Poros nucleares**

Las regiones en donde se une la doble membrana de la envoltura nuclear se conocen como poros nucleares, cada uno de los cuales está rodeado por una gran estructura discoidal conocida como complejo del poro nuclear, el cual puede tener hasta 80 nm de diámetro interior. Cada complejo está definido por ocho grandes gránulos protéicos dispuestos en un patrón octagonal. La unión de las dos bicapas de la envoltura nuclear con los poros nucleares probablemente hace posible que los materiales liposolubles disueltos en la membrana (lípidos y proteínas), pasen de la membrana del retículo endoplasmático donde son sintetizados hasta la membrana nuclear interna.

#### **- Matriz nuclear**

Este término se refiere a la parte interna del núcleo, es una malla fibrilar de contenido protéico que participa en los procesos de transcripción y replicación, así como en el transporte de ARN recién sintetizado por el núcleo. Dentro del núcleo existen dos regiones morfológicamente definidas: a) áreas de pericromatina, las cuales consisten en regiones periféricas alrededor de los grupos de cromatina condensada y, b) la región intranuclear o

espacio de intercromatina; adyacente al nucléolo hay áreas de cromatina condensada (heterocromatina).

Por microscopía electrónica y utilizando la técnica de EDTA, la cual es preferencial para ribonucleoproteínas (RNPs), Monneron y Bernhard en 1969 identificaron diversas estructuras en los espacios peri e intercromatinianos, las cuales son comúnmente observadas en el núcleo celular interfásico: gránulos intercromatinianos, gránulos pericromatinianos, fibras pericromatinianas y dos clases de cuerpos espiralados; todos estos componentes se encuentran en cantidades variables y desde luego se caracterizan por contener ARN.

### **- Cromatina**

El ADN de todos los organismos está íntimamente asociado con una amplia variedad de proteínas, las cuales actúan como enzimas mediando funciones tan importantes como la síntesis de ARN o como proteínas estructurales organizando el ADN dentro del núcleo celular. Las proteínas que se unen al ADN de los eucariontes se clasifican en dos grupos: las histonas y las proteínas cromosómicas no histonas. Esta última designación es un término que abarca a muchas proteínas diferentes con funciones muy diversas, en cambio las histonas constituyen una clase bien definida de proteínas estructurales de bajo peso molecular.

Las histonas mantienen la estabilidad de la molécula del ADN y la ayudan a compactarse para que quepa en el núcleo, estas proteínas se denominan H2A y H2B, las cuales son ligeramente ricas en lisina y la H3 y H4, que son ricas en arginina, dichas proteínas se encuentran formando estructuras octaméricas, alrededor de las cuales se enrolla el ADN con 146 pares de bases, esta estructura, que es de forma cilíndrica, se denomina nucleosoma.

El ADN al unirse con las histonas y otras proteínas forman la cromatina, la cual mide varios centímetros de largo y se encuentra fuertemente plegada observándose como gruesos cúmulos de décimas de micrómetros; en los cuales se localiza la información genética necesaria para las diferentes funciones del organismo (Echeverría, Vázquez Nin, 1995).

En las células de los eucariontes superiores, se han identificado dos tipos generales de cromatina: Cromatina condensada o **Heterocromatina** y cromatina poco condensada o **Eucromatina**.

La heterocromatina permanece condensada durante la interfase y es inactiva en cuanto a la transcripción del ADN. La heterocromatina puede ser dividida a su vez en dos subclases, la **heterocromatina constitutiva** formada por regiones condensadas en todas las células y la **cromatina facultativa**, constituida por regiones condensadas sólo en algunas células.

La eucromatina que también se encuentra en el núcleo, sirve de matriz en el proceso de transcripción, en donde se sintetiza una molécula de ARN a partir de nucleótidos que contienen la ribosa en lugar de la desoxirribosa del ADN, la secuencia de los nucleótidos está complementarizada con una de las hebras de ADN, en este proceso intervienen polimerasas de ARN, topoisomerasas y diversas proteínas que controlan y regulan estas reacciones (Alberts, 1994).

#### - Cromosomas

Durante la división celular la cromatina se concentra en los cromosomas, los cuales son orgánulos en forma de bastoncillo o hebra, que se hacen visibles en el núcleo de las células en este estado, ya que toda la cromatina se dispone en forma condensada. El número de cromosomas es constante en todas las células somáticas y es característico para cada especie (Bloom-Fawcett, 1986).

#### - Gránulos pericromatinianos

Representan un almacén intranuclear de ARN mensajero maduro, en equilibrio entre la transcripción y su migración al citoplasma, tienen un diámetro de 400 a 600 Å rodeados de un halo claro de 250 Å y están en la periferia de los acúmulos de la cromatina condensada, son menos numerosos que los gránulos intercromatinianos y pueden encontrarse de manera

individual o en grupos. Pueden ser al menos de dos clases, uno de origen nucleoplásmico y otro de origen nucleolar (Vázquez Nin y col, 1990).

#### **- Gránulos intercromatinianos**

Son reservorios de ácidos nucleicos y proteínas que constituyen la maquinaria bioquímica del splicing, su diámetro promedio es de 200 a 250 Å, y se localizan en la región intercromatiniana del núcleo celular. De acuerdo a Bernhard (1969) aparecen solo en grupos, aunque en algunas células de plantas e invertebrados, se han observado dispersos y escasos (Jimenez García y col., 1989).

#### **- Fibras pericromatinianas**

Contienen el ARN premensajero, están formadas por fibrillas pareadas irregularmente de 30 a 50 Å de diámetro (Monneron y Bernhard, 1969), las fibras pericromatinianas se encuentran esparcidas por el nucleoplasma con una mayor abundancia en la región pericromatiniana.

#### **- Cuerpos nucleares simples**

Son definidos como claras estructuras nucleoplásmicas generalmente redondas, de textura heterogénea, con menos de una micra de diámetro. De acuerdo a Raska y col. (1990), estos cuerpos forman una categoría heterogénea con respecto a la composición macromolecular y a la función. Algunos cuerpos prenucleolares como los descritos por Ochs (1984) y Jiménez García (1989) o nucléolos satélites (Smetana y col, 1984) pueden ser incluidos en esta categoría (Raska, 1990).

## - Cuerpos espiralados

Son estructuras que en investigaciones recientes, han sido relacionadas con el nucléolo, tienen un diámetro de 0.3 a 0.5 micrómetros y han sido observados ocasionalmente en las áreas de intercromatina.

## 4. Nucléolo

El nucléolo junto con el núcleo, es una parte esencial en la maquinaria de la célula, ya que en este sitio se asegura un abastecimiento adecuado de ARN ribosomal. En el nucléolo se produce y se madura el pre ARNr y se lleva a cabo el ensamblaje de las subunidades del ribosoma, el cual está formado por proteínas y ácidos nucleicos o las llamadas Ribonucleoproteínas (Bloom-Fawcett, 1986).

El tamaño y morfología del nucléolo es variable en función de la especie, tipo celular y estado fisiológico, ya que puede ser sensible a factores que modifican el metabolismo de los genes ribosómicos. En general, los nucléolos interfásicos y profásicos de todos los organismos superiores son esféricos, densos y con un tamaño de 1 a 7 micrómetros y exceptuando el caso de los ovocitos en fase de crecimiento, muy a menudo no hay más de uno por núcleo (Berkałoff, 1987). Los nucléolos tienen una fuerte refringencia y poseen una marcada afinidad por los colorantes básicos, debido a su composición ribonucleoproteica, y a diferencia del núcleo, carece de una membrana que lo delimite.

El nucléolo cambia su aspecto durante las diferentes fases del ciclo celular, a medida que la célula se aproxima a la mitosis, el nucléolo empieza por disminuir de tamaño y luego desaparece cuando los cromosomas se condensan y se detiene toda la síntesis de ARN. Por regla general, en una célula metafásica no se observa el nucléolo.

Posteriormente, cuando la síntesis de ARN ribosómico se inicia nuevamente al final de la mitosis (en la telofase), reaparecen diminutos nucléolos en las localizaciones cromosómicas de los genes de ARN ribosómico, esto ocurre de acuerdo a la demanda metabólica de la célula.

En el hombre, los genes del ARN ribosómico (ARNr) están localizados cerca del extremo de cada uno de los cinco cromosomas acrocéntricos: 13, 14, 15, 21 y 22, (es decir, en 10 de los 46 cromosomas), por consiguiente, después de la mitosis de una célula humana se forman 10 pequeños nucléolos, los cuales rara vez pueden ser observados, ya que crecen rápidamente y se fusionan formando el gran nucléolo típico de la célula interfásica (Alberts, 1994).

Los sitios en donde se encuentran localizados los genes del ARNr son las llamadas **Regiones Organizadoras Nucleolares (RON)**, las cuales son ciertas constricciones secundarias de los cromosomas en las que están los genes que codifican para los ARN ribosómicos 18S y 28S. Las constricciones secundarias se forman porque los ARN se transcriben en forma muy activa, interfiriendo con la condensación del cromosoma a ese nivel (De Robertis, 1983).

