

## Asociaciones satélite y tinción AgNOR en pacientes\* con cancer de mama

*Angela Matos y Julia Molina*

*Laboratorio de Citogenética, Departamento de Biología  
Facultad Experimental de Ciencias, La Universidad del Zulia*

Recibido: 25-01-94 Aceptado: 20-05-94

### Resumen

En el presente trabajo se estudió la frecuencia de asociaciones satélite (AS) aplicando la tinción AgNOR en linfocitos de sangre periférica de 10 pacientes con cáncer de mama. Del total de células estudiadas (1403) se encontraron las siguientes frecuencias promedios: 17,616 células con AS; 1,361 AS por células; 2,489 cromosomas asociados por célula y 2,016 cromosomas por asociación.

No se observaron diferencias entre los resultados obtenidos y los reportados en la literatura para individuos normales, con excepción del promedio de células con AS, el cual fue menor al reportado en los controles. No se encontraron evidencias de que factores como las condiciones neoplásicas y los tratamientos de quimioterapia y radiaciones recibidos por los pacientes con cáncer de mama, causaran modificaciones (aumento o disminución) en las frecuencias de AS con respecto a individuos normales. De acuerdo con nuestros resultados, la frecuencia de las AS en pacientes con carcinoma de mama está influenciada no sólo por la intensidad de tinción de los NORs y en consecuencia por la actividad transcripcional de estos, sino también por otros factores tales como condiciones de cultivo, tipo de tejido y edad.

**Palabras claves:** Asociaciones satélite, tinción AgNOR, cáncer de mama.

## Satellite associations and AgNOR-stain on patients with breast cancer

### Abstract

The frequency of satellite associations (SA) with AgNOR-Stain in peripheral blood lymphocytes from ten patients with breast cancer were studied. The mean number of cells observed with SA was 17.616 and the mean value of SA per cell was 1.361. The mean number of associated chromosomes per cell was 2.488 and the number of chromosomes per association was 2.016. No major differences were evidenced between the results obtained in this study and those reported in the literature for the normal population. An exception was observed regarding the cells with a lower mean value than reported in the literature. Analysis of our results indicate that the SA frequency in breast cancer patients appears to be influenced by the NORs stains, its corresponding transcriptional activity and others intrinsic factors such as culture conditions, tissue type and age.

**Key words:** Satellite associations, AgNOR-stain, breast cancer.



## Introducción

Las regiones organizadoras del nucléolo (NORs) están situadas sobre los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (grupos D y G). Constituyen los lugares donde se localizan los genes que codifican para los ARN ribosomales 18S y 28S (1,2). Una tinción específica con la plata de ciertas proteínas residuales en los NORs refleja la actividad transcripcional de los genes de ARNr en la interfase precedente (3).

La asociación de las regiones organizadoras del nucléolo entre cromosomas homólogos y no homólogos es llamada asociación de satélite (AS). La asociación puede observarse como un bloque común de plata (Ag) después de tinción AgNOR (4).

La frecuencia con la cual un cromosoma está involucrado en una AS está positivamente relacionada con la presencia y la intensidad de la tinción con plata (5). No se ha demostrado que existan diferencias en las frecuencias de AS con respecto a la edad y el sexo (6,7,8). Sin embargo, se ha reportado una tendencia a la disminución con la edad (9,10) mientras que se ha encontrado que los cromosomas con NORs tienden a asociarse mayormente en hembras (11).

Diversos estudios se han llevado a cabo acerca de la actividad de los NORs en pacientes con enfermedades neoplásicas en tumores sólidos (12,13,14,15,16), así como en malignidades hematológicas: leucemia mieloide crónica (LMC) (17,18), leucemias agudas (19,18) y linfomas malignos (20). Sin embargo, existen pocas publicaciones acerca del grado de AS en pacientes con neoplasias, puesto que la mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo en individuos normales (1,2,4,18).

En nuestro estudio hemos analizado la frecuencia de AS entre cromosomas acrocéntricos en linfocitos de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama para investigar posibles diferencias con las fre-

cuencias reportadas en la literatura para individuos normales.

## Materiales y Métodos

Las muestras de sangre se obtuvieron de mujeres con cáncer de mama clínicamente diagnosticado, otorgadas por las Unidades de Oncología y Genética Médica del Hospital Clínico de Maracaibo.