El **nucléolo** se observa parcialmente separado en tres zonas:

- 1) **Zona fibrilar**: es el equivalente de las RON en interfase a nivel de microscopía de luz y contiene el ADN procedente de las RON (de los cromosomas cuyas asas son de 5 nm), ARN polimerasa I, ADN topoisomerasa I, la fosfoproteína C23, la fibrilarina una proteína asociada con la U3, ribonucleoproteína de tamaño pequeño (SnRNP); este sitio es probablemente en donde el transcrito primario de ARN ribosomal es generado. Funciona como almacén de los factores que ayudan a la transcripción.
- 2) **Zona fibrilar densa**: esta zona está compuesta por fibrillas de 4 a 10 nm, con actividad transcripcional abundante y en donde se lleva a cabo el procesamiento del precursor de ARNr, este sitio se detecta con anticuerpos para fibrilarina, aquí también está presente la fosfoproteína C23, la proteína B23 (o nucleolina) y la ARN polimerasa I.
- 3) **Zona granular**, contiene partículas ribosómicas precursoras más maduras de 15 a 20 nm de diámetro, la fosfoproteína B23 (nucleolina), además de los productos intermedios del procesamiento del pre ARNr; es el sitio del procesamiento tardío del pre ARNr y de almacenamiento de los prerribosomas (Sheer-Benavente, 1990).

La zona fibrilar junto con la zona granular contienen el ARN y las proteínas, en donde estas últimas representan el componente cuantitativamente más importante, ya que constituyen alrededor del 90% del peso seco de los nucléolos.

Al mismo tiempo, estos componentes difieren en su distribución de acuerdo con el tipo celular, ya que en las células vegetales y en las células de las glándulas salivales de dípteros se ha observado que la parte central del nucléolo es fibrilar en tanto que el componente granular se localiza en la periferia, mientras que en las células de mamíferos estos componentes están mezclados y, como ya se mencionó, la estructura nucleolar puede variar con los estados funcionales de las células de un mismo tejido (Marie-Line y col., 1991).

En algunas células se ha observado que el nucléolo está rodeado por un anillo de cromatina, y representa regiones heterocromáticas del cromosoma asociadas al nucléolo (De Robertis, 1983).

Las funciones biosintetizadoras del nucléolo, pueden estudiarse por medio de un corto marcaje radioactivo del ARN recién formado y utilizando un procedimiento de fraccionamiento celular para aislar los nucléolos marcados radioactivamente. Los métodos citoquímicos de contraste o “tinción” preferencial, el uso de varios procedimientos enzimáticos y químicos de extracción, así como la autorradiografía de alta resolución e impregnaciones argénticas, han sido técnicas valiosas en la investigación de estructuras nucleares tanto en su composición química como en su fisiología y morfología, ya sea a nivel de microscopía de luz o microscopía electrónica (Derinzini, 1986).

## **5. Regiones Organizadoras Nucleolares (RON)**

Los nucléolos son el producto de la actividad de ciertos lugares cromosómicos específicos en donde se encuentran los genes del ARNr y a los que se les ha dado el nombre de **regiones organizadoras nucleolares (RON)**. Estos lugares corresponden, en los cromosomas en división, a las constricciones secundarias. Hay un organizador en cada uno de los cromosomas acrocéntricos y todos tienden a fusionarse en una estructura única para formar el nucléolo, esta velocidad de fusión es relativamente constante, lo que explica que

si el número de nucléolos es casi siempre inferior al número de organizadores, varía poco para la misma especie.

En situaciones patológicas, como sucede en las células neoplásicas, esta velocidad de fusión puede verse afectada y una elevada cantidad de las regiones organizadoras nucleolares podría reflejar una mayor dispersión de los cromosomas para permitir a su vez una mayor transcripción del ARN, lo que evitaría una adecuada condensación nucleolar.

A nivel de microscopía de luz, los sitios de transcripción ribosomal o regiones organizadoras nucleolares pueden ser visualizados por una variedad de técnicas dirigidas contra las proteínas asociadas (NORAPs, por sus siglas en inglés). Estas proteínas están relacionadas a los sitios transcripcionalmente activos, algunas NORAPs, son argirofílicas como lo son las proteínas C23, B23, y la ARN polimerasa I, las cuales han demostrado impregnarse preferencialmente a través de una reducción de plata, ésto como resultado de su carga electrónica de alta densidad (William y col, 1982), y por virtud de su fosfato (Sato y col, 1981), carboxil (Olert y col, 1979) SH y -s-s-sulfuro (Buys y col, 1980).

El método usado es el llamado AgNOR o Regiones Organizadoras Nucleolares Argirofílicas (Ploton y col., 1986), ya que de acuerdo a lo anterior esta técnica es específica para localizar a las RON y determinar su número en cada núcleo, sin que exista el riesgo de confundir dichas estructuras con algunas otras. De acuerdo a Valdez y col. (1995), las secciones ricas en ácido aspártico de la proteína B23 son las responsables para la tinción de proteínas nucleolares.

El método de AgNOR, además de detectar la proliferación celular, tiene la ventaja de poder ser aplicado directamente en tejidos que han sido fijados en formalina e incluidos en parafina (Smith y col., 1988).

### **III. HIPOTESIS**

Si existe un incremento en el número de las Regiones Organizadoras Nucleolares en los núcleos de las células neoplásicas, entonces existirá un grado mayor de malignidad en los mismos y, por lo tanto, se observarán cambios a nivel nucleolar.

### **IV. OBJETIVOS**

- Cuantificar las Regiones Organizadoras Nucleolares en núcleos de tumores del Sistema Nervioso Central.
- Correlacionar el número de las Regiones Organizadoras Nucleolares con el grado de malignidad de cada tipo de tumor.
- Analizar los cambios en nucléolo y correlacionarlos con el tipo de neoplasia y grado de malignidad.

### **III. HIPOTESIS**

Si existe un incremento en el número de las Regiones Organizadoras Nucleolares en los núcleos de las células neoplásicas, entonces existirá un grado mayor de malignidad en los mismos y, por lo tanto, se observarán cambios a nivel nucleolar.

### **IV. OBJETIVOS**

- Cuantificar las Regiones Organizadoras Nucleolares en núcleos de tumores del Sistema Nervioso Central.
- Correlacionar el número de las Regiones Organizadoras Nucleolares con el grado de malignidad de cada tipo de tumor.
- Analizar los cambios en nucléolo y correlacionarlos con el tipo de neoplasia y grado de malignidad.

## V. MATERIAL Y METODO

Del servicio de neurocirugía se obtuvieron un total de 16 tumores. La muestra después de ser obtenida fué dividida en dos partes: La primera parte fué para microscopía de luz y la segunda para microscopía electrónica.

### a) Microscopía de luz

Cada muestra fue fijada durante una hora en formalina al 10% en amortiguador de fosfatos salino 0.2M, pH 7.2, NaCl 0.15M y lavada en agua corriente, se deshidrataron con alcoholes graduales: 60%, 70%, 80%, 90% y 100%, se aclararon en xilol y se embebieron en parafina, el proceso se realizó en un procesador de tejidos (histokinette) Reichert Jung, haciendo cambios de una hora cada uno. Posteriormente la muestra fue incluida en parafina, se realizaron cortes de 3µm de espesor y se aplicaron las siguientes técnicas: Hematoxilina-Eosina y AgNOR.

- Técnica de H-E: Los cortes fueron desparafinados e hidratados en xilol, xilol-alcohol absoluto y alcoholes graduales en orden decreciente (100%, 90%, 80% y 70%) hasta llegar a agua destilada, haciendo un cambio de 10 minutos cada uno, posteriormente los cortes fueron teñidos con hematoxilina de Harris durante 30 segundos, diferenciados con carbonato de litio, contrateñidos con eosina alcohólica y deshidratados nuevamente con alcoholes graduales (70%, 80%, 90% y 100%) alcohol absoluto-xilol y xilol, con cambios de 10 minutos cada uno para finalmente ser montados con una resina sintética. Esta técnica fué realizada para diagnosticar el tejido tumoral y asignarles el grado de malignidad de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud.

- Método de AgNOR: Una vez obtenidos los cortes desparafinados e hidratados, fueron inmersos por 40 minutos en una solución de plata coloidal (Howell-Black, 1980), la cual se preparó de la siguiente manera: un volumen de gelatina al 2% en ácido fórmico acuoso al

1% y 2 volúmenes de una solución de plata acuosa al 50%. La impregnación fué hecha a temperatura ambiente y en la obscuridad, para evitar precipitados de plata sobre la muestra. Posteriormente los cortes se enjuagaron con agua destilada y se contrañeron con rojo neutro durante un minuto, para diferenciar más al nucléolo del resto del tejido, los cortes fueron enjuagados nuevamente con agua destilada, deshidratados con alcoholes graduales (70%, 80%, 90% y 100%) alcohol absoluto-xilol y xilol, con cambios de 10 minutos cada uno, finalmente los cortes fueron montados con una resina sintética. Se eligió una zona al azar para realizar el conteo de regiones organizadoras nucleolares por núcleo, utilizando el objetivo de inmersión 100%; se contaron las RON de 100 núcleos en cada tipo de tumor y se calculó la media y la desviación estándar. Con los datos obtenidos se realizó la prueba de Tukey, que es un análisis de significancia entre las medias de las muestras con una  $p < 0.01$ . Este análisis nos permite hacer todas las comparaciones con n muestras o tratamientos; en este caso, las muestras de tejido tumoral representaron los tratamientos, es decir, cada tumor fué un tratamiento diferente, por consiguiente se obtuvieron 16 tratamientos en total. Esta técnica fué realizada para localizar y contar las regiones organizadoras nucleolares.