Las preparaciones cromosómicas de linfocitos de sangre periférica se obtuvieron usando las técnicas convencionales. La técnica de cultivo de linfocitos utilizada para elaborar los cariotipos está basada en la descrita por Yunis (21). Se usó medio de cultivo RPMI 1640 con L-Glu, complementado con suero fetal bovino y solución penicilina-estreptomicina. El mitógeno usado fue la fitohemaglutinina. El cultivo fue colocado en estufa a 37°C durante 72 h. Para realizar las preparaciones se usó la fijación con Carnoy (metanol y ácido acético 3:1).

La tinción AgNOR utilizada está basada en la descrita por Goodpasture y Bloom (22). Para la tinción, se prepara una solución de nitrato de plata al 50% por ml de Sln. a la cual se le añaden 6 gotas de formalina. Una o dos gotas de la solución anterior se añaden sobre el portaobjetos con la preparación y luego se cubre con un cubreobjetos. Se lleva a estufa a 65°C durante 2 h aproximadamente. Después de este tiempo, la lámina se lava con agua destilada y se deja secar al aire.

Una vez realizadas y teñidas las preparaciones se llevó a cabo el estudio microscópico analizando un promedio de 140 metafases por paciente. En cuanto a la nomenclatura utilizada para describir las asociaciones, éstas se denominaron tomando en cuenta los cromosomas que intervienen en la asociación: G/G, si la asociación ocurría entre cromosomas del grupo G; D/D, si la asociación era entre cromosomas del grupo



D y D/G, si la asociación ocurría entre cromosomas de los grupos D y G.

Las pacientes fueron 10 mujeres con cáncer de mama, cuyas edades oscilan entre 29 y 66 años, 3 de ellas con carcinoma ductal, 2 con carcinoma ductal infiltrante, 1 con adenocarcinoma ductal infiltrante, 1 con carcinoma mixto:ductal+lobular, 1 con enfermedad de Paget con carcinoma ductal subyacente en piel, 1 con carcinoma lobular in situ. Siete de las pacientes habían recibido quimioterapia y cinco de ellas también recibieron radiaciones.

## Resultados

Algunas de las asociaciones satélite (AS) observadas con la tinción AgNOR se muestran en la Figura 1.

Las AS se reportaron sólo en los cromosomas de los grupos D y G.

Se estudió un total de 1403 células (del total de pacientes estudiadas) con tinción AgNOR. El cálculo de las frecuencias promedio de AS obtenidas en este trabajo se llevó a cabo a partir del total de células analizadas (1403 células).

La frecuencia promedio de las células que presentan cromosomas con AS fue 17,616. La frecuencia promedio de AS por célula fue 1,361 mientras que el número promedio de cromosomas asociados por por célula fue de 2,489. Por último, el número de cromosomas por asociación fue 2,016. Como puede observarse en la Tabla 1, hubo un descenso en la frecuencia promedio de células con AS comparado con lo reportado para individuos normales. Sin embargo, esta diferencia puede compensarse con las mayores frecuencias observadas en los diferentes tipos de AS que se muestran en la Tabla 2: G/G, D/D y D/G. Entre las AS observadas en las 10 pacientes estudiadas, la más frecuente corresponde a la que ocu-

re entre cromosomas del grupo D y cromosomas del grupo G (48,08%), seguido por asociaciones entre cromosomas del grupo D (38,85%) y por último, las asociaciones entre cromosomas del grupo G (13,064%)

## Discusión

Existen pocos reportes sobre AS en pacientes con neoplasias.

Pedrazzini y Slavutzky (14) reportan modificaciones en el grado de AS en pacientes con desórdenes linfoproliferativos. Se han reportado distintos rangos promedio de AS en sujetos controles (5,23,24). No se encontraron diferencias significativas entre las distintas frecuencias de AS reportadas en casos normales y las obtenidas en este estudio (Tabla 1). Sólo el número de células con AS fue menor al reportado en sujetos controles. Esta diferencia puede estar relacionada con el porcentaje de células que presentan 3 o más cromosomas asociados por célula. Se ha encontrado un alargamiento del ciclo celular en pacientes con linfoma no Hodking (25). De esta manera, interfases más largas pueden ocasionar frecuencias mayores de AS por célula, pensando, así, el bajo porcentaje promedio de células con AS obtenido por nosotros en pacientes con cáncer de mama.

En nuestro estudio, encontramos que las AS más frecuentes son las que ocurren entre cromosomas de los grupos D y G (Tabla 2). Sin embargo, nuestros resultados no dan evidencias significativas de que exista una asociación preferencial entre estos cromosomas en particular. Pensamos, al igual que otros autores (8,23,24) que las distintas frecuencias de AS dependen de diversos factores, tales como condiciones de cultivo, tipo de tejido, edad, etc.