### **b) Microscopía Electrónica**

El tejido fue fijado en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilatos 0.1M a un pH de 7.2 durante una hora y lavado con amortiguador de cacodilatos 0.1M por 10 minutos. La muestra fue postfijada con tetraóxido de osmio ( $OsO_4$ ) al 1% durante 1 hora y enjuagada nuevamente con amortiguador de cacodilatos 0.1M durante 10 minutos; se deshidrató con acetona graduales (70%, 80%, 90% y 100%), y preincluyendo en una mezcla 1:1 de acetona 100%-EPON 100% durante toda la noche, finalmente el tejido fue incluido en EPON 100% y polimerizado a 60° C durante 18 horas.

Una vez obtenidos los bloques se realizaron cortes semifinos de 1  $\mu m$  de espesor, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio de luz para seleccionar el área de estudio, tras lo cual se obtuvieron cortes finos en el área gris-plata del espectro de colores de interferencia y fueron contrastados con la técnica de rutina, es decir, con acetato de

uranilo al 3%, pH 4.5 y citrato de plomo al 0.03%, pH 9.0 durante 10 y 15 minutos respectivamente. Posteriormente las muestras fueron observadas bajo un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM10 y se obtuvieron las electromicrografías de la estructura del nucléolo para ser analizadas junto con los resultados estadísticos obtenidos por microscopía de luz.

## **VI. RESULTADOS**

Con la tinción de hematoxilina y eosina se identificaron 16 tipos diferentes de tumores, cuyo grado de malignidad asignado, así como los valores encontrados con la técnica de AgNOR del número de RON por núcleo en cada tipo tumoral, se muestran en las Tablas I II y III.

### **a) Cuantificación de las Regiones Organizadoras Nucleolares.**

Después de la cuantificación de las RON y de su análisis, se obtuvieron los siguientes resultados:

#### **- Tumores del tejido neuroepitelial**

En el grupo de los tumores astrocíticos (Tabla I) el glioblastoma multiforme, grado 4, presentó mayor número de RON ( $1.5 \pm 0.00$  RON/núcleo), el cual presentó una diferencia significativa ( $p < 0.007$ ) con el astrocitoma microquístico grado 1 ( $1.21 \pm 0.00$ ). Comparando al glioblastoma con el resto de los tumores, este no muestra una diferencia significativa. Los tumores restantes: astrocitoma grado 1, astrocitoma anaplásico grado 3, astrocitoma protoplasmático grado 1 y astrocitoma anaplásico monstruocelular grado 3, muestran diferencias entre ellos mismos pero no son significativas.

En los tumores ependimarios en donde los cuatro tipos de tumores pertenecen al grado 1, se observa (Tabla I) que el subependimoma muestra un número de RON mayor ( $1.52 \pm 0.65$  RON/núcleo) presentando una diferencia significativa con respecto al ependimoma mixopapilar en donde el número de RON/núcleo fué de  $1.19 \pm 0.00$  ( $p < 0.007$ ), pero con los otros ependimomas no muestra diferencias significativas.

#### Tumores de las meninges

En este grupo (Tabla II) se encontró que el meningioma maligno grado 4 tuvo un mayor número de RON ( $1.83 \pm 0.00$  RON/núcleo) que el meningioma fibroblástico, ( $1.41 \pm 0.00$ ) así como el meningioma ( $1.43 \pm 0.57$ ) ambos tumores del grado I, mostrando una diferencia significativa con una  $p < 0.000$ . El meningioma atípico (grado 2) no mostró diferencias significativas con ninguno de los tumores de este grupo.

#### Tumores de origen mesenquimal (\*) y epitelial maligno (+).

En este grupo el condrosarcoma mesenquimal(\*) y el carcinoma metastásico(+), (Tabla III) ambos pertenecientes al grado 4, presentaron una diferencia significativa  $p < 0.000$ , mostrando el condrosarcoma mayor número de RON ( $2.05 \pm 0.00$  RON/núcleo) que el carcinoma metastásico, el cual tuvo un valor de  $1.55 \pm 0.00$  de RON/núcleo.

**TABLA I: TUMORES DEL TEJIDO NEUROEPITELIAL**  
**GRUPO: TUMORES ASTROCITICOS**

TIPO	GRADO	X RON/núcleo ± DS
ASTROCITOMA	1	1.41 ± 0.56
ASTROCITOMA MICROQUISTICO	1	1.21 ± 0.00
ASTROCITOMA PROTOPLASMICO	1	1.37 ± 0.52
ASTROCITOMA ANAPLASICO	3	1.40 ± 0.00
ASTROCITOMA ANAPLASICO MONSTRUOCELULAR	3	1.32 ± 0.48
GLIOBLASTOMA MULTIFORME	4	1.50 ± 0.00

**GRUPO: TUMORES EPENDIMARIOS**

TIPO	GRADO	X RON/núcleo ± DS
EPENDIMOMA	1	1.34 ± 0.51
EPENDIMOMA PAPILAR	1	1.38 ± 0.59
EPENDIMOMA MIXOPAPILAR	1	1.19 ± 0.00
SUBEPENDIMOMA	1	1.52 ± 0.65

**TABLA II: TUMORES DE LAS MENINGES.**

TIPO	GRADO	X RON/núcleo ± DS
MENINGIOMA	1	1.43± 0.57
MENINGIOMA FIBROBLASTICO	1	1.41± 0.00
MENINGIOMA ATIPICO	2	1.67± 0.82
MENINGIOMA MALIGNO	4	1.83± 0.00

**TABLA III. TUMORES DE ORIGEN MESENQUIMAL (\*) Y EPITELIAL MALIGNO (+).**

TIPO	GRADO	X RON/núcleo± DS
CARCINOMA METASTASICO (+)	4	1.55± 0.00
CONDROSARCOMA MESENQUIMAL (*)	4	2.05± 0.00

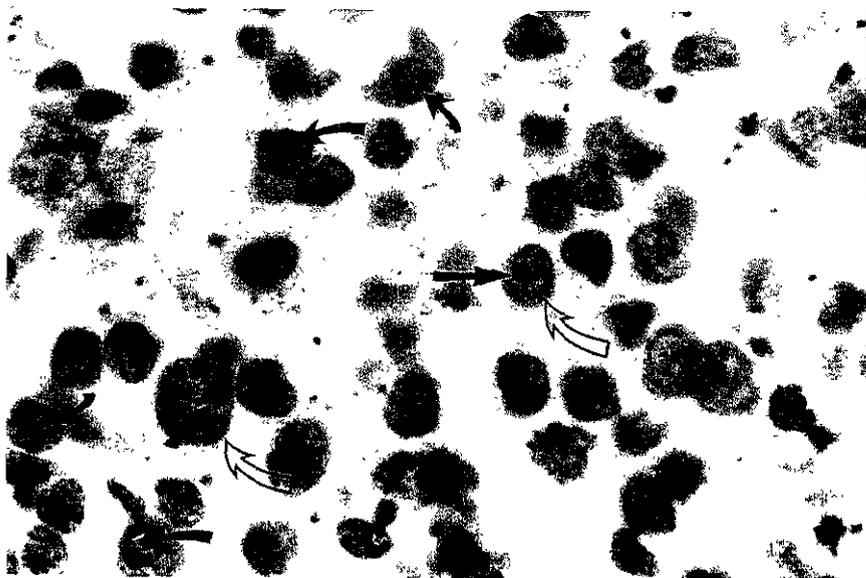


Figura 1 Núcleos de células tumorales (flechas abiertas), consideradas histológicamente grado 1 en donde se observan las RON como puntos oscuros (flechas cerradas) apareciendo 1 o 2 RON por núcleo, el tejido aparece bien conservado. Técnica de AgNOR. 1000X.