En otro sentido, puesto que en la mayoría de los casos los cromosomas involucrados en AS presentaban los NORs teñidos

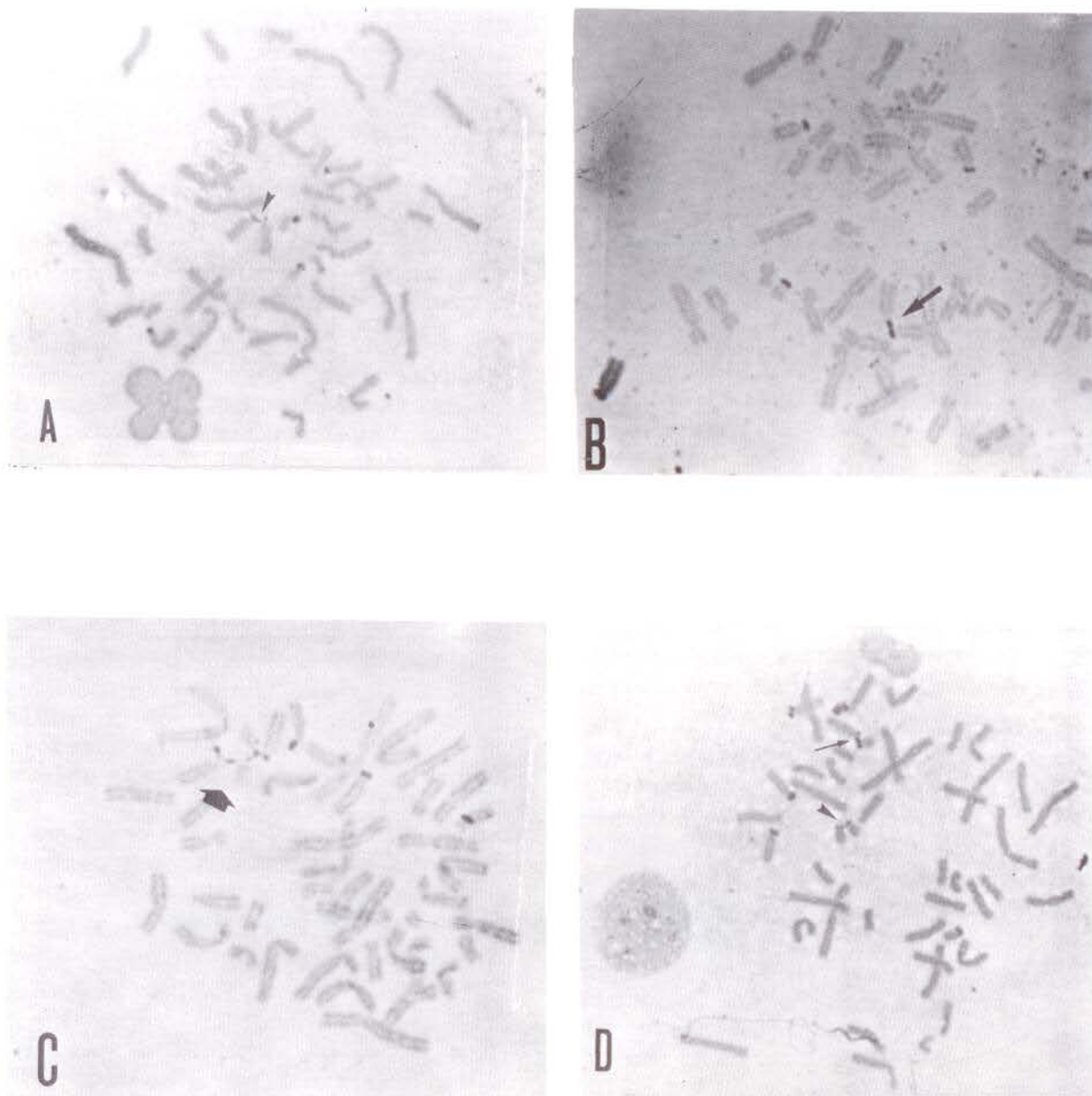


Figura 1. Algunas de las asociaciones satélites observadas en cromosomas de linfocitos de mujeres con cáncer de mama. Células con tinción AgNOR (1000 X).

- A. Célula metafásica con una asociación satélite entre dos cromosomas del Grupo D.
- B. Asociaciones satélite entre cromosomas del Grupo D.
- C. Metafase donde se muestra una asociación satélite múltiple entre cuatro cromosomas.
- D. Asociación satélite entre cromosomas de los Grupos D y G y otra entre cromosomas del Grupo G.