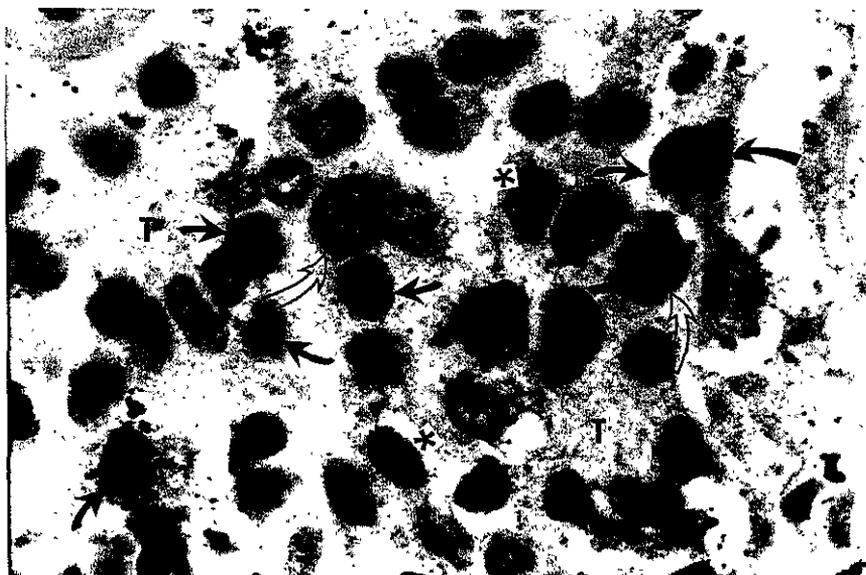


Figura 2. Células tumorales correspondiendo histológicamente al grado 2, en la mayoría de los núcleos se observan 2 RON (flechas abiertas) y en algunas células hasta 3 por núcleo (flechas cerradas), en algunos núcleos se sigue observando un solo nucléolo (asterisco) y el tejido aún se observa preservado (T). Técnica de AgNOR. 1000X.

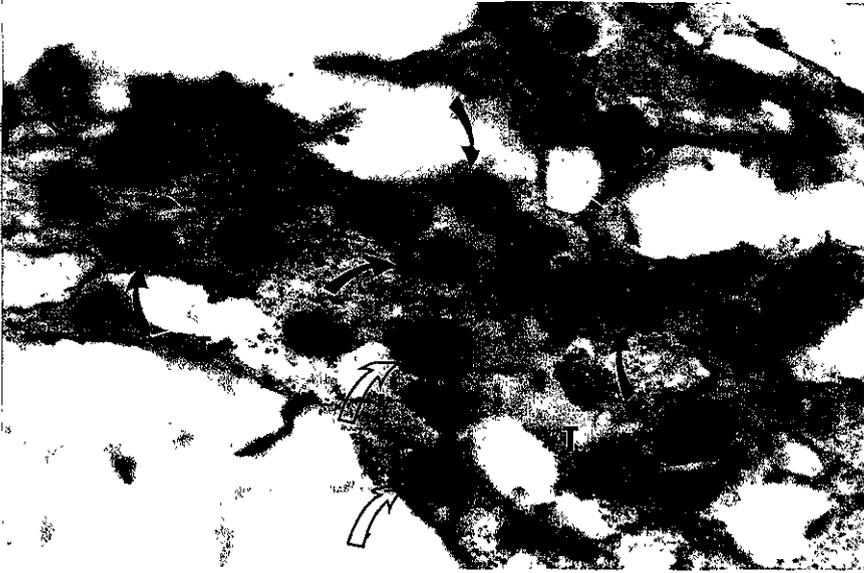


Figura 3. Células tumorales que histológicamente pertenecen al grado 3, observándose 2 o 3 RON (flechas cerradas) por núcleo (flechas abiertas) en la mayoría de ellos se puede observar al tejido menos preservado que en la figura 2, (T). Técnica de AgNOR 1000X

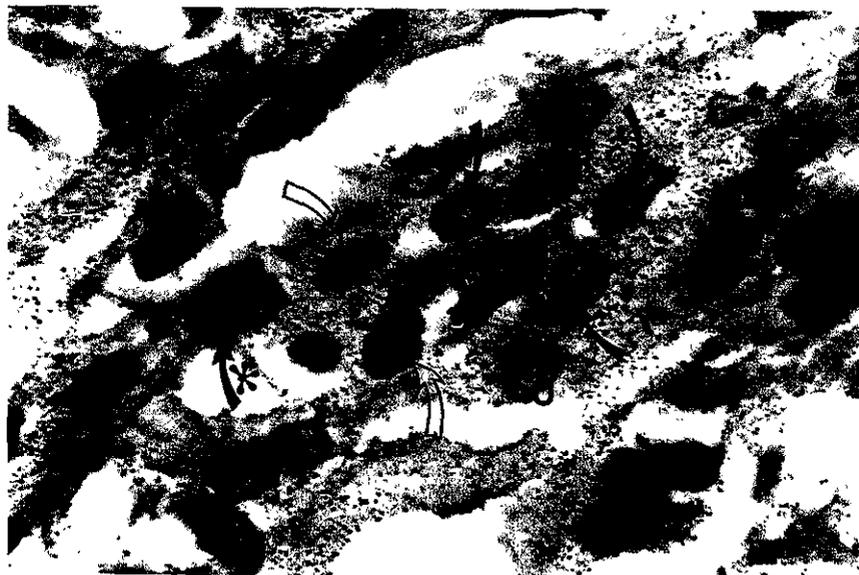


Figura 4. Se muestran núcleos (flechas abiertas) de células tumorales histológicamente consideradas grado 4, los cuales presentan de 2 (flechas cerradas) hasta 5 RON por núcleo (asterisco), también se observan en algunos núcleos la zona de agrupamiento de pequeñas RON que se consideran como 1 unidad (U). El tejido como en la figura anterior, está muy degenerado debido a la necrosis (T). Técnica de AgNOR. 1000X

## **a) Análisis Ultraestructural**

### **- Tumores del tejido neuroepitelial**

En este grupo entre los tumores que mostraron diferencias estadísticamente significativas se observó lo siguiente:

### **- Tumores astrocíticos**

El glioblastoma multiforme (Figura 5) mostró nucléolos redondos bien delimitados, pequeños con respecto a su área nuclear, localizados hacia la periferia del núcleo, con un aspecto compacto, muy electrodensos, con pocas zonas claras y sin cromatina asociada al nucléolo. El astrocitoma microquístico (Figura 6) al igual que el glioblastoma multiforme presenta nucléolos pequeños con respecto a su área nuclear y se encuentran localizados hacia la periferia de este, son menos electrodensos y hay más áreas claras que en el glioblastoma. También muestran un aspecto más disgregado comparados con los del glioblastoma multiforme, no están bien delimitados y no hay cromatina asociada al nucléolo. Los nucléolos en este tumor presentan una forma semi-alargada.

### **- Tumores endimarios**

En el grupo de los tumores endimarios el endimoma mixopapilar, no pudo ser analizado ultraestructuralmente por las malas condiciones de fijación del material. El subendimoma (Figura 7) por su parte, muestra nucléolos redondos y de tamaño normal de acuerdo al área nuclear, se observan muy electrodensos encontrándose pocas zonas claras en él. La localización de los nucléolos en este tumor es hacia la periferia nuclear, la cromatina nuclear no es muy evidente y no se observa cromatina asociada al nucléolo

#### - Tumores de las meninges

En el grupo de los tumores meningoteliales las diferencias estadísticamente significativas fueron el meningioma maligno con respecto al meningioma y al meningioma fibroblástico.

#### - Meningioma maligno vs meningioma.

El meningioma maligno (Figura 8) muestra en la mayoría de sus núcleos, nucléolos redondos y en algunos otros núcleos, nucléolos alargados, son de tamaño prominente con respecto a su área nuclear y se localizan hacia la periferia del núcleo, observándose electrondensos pero con varias zonas claras, están bien delimitados y de aspecto no disgregado, similares al meningioma (Figura 9), en donde los nucléolos son redondos y ligeramente de menor tamaño con respecto a su área nuclear, también en los nucléolos de este tumor se observan zonas claras, apareciendo de uno a dos nucléolos por núcleo, y localizándose centralmente.

#### - Meningioma maligno vs meningioma fibroblástico

El meningioma fibroblástico (Figura 10) muestra nucléolos pequeños con respecto a su área nuclear, redondos y con menos zonas claras que el meningioma maligno, notándose también más electrondensos y de localización excéntrica, los nucléolos se observan bien delimitados y de aspecto no disgregado.

#### - Tumores de origen mesenquimal y epitelial maligno.

Finalmente tenemos al condrosarcoma mesenquimal y al carcinoma metastásico. este último no pudo ser descrito por las malas condiciones del material. En el condrosarcoma mesenquimal (Figura 11) se observaron nucléolos de tamaño pequeño con respecto a su área nuclear, están localizados en la periferia del núcleo y aparecen bien delimitados. hay varias zonas claras en el nucléolo, y se notan poco electrondensos. No se observa cromatina asociada al nucléolo,

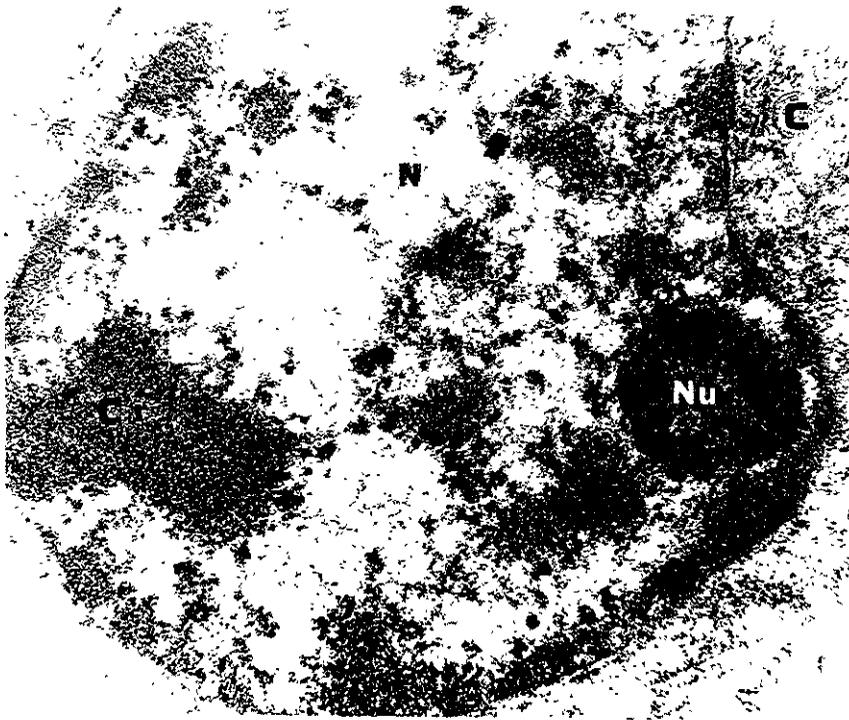


Figura 5. Núcleo de glioblastoma multiforme, tumor maligno clasificado como grado 4: En la periferia del núcleo (N) se observa el nucléolo (Nu), el cual muestra pocas zonas claras y con aspecto muy electrondenso, no se observa cromatina asociada al nucléolo, solo la cromatina nuclear (Cr). Citoplasma (C).



Figura 6. Núcleo de astrocitoma microquístico, tumor clasificado como grado 1. se vé al nucléolo (Nu) alargado y localizado hacia la periferia del núcleo (N). El nucléolo es menos electrondenso y presenta mas áreas claras que el glioblastoma, no se observa cromatina asociada al nucléolo pero si la cromatina nuclear (Cr).

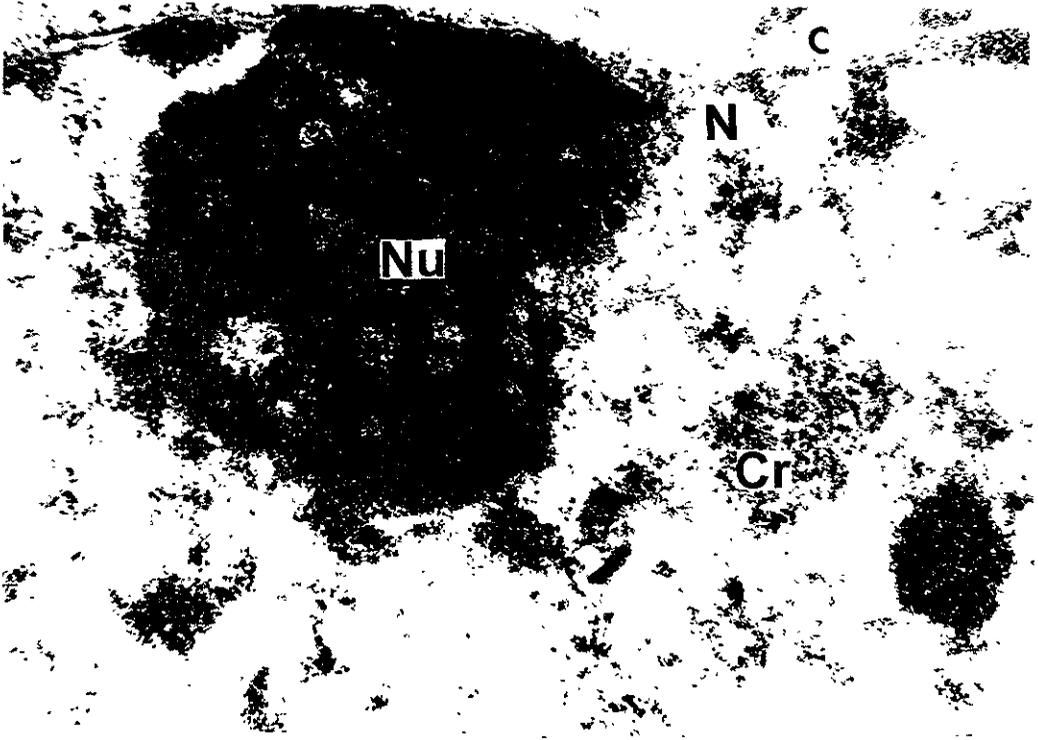


Figura 7. Núcleo de un subependimoma, tumor de bajo grado de malignidad considerado histológicamente grado 1. Se observa al nucléolo (Nu) en la periferia del núcleo (N), en donde no es muy evidente la cromatina (Cr), el nucléolo presenta pocas zonas claras, muy electrondenso, no hay cromatina asociada al nucléolo. Citoplasma (C).

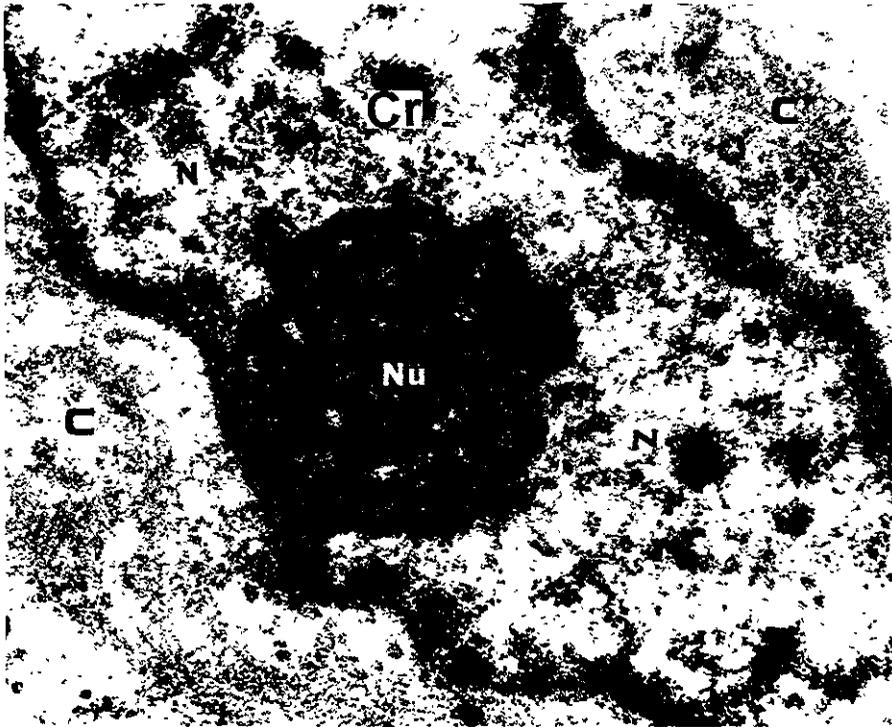


Figura 8. El núcleo del meningioma maligno muestra al nucléolo (Nu) localizado hacia la periferia del núcleo (N), no se observa cromatina asociada al nucléolo, el cual muestra varias zonas claras como en la figura anterior, este tumor es considerado histológicamente como grado 4. Se aprecia muy bien la cromatina (Cr) y parte del citoplasma (C).

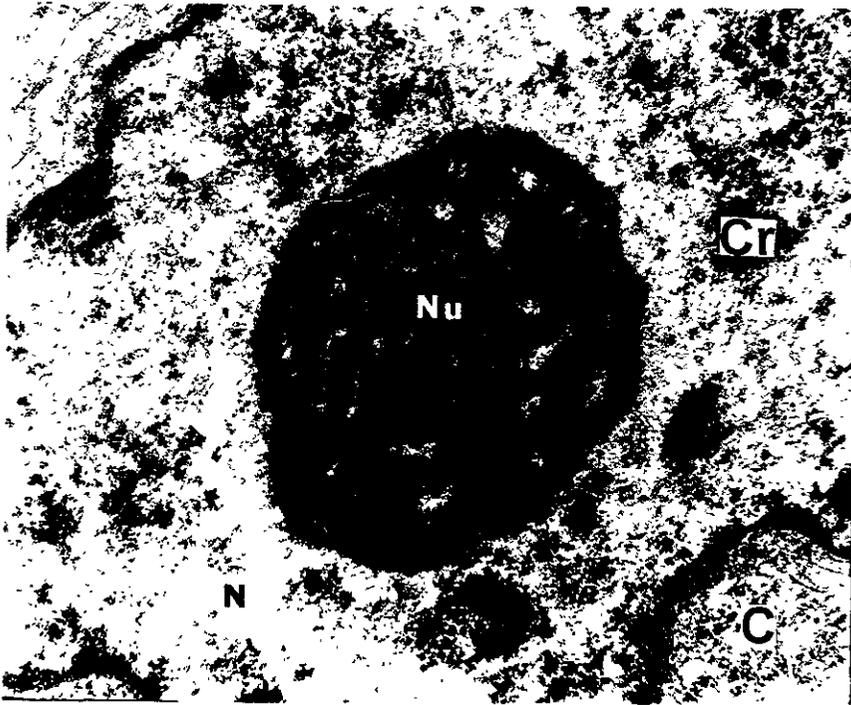


Figura 9. En esta figura se observa el núcleo de un meningioma, tumor de bajo grado histológico de malignidad: grado 1, El nucléolo (Nu) en este tumor se localiza en el centro del núcleo (N), no se observa cromatina asociada al nucléolo pero si la cromatina nuclear (Cr). El nucléolo muestra varias zonas claras y distribuidas. Citoplasma (C).