Tabla 1  
Frecuencias promedio de AS<sup>1</sup> observadas en linfocitos de sujetos controles<sup>2</sup>  
y los obtenidos en el presente estudio

	Rangos de valores promedios	Resultados promedio del presente estudio <sup>3</sup>
Número de células con AS	36,4 - 89,9	17,616
Número de AS por célula	0,21 - 1,88	1,361
Número de cromosomas asociados por célula	1,15 - 4,47	2,489
Número de cromosomas por asociación	2,09 - 2,47	2,016

<sup>1</sup> AS: Asociaciones S atelite

<sup>2</sup> Tomado de Fox y Sindwani, 1985

<sup>3</sup> Los valores se calcularon promediando a partir del total de pacientes estudiadas ( $\bar{X} = \Sigma Xi / n$ ; siendo  $\Sigma Xi$  la sumatoria de los valores promedio por caso y n el n umero total de pacientes, i.e., 10)

Tabla 2  
Asociaciones s atelite m as frecuentes

Caso	Grupo de cromosomas implicados en la asociación		
	D/D (%)	D/G (%)	G/G (%)
1	50,00	37,5	12,5
2	65,22	26,08	8,70
3	10,75	56,25	25,00
4	35,29	58,83	5,88
5	32,35	50,00	17,65
6	24,64	56,52	18,84
7	35,42	56,25	8,33
8	29,03	61,29	9,68
9	70,59	23,53	5,88
10	27,27	54,55	18,18
% Total Promedio	38,856	48,08	13,064

con plata, puede presumirse que la presencia de precipitados de plata en los NORs sea uno de los determinantes de la frecuencia de AS (5) y que por tanto, la frecuencia con la cual un cromosoma acrocéntrico humano participa en AS está relacionada con la presencia de plata en los NOR después de tinción AgNOR. Resultados idénticos se han obtenido en individuos normales (26,5,27).

Nuestro estudio no mostró evidencias de que factores como las condiciones neoplásicas y los tratamientos de quimioterapia y radiaciones recibidos por las pacientes con cáncer de mama, causaran modificaciones (aumento o disminución) en las frecuencias de AS con respecto a individuos normales.

De acuerdo con nuestros resultados, la frecuencia de las AS en pacientes con carcinoma de mama está influenciada por la intensidad de tinción de los NORs y, en consecuencia, por la actividad transcripcional de éstos, como se ha reportado anteriormente en individuos normales (28,22,5,29,16,30,31).

Por último, el valor de la tinción AgNOR para el estudio de las AS en citogenética clínica es evidente. Más significativo aún puede ser el uso de esta tinción como un medio citoquímico para investigar la estructura y función de los cromosomas en pacientes con diferentes neoplasias.

### Referencias Bibliográficas

1. FOX D., SINDWANI V.: Satellite association. *Karyogram* 11(1):13-9, 1985.
2. ING P., YU P., PALMER C.: Variations in the patterns of satellite associations. *Am J Hum Genet* 25:34A, 1973.
3. MILLER D.A., TANTRAVAHU R., DEV V.G., MILLER O.J.: Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. *Am J Hum Genet* 29:490-502, 1977.
4. GALPERIN H.: Comparative study of the association of human acrocentric chromosomes in male and female mitosis. *Cytogenetics* 7:447-454, 1968.
5. MURTY V.V.V.S., MITRA A.B., SHARMA J.K., LUTHRA U.K.: Nucleolar organizer regions in patients with precancerous and cancerous lesions of uterine cervix. *Cancer Genet Cytogenet* 18:275-279, 1985.
6. JACOBS P.A., MAYER M., MORTON N.E.: Acrocentric chromosome associations in man. *Am J Hum Genet* 28:567-576, 1976.
7. MILLER O.J., MILLER D.A., DEV V.G., TANTRAVAHU R., CROCE C.M.: Expression of human and suppression of mouse nucleolar organizer activity in mouse human somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:4531-4535, 1976.
8. RAVIA Y., LIEBERMAN I., RAVE A., KREMER M., AVIVI L.: High degree of satellite associations and decreased nucleolar organizer activity in cystic fibrosis subjects. *Am J Med Genet* 28:593-605, 1987.
9. BUTLER M.G., LANE J.R.: Effects of age, sex and multiple endocrine neoplasia type II on silver nucleolar organizer regions. *Mech Ageing Dev* 47:17-24, 1989.
10. EVANS H.J., BUCKLAND R.A., PARDUE M.L.: Location of the genes coding for 18s and 28s ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma* 48:405-426, 1974.
11. GALPERIN-LEMAITRE H., HENS L., SELE B.: Comparison of acrocentric association in male and female cells. Relationship to the active nucleolar organizers. *Hum Genet* 54:349-353, 1980.
12. CHENG D.M., DENTON T.E., LIEM S.L., ELLIOT C.L.: Variation in nucleolar organizer activity in lymphocytes of females with adenocarcinomas. *Clin Genet* 19:145-148, 1981.
13. DE LOZIER-BLANCHET C.D., WALT H., ENGEL E.: Ectopic nucleolar organizer re-