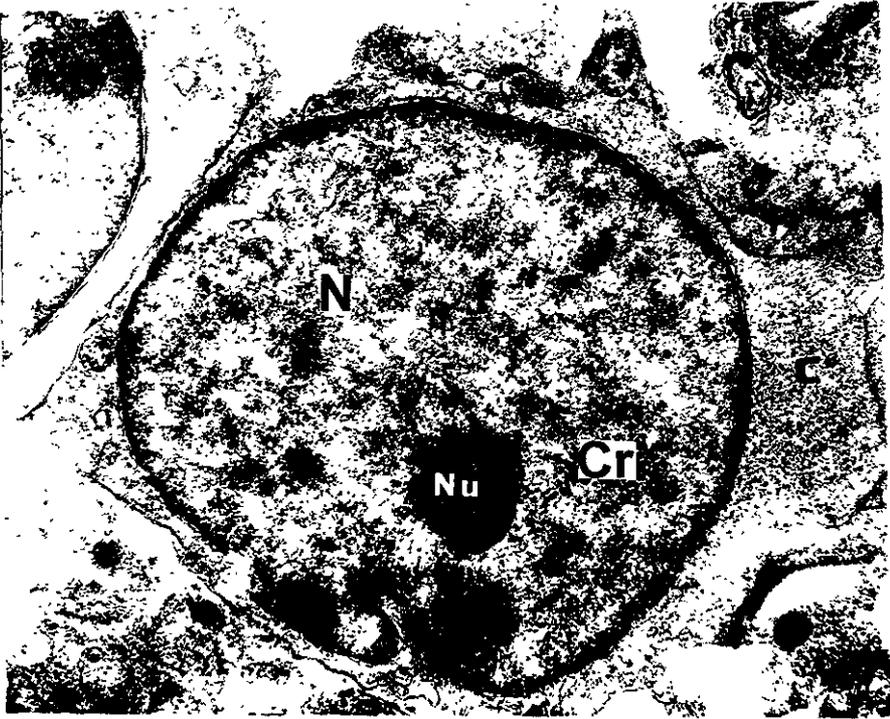


Figura 10. Meningioma fibroblástico, tumor que histológicamente pertenece al grado 1, su núcleo (N) muestra al nucléolo localizado excéntricamente, muy electrondenso con escasas zonas claras, no se observa cromatina asociada al nucléolo. Se aprecia todo el citoplasma de la célula (C) y la cromatina (Cr).

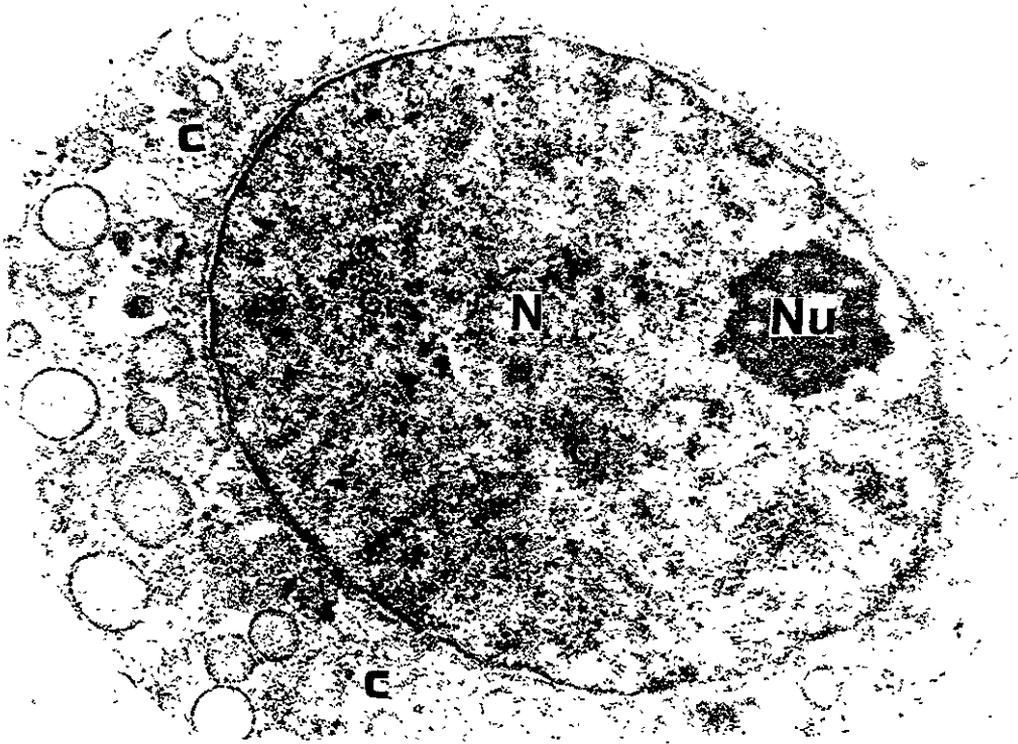


Figura 11. El núcleo del condrosarcoma mesenquimal, grado 4, presenta un nucléolo (Nu) totalmente localizado hacia la periferia del núcleo (N), no se observa cromatina asociada al nucléolo, solo la cromatina nuclear, se observan varias zonas claras en el nucléolo y se muestra poco electrondenso. Se aprecia todo el citoplasma de la célula.

## VII. DISCUSION

De acuerdo a los resultados de este estudio, se observó que en general el número de RON se incrementa cuando el tejido tumoral corresponde a un grado de malignidad mayor, como se observa en la gráfica 1. Estos resultados concuerdan con los reportados por Shiraishi en 1991 quien aplicó la técnica de AgNOR en un grupo de diferentes tumores cerebrales obteniendo una diferencia significativa en los promedios de AgNOR en tumores de bajo grado con respecto a los de alto grado.

Ahora bien, en este trabajo algunos tumores mostraron un promedio de AgNOR más alto de acuerdo a lo esperado en relación al grado histológico de malignidad que se les asignó, como sucedió en el grupo de los astrocitomas, en donde los dos tumores anaplásicos pertenecientes al grado 3 mostraron promedios de AgNOR similares a los del astrocitoma y astrocitoma protoplásmico ambos de grado 1. En la gráfica 1 se observa que sí existe, aunque de manera general un incremento de malignidad en este grupo pero no de manera tan evidente, por lo que se sugiere que para tener resultados que apoyen la eficacia de la técnica se tiene que aumentar el número de tumores a estudiar ya que existen varios tipos de gliomas y esto nos podría estar hablando de la diversidad de componentes tisuales que participan en la creciente malignidad de los tejidos tumorales.

Con respecto al grupo de los meningiomas, (gráfica 1) éstos muestran el comportamiento esperado, ya que se puede observar como el promedio de AgNOR se incrementó al igual que el grado de malignidad histológica. Entre los meningiomas de grado 1, se puede notar que aparte de que no tener una diferencia estadísticamente significativa, dicha diferencia numérica es mínima, ocurriendo lo contrario con el meningioma atípico, el cual histológicamente presenta signos de alta malignidad, a pesar de ser considerado como grado 2. Además de observarse en este grupo la diferencia entre promedios de AgNOR entre el meningioma maligno (grado 4) y el meningioma atípico (grado 2).

Esto vá de acuerdo con los resultados obtenidos en un estudio hecho por Plate y col. en 1990, quienes aplicaron la técnica de AgNOR a una serie de meningiomas clasificados histológicamente en los grados 1, 2 y 3 encontrando diferencias significativas entre los

meningiomas correspondientes a los grados 1 y 2, mientras que entre los grados 2 y 3 no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa, ellos en su trabajo, utilizaron además 11 muestras de tumores recurrentes, reportando que de los 11, 8 revelaron potencial proliferativo

Maier y col. (1990) estudiaron 65 tumores cerebrales de los cuales 34 eran gliomas, 8 meningiomas, 17 tumores metastásicos y 6 más de otro origen; a todos los tejidos se les realizó inmunocitoquímica usando los anticuerpos monoclonales Ki-67 y bromodeoxiuridina, así como la técnica de AgNOR. Ellos encontraron que el promedio de AgNOR no correlaciona con los índices de proliferación y el grado de tumor en gliomas de bajo y alto grado. Sin embargo, en los gliomas recurrentes de alto grado mostraron una tendencia a promedios de AgNOR más altos que los tumores primarios, por lo que el autor indica que el conteo de AgNOR es de valor limitado en este tipo de tumores. De los tumores manejados por Maier, solo los meningiomas mostraron una correlación significativa entre el promedio de AgNOR, índice de marcaje con la bromodeoxiuridina y malignidad, aún así el autor recomienda analizar un mayor número de muestras. En este trabajo menciona que las AgNOR intranucleolares aparecen generalmente como densos agregados formando estructuras homogéneas en las cuales las AgNOR usualmente no pueden ser bien distinguidas de manera individual en las 65 muestras tumorales a excepción de cuatro de ellos. Se cita a Maier, debido a que junto con este trabajo se han encontrado algunos otros en los cuales se menciona que no existe una correlación entre promedios de AgNOR y malignidad haciendo por lo tanto que esta técnica no sea tomada en cuenta como un método auxiliar para evaluar la malignidad celular así como también porque se acerca mucho al tipo de tumores que fueron manejados en esta investigación. También en este estudio se tuvo el mismo problema que el mencionado por Maier, ya que a medida que se incrementa la malignidad, el tamaño de las AgNOR disminuye y el encontrar zonas evaluables en el tumor a veces se dificulta por las zonas de necrosis que presenta el tejido, por lo que cuando se observaron dichos agregados intranucleolares, se tuvo mucho cuidado para distinguir si realmente era una estructura compacta o solo se encontraban las AgNOR muy juntas, si se lograba observar que estaban separadas entre sí se tomaba en cuenta para

el conteo como AgNOR independientes sin importar su tamaño. Las AgNOR observadas en alguna otra parte que no estuvieran dentro del nucléolo no fueron tomadas en cuenta para la cuantificación, además de que el grosor del corte como ya se mencionó en la metodología (2-3 $\mu$ ) ayuda a evitar confusiones en el conteo. Estos dos aspectos técnicos son muy importantes porque influyen de manera muy directa en los resultados y análisis del trabajo.

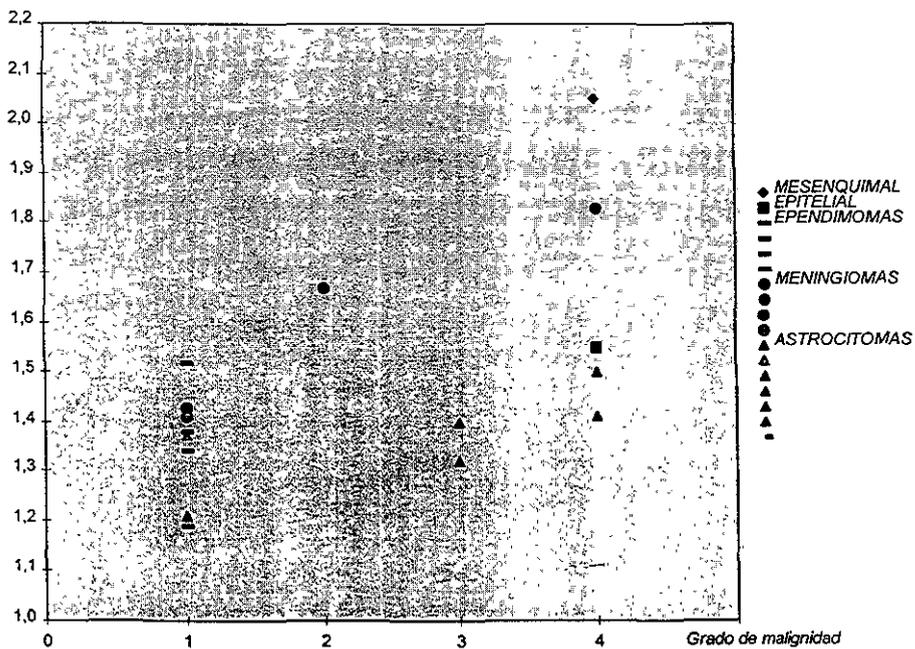
En mi opinión también es importante el contrañir las muestras con el colorante rojo neutro debido a que las RON toman un color café parduzco, mientras que los precipitados de plata de la técnica que llegaran a observarse permanecen en color negro.

En el caso del trabajo de Maier, también hay que tomar en cuenta la escala usada para asignar los grados de malignidad a los tejidos, en este caso la escala utilizada fue la de Kernohan que si bien toma en cuenta factores como la edad del paciente, grado del tumor y sobrevida postoperatoria, su clasificación pierde un tanto su mérito por su agrupamiento de astrocitomas como el fibrilar o pilocítico así como también en el manejo del término “glioblastoma” para tumores del grado 3 o 4. Esta escala se considera como un esquema de sobrevida de cuatro grados, sin embargo, los tumores tienden a ser agrupados como tumores de bajo (1-2) o alto grado (3-4) (Kleihues, 1993).

En el grupo de los ependimomas observamos que estadísticamente existe una diferencia significativa entre el subependimoma y el ependimoma mixopapilar, aún perteneciendo al mismo grado histológico (grado 1) y teniendo el mismo origen celular. De acuerdo a la literatura (Félix, 1996), estos tumores muestran un crecimiento lento conservando de manera relativa muy buena limitación, pero su pronóstico puede ser malo debido a su localización anatómica que hace difícil su total resección, lo anterior sin contar las combinaciones de los diferentes tipos de este tumor. Ahora bien, las RON como fragmentos de ADN $r$  los cuales tienen un papel esencial en la regulación de la síntesis proteica celular, pueden estar afectadas por el estado fisiológico aparte de la actividad proliferativa en algunos tipos celulares (Shibuya, 1993), lo cual explicaría la diferencia significativa entre los tumores arriba mencionados.

Promedio de RON

### Correlación entre RON y malignidad



Gráfica 1. Agrupamiento de los diferentes tumores por grado de malignidad histológica.

Con respecto al condrosarcoma mesenquimal y el carcinoma metastásico encontramos que a pesar de que ambos son altamente malignos existe entre ellos una diferencia significativa, estos tejidos son considerados histológicamente como grado 4 pero sus promedios son muy diferentes entre sí debido a que tienen un origen celular diferente. El condrosarcoma mesenquimal es un tumor maligno descrito inicialmente en huesos, el primer caso meníngeo fué reportado por Dahlin y Henderson en 1962, seguido de otros reportes los cuales lo ubican en las meninges intracraneales y espinales. Se han descrito áreas de cartilago en escasos meningiomas lo cual ilustra el potencial de desdiferenciación mesenquimal. El carcinoma metastásico a diferencia del condrosarcoma, es un tumor secundario, existen diferentes cánceres sistémicos que pueden involucrar al SNC. La compresión del cordón espinal por tumores malignos, por ejemplo, es mas frecuentemente causada por carcinomas de origen pulmonar, prostático y mamario que se han diseminado a las vértebras. En nuestro trabajo el carcinoma tuvo su origen en mama.

De acuerdo a Jordan y McGovern (1981), el número de los centros fibrilares en los nucléolos puede reflejar la actividad biosintética nucleolar. En el material procesado para microscopía electrónica encontramos diferencias entre los tumores en cuanto a la disgregación de los nucléolos, ya que en los tumores que presentan un grado menor de malignidad como el astrocitoma microquístico, meningioma o meningioma fibroblástico, los nucléolos se observan más disgregados que en los tejidos con mayor grado de malignidad, como el astrocitoma anaplásico, el glioblastoma multiforme, o el meningioma maligno en donde aparecen con un aspecto más compacto.

Como ya se mencionó en la introducción, a nivel de microscopía electrónica el nucléolo se encuentra dividido en los componentes fibrilar, fibrilar denso y granular. En este trabajo el componente que más se observa en los nucléolos de los tumores de menor malignidad es el componente granular, que estructuralmente corresponde a las unidades prerribosómicas, mientras que en los nucléolos de tejido con un mayor grado de malignidad el componente fibrilar denso es el que más frecuentemente se observa, correspondiendo éste al lugar en donde se lleva a cabo la transcripción de genes de ADNr.