- glons (NOR) in human testicular tumours *Cytogenet Cell Genet* 41:107-113, 1986.
14. PEDRAZZINI E., SLAVUTZKY I.: Ag-NOR staining and satellite association in lymphoproliferative disorders. *Hereditas* 115:207-212, 1991.
  15. WARBURTON D., ATWOOD K., HENDERSON A.: Variation in the number of genes for rDNA among human acrocentric chromosomes: correlation with frequency of satellite association. *Cytogenet Cell Genet* 17:221-230, 1976.
  16. ZANKL H., HUWER H., ZANG, K.D.: Cytogenetic studies on the nucleolar organizer regions (NORs) activity in meningioma cells with normal and hypoploid karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet* 6:47-54, 1982.
  17. MAMAEV N., MAMAEVA S., LIBURKINA I., KOZLOVA T., MEDUEDENA N., MAKARKINA G.: The activity of nucleolar organizer regions of human bone marrow cells studied with silver staining I. Chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 16:311-320, 1985.
  18. MATTEI J.F., AYME S., MATTEI M.G., GUUVERNET J., GIRAUD, I.: Quantitative and qualitative study of acrocentric associations in 109 normal subjects. *Hum Genet* 34:185-194, 1976.
  19. ARDEN K.C., PATHAK S., FRANKEL L.S., ZANDER A.: Ag-NOR staining in human chromosomes: Differential staining in normal and leukemic bone-marrow samples. *Int J Cancer* 36:647-649, 1985.
  20. SIGMUND J., SCHWARZACHER H., MIKELSAAR H.: Satellite association frequency and number of nucleoli depend on cell cycle duration and NOR activity. Study on first, second and third mitosis of lymphocytic cultures. *Hum Genet* 50:81-91, 1979.
  21. YUNIS J., SANCHEZ O.: The G-banded prophase chromosomes of man. *Humangenetik* 2:1-6, 1975.
  22. GOODPASTURE C., BLOOM S.: Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53:37-50, 1975.
  23. RAY M., PEARSON J.: Nucleolar organizing regions of human chromosomes. *Hum Genet* 48:201-210, 1979.
  24. SCHMID M., KRONE W., VOGEL W.: On the relationship between the frequency of association and the nucleolar constriction of individual acrocentric chromosomes. *Hum Genet* 23:267-277, 1974.
  25. TRENT J.M., CARLIN D.A., DAVIES J.R.: Expression of silver stained nucleolar organizing regions (AgNORs) in human cancer. *Cytogenet Cell Genet* 30:31-38, 1981.
  26. DENTON T.E., HOWELL W.H., BARRETT J.V.: Human nucleolar organizer chromosomes satellite associations. *Chromosoma* 55:81-84, 1976.
  27. ZAKHAROV A., DADUDOV A., BENJUSH V., EGOLINA N.: Genetic determination of NOR activity in human lymphocytes for twins. *Hum Genet* 60:24-29, 1982.
  28. DE CAPOA A., FERRARO M., MENENDEZ F., MOSTACCI C., PELLICCIA F., ROCCHI A.: Ag-staining of the nucleolar organizer (NO) and its relationship to satellite association. *Hum Genet* 44:71-77, 1978.
  29. SLAVUTZKY I., DE VINUESA M.L., DE PARGAMENT M.M., LARRIPA I.: Cell cycle kinetics in hematologic diseases. *Cancer Genet Cytogenet* 28:357-361, 1987.
  30. KOHNO S., ABE S., MATSUI S., SANDBERG A.A.: Chromosomes and causation of human cancer and leukemia XXXVII. Nucleolus organizers on the Ph chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1:15, 1979
  31. SCHULZE B., GOLINSKI C., FONATSCH C.: Heterochromatin and nucleolus organizer regions in cells of patients with malignant and premalignant lymphatic diseases. *Hum Genet* 67:391-395, 1984.