Nuestras observaciones hechas mediante el microscopio electrónico están de acuerdo, de manera general, a lo evaluado estadísticamente en el material para microscopía de luz, es decir, cuando nosotros observamos que los números de las RON se incrementan en el tejido con mayor malignidad también notamos cualitativamente que a un nivel ultraestructural existe un incremento del componente fibrilar denso, mientras que en el tejido benigno no hubo un incremento notorio de las RON, así como el componente predominante a nivel de microscopía electrónica fué el componente granular, lo que nos puede indicar que existe una menor síntesis de ARNr permitiendo que los tres componentes del nucléolo aparezcan de manera más regular de acuerdo a los parámetros de normalidad

## VIII. CONCLUSIONES

Se concluye de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo y evaluados estadística y ultraestructuralmente que:

- 1) A mayor número de las RON existe un mayor grado de malignidad en los diferentes tipos de tumores.
- 2) La técnica de plata coloidal es confiable y útil como una herramienta cuantitativa que ayuda a determinar la malignidad tumoral.
- 3) La correlación de promedios de AgNORs con el grado de malignidad debe ser evaluado para cada tipo celular, ya que se observó un comportamiento diferente para cada grupo estudiado, independientemente de la malignidad expresada pero si dependiente de la línea u origen celular.
- 4) La presencia del componente fibrilar denso es más evidente a medida que se incrementa la malignidad en el tejido nervioso, lo que nos puede indicar una mayor actividad de transcripción de ADN ribosomal teniendo como consecuencia la proliferación celular.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1994. *Molecular biology of the cell*. 3a. ed. Garland Pu. Co. Inc. 434 pp
- Anderson, W.A.D. y J.M. Kissane. 1986. *Patología*. 8a. ed. Ed. Médica Panamericana. México. 2344 pp.
- Berkaloff; A. 1987. *Biología y fisiología celular*. Ed. Omega. Barcelona. 186pp.
- Bernhard, W. 1969. A new staining procedure for electron microscopy cytology. *J. Ultrastruct. Res.* 27:250-265.
- Bloom, C. y D.W. Fawcett. 1986. *Tratado de Histología*. 11a. ed. Ed. Interamericana. México. 1026pp.
- Buys, CHCM and J. Osinga. 1980. Abundance of protein bound sulphhydryl and disulphide groups at chromosomal nucleolus organising regions. *Chromosoma*. 77:1-11.
- Busch H and K. Smetana. 1970. *The nucleolus*. Academic Press. New York. 626pp.
- Crocker, J., D.A.R. Boldy and MJ. Egan. 1989. How should we count AgNORs? Proposals for a standardised approach. *J. Pathol.* 158:185-188.
- Dahlin, D.C. and D.E. Henderson. 1962. Mesenchymal chondrosarcoma: Further observation on a new entity. *Cancer* 15:410-417.

- Derinzini, M., C.M. Betts, C. Ceccarelli and V. Eusebi. 1986. Ultrastructural organization of nucleoli in benign naevi and malignant melanomas. *Virchows Arch. B. Cell Path.* 52:343-352.
  
- De Robertis, E.D y E.M. De Robertis. 1983. *Biología celular y molecular*. 10a ed. Ed. El Ateneo. México. 613pp.
  
- Echeverría, O.M. y G.H. Vázquez Nin. 1995. *El núcleo celular interfásico*. 1a ed. Coord. Serv. Edit. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 25pp
  
- Egan, M.J. and J. Crocker. 1992. Nucleolar organizer regions in pathology. *Br. J. Cancer.* 65:1-7.
  
- Félix, E.I.A. 1996. *Atlas de Neuropatología*. Ed. Auroch. México. 135pp
  
- Géraud, M.L., M. Herzog and M.O. Soyer-Gobillard. 1991. Nucleolar localization of RNA coding sequences in *Parosolenia micans* Ehr. (Dinoflagellate, kingdom Protocist) by in situ hybridization. *BioSystems.* 26:61-74.
  
- Hall, P.A., J. Crocker, A. Watts and A.G. Stansfield. 1988. A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non Hodgkin's lymphoma. *Histopathology.* 12:373-381.
  
- Hara, A., H. Hirayama, N. Sakai, H. Yamada, T. Tanaka, and H. Mori. 1991a. Correlation between nucleolar organization regions staining and Ki-67 immunostaining in human gliomas. *Surg. Neurol.* 33(5):320-324.
  
- Hara, A., H. Hirayama, N. Sakai, H. Yamada, T. Tanaka and H. Mori. 1991b. Nucleolar organization regions score and Ki-67 labelling index in high-grade gliomas and metastatic brain tumours. *Acta Neuropathol.* 109:37-41.

- Hara, A., H. Hiriyama, N. Sakai, H. Yamada, T. Tanaka and H. Mori. 1991. Nucleolar organization regions in vascular and neoplastic cells of human gliomas. *Neurosurgery*. 29:211-215.
  
- Henderson, D.W., J.M. Papadimitrou and M. Coleman. 1986. Ultrastructural appearances of tumours. Diagnosis and classification of human neoplasia by electron microscopy. 2a de. Ed. Churchill Livingstone. Nueva York.
  
- Howell, W.M. and D.A. Black. 1980. Controlled silver staining of nucleolar organization regions with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia*. 36:1014-1015.
  
- Jiménez García, L.F., J.M. Elizundia, B. López-Zamorano, A. Maciel, G. Zavala, O.M. Echeverría and G.E. Vázquez-Nin. 1989. Implications for evolution of nuclear structures of animal, plants, fungi and protocists. *BioSystems*. 22:103-116.
  
- Kleihues, P., C.P. Burger and B.W. Scheithauer. The new WHO classification of brain tumours. *Pathol*. 3:255-268.
  
- Kunishio, K., T. Ohmoto, T. Matsuhisa, T. Maeshiro, T. Furuta and K. Matsumoto. 1994. The significance of nucleolar organizer regions (AgNOR) score in predicting meningioma recurrence. *Cancer*. 73(8):2200-2205.
  
- Maier, H., T. Morimura, D. Oefner, C. Hallbrucker, K. Kitz and H. Budka. 1990. Argyrophilic nucleolar organizer region proteins (Ag-NORs) in human brain tumours: relations with grade of malignancy and proliferation indices. *Acta Neuropathol*. 80:156-162.

- Monneron, A. and W. Bernhard. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastructure Res.* 27:266-288.
  
- Ochs, R.L. and H. Busch. 1984. Further evidence that phosphoprotein C (110 KD/p.i. 5.1) is the nucleolar silver staining protein. *Exp. Cell Res.* 152:260-265.
  
- Olert, J. 1979. Cytological and histochemical studies on the mechanism of the selective silver staining of nucleolar organizer regions (NORs). *Histochemistry.* 60:91-103.
  
- Plate, K.H., J. Ruschoff and H.D. Mennel. 1990. Nucleolar organizer regions in meningiomas. Correlations with histopathologic malignancy grading, DNA cytometry and clinical outcome. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 12(6):429-438.
  
- Ploton, D., M. Menager, P. Jeannesson, G. Himber, F. Pigeon and J.J. Adnet. 1986. Improvement of staining in visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.* 18:5-14.
  
- Raska, Y., R.L. Ochs, and L. Salamin-Michel. 1990. Immunocytochemistry of the cell nucleus. *Electron Microsc. Res.* 3:301-353.
  
- Reyes-Castañeda, P. 1983. *Bioestadística aplicada*. Ed. Trillas. México. 216pp.
  
- Satoh, K., and H. Busch. 1981. Silver staining of phospherine and phosphouridine in nuclear and other phosphoproteins. *Cell Biol. Int. Rep.* 5:857-866.
  
- Scheer, U. and R. Benavente. 1990. Functional and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *Bio. Essays* 12:14-21.
  
- Schedle, A., M. Wilhelm, A. Zeitelberger, A. Gessl, K. Frauendorfer, C. Schöfer, H.G. Wachtler and Boltz-Nitulescu. 1992. *Cell Tissue Res.* 269:473-480.

- Shiraishi, T., K. Tabuchi, T. Mineta, N. Momozaki and M. Yakagi. 1991. Nucleolar organizer regions in various human brain tumours. *J. Neurosurg.* 74:979-984.
- Shibuya, M., S. Ito, T. Miwa, R.L. Davis, C.B. Wilson and T. Hoshino. 1993. Proliferative potential of brain tumors. Analyses with Ki-67 and anti-DNA polymerase alpha monoclonal antibodies, bromodeoxyuridine labeling and nucleolar organizer region counts. *Cancer.* 71(1):199-206.
- Smith, P.J., N. Skilbeck, A. Harrison and J. Crocker. 1988. The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. *J. Pathol.* 155:109-112.
- Valdez, B.C., D. Henning, T.V. Le and H. Busch. 1995. Specific aspartic acid-rich sequences are responsible for silver staining of nucleolar proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207(2):485-491.
- VandenBerg, S.R. 1992. Current diagnostic concepts of astrocytic tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 5(6):644-657.
- Vázquez-Nin, G.H., O.M. Echeverría and J. Pedrón. 1979. Effects of estradiol on the ribonucleoprotein constituents of the nucleus of cultures endometrial epithelial cells. *Biol. Cellulaire.* 35:221-228.
- Vázquez-Nin, G.H., O.M. Echeverría, S. Fakan, G. Leser and T.E. Martin. 1990. Immunoelectron microscope localization of snRNPs in the polytene nucleus of salivary glands of *Chironomus thummi*. *Chromosoma.* 99:44-51.
- Williams, M.A., J.A. Kleinschmidt, G. Krohne and W.W. Franke. 1982. Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of *Xenopus laevis* oocytes identified by gel electrophoresis. *Exp. Cell. Res.* 137:341-349.

- Wistuba, O.I., E.I. Roa, O.J.C. Araya, H.M. Villaseca y R.F. Chávez. 1993. Estudio cuantitativo de las regiones del organizador nucleolar en queratoacantoma y carcinoma epidermoide de la piel. Patol. 31:17-22.

- Zulch, K.J. 1979. Histological typing of tumours of the central nervous system, in: International histological classification of tumours, No. 21, Geneva: World Health Organization.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**