

Evaluación del grado de queratinización y el recuento de AgNORs en citología exfoliativa de mucosa oral normal de individuos fumadores y no fumadores

Alejandra Isabel Orellana Bustos ⁽¹⁾, Iris Lucía Espinoza Santander ⁽²⁾, María Eugenia Franco Martínez ⁽³⁾, Nelson Lobos Jaimes -Freyre ⁽⁴⁾, Ana Verónica Ortega Pinto ⁽⁵⁾

(1) Cirujano Dentista

(2) Magister en Patología Oral. Facultad de Odontología

(3) Profesor Asistente, Facultad de Odontología

(4) Profesor Titular, Facultad de Odontología

(5) Magister en Patología Oral. Profesor Asistente. Facultad de Odontología. Universidad de Chile

Correspondencia:

Prof. Dra. Ana Ortega P.

Facultad de Odontología. Universidad de Chile

Casilla 1903. Fono-fax : (56) 02- 6781810 Santiago, Chile.

E-mail: aveortega@eudoramail.com

Recibido: 8-12-2002 Aceptado: 29-06-2003

Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martínez E, Lobos-Jaimes-Freyre N, Ortega-Pinto AV. Evaluación del grado de queratinización y el recuento de AgNORs en citología exfoliativa de mucosa oral normal de individuos fumadores y no fumadores. *Med Oral* 2004;9:197-203.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1137 - 2834

RESUMEN

Objetivos. En individuos fumadores con mucosa oral clínicamente sana, se han observado cambios citológicos como una mayor queratinización, existiendo también reportes de un mayor grado de actividad nucleolar. En estos estudios, las células para frotis se han obtenido por medio de espátula de madera. Nuestro objetivo es evaluar la profundidad de muestras citológicas de mucosa oral obtenidas con cepillo para frotis (endobrush) y comparar el grado de queratinización y la actividad nucleolar en pacientes fumadores y no fumadores.

Diseño del estudio. Se obtuvieron frotis de mucosa oral de borde de lengua clínicamente normal de 30 individuos fumadores y 30 no fumadores, utilizando espátula de madera y endobrush. Las muestras fueron teñidas con Papanicolaou y con la tinción AgNORs.

Resultados. Con la espátula de madera se obtuvo un mayor porcentaje de células epiteliales superficiales anucleadas ($P=0.016$) y con el endobrush se obtuvieron células más profundas (tipo intermedias) ($P=0.035$). Los individuos fumadores presentaron un mayor porcentaje de células superficiales anucleadas con ambas técnicas, diferencia que fue estadísticamente significativa con la técnica endobrush ($P=0.005$). El promedio de AgNORs en las células nucleadas fue mayor en los individuos fumadores (3.83) que en los no fumadores (2.79) ($P=0.003$).

Conclusiones. El endobrush permite obtener células de estratos más profundos. Los individuos fumadores con mucosa

clínicamente normal presentan un mayor porcentaje de células queratinizadas y una mayor actividad nucleolar, sugiriendo que el consumo de cigarrillo influye en la actividad celular de la mucosa del borde de lengua.

Palabras claves: AgNORs, regiones organizadoras del nucleolo, citología exfoliativa, mucosa oral, consumo de cigarrillo.

INTRODUCCION

Uno de los factores de riesgo más importantes del cáncer oral es el tabaco (1-5). Este riesgo aumenta a medida que se incrementa el número de cigarrillos consumidos y el tiempo de duración del hábito (2,6). En Chile, en una encuesta realizada a la población urbana entre 12 y 64 años en el año 2000, se observó que 48.7 personas de 100 consumieron tabaco (7). El sitio intraoral en que se ha reportado la mayor frecuencia de carcinoma espinocelular es la lengua, principalmente la superficie lateral posterior y ventral (8,9).

En células de la mucosa oral clínicamente sana de individuos fumadores se ha determinado un aumento del índice de proliferación en las células epiteliales (10), modificaciones en el núcleo y en el citoplasma (11-13) aumento de las células queratinizadas (14) y del número de AgNORs (Regiones Organizadoras del Nucleolo con afinidad por Plata) (15,16).

Los NORs o Regiones Organizadoras del Nucléolo son porciones de DNA ubicadas en los cromosomas 13-15 y 21 que codi-

fican para la producción de RNA ribosomal (17,18). Asociadas a estos NORs encontramos proteínas ácidas no histónicas con afinidad por plata llamadas AgNORs. El número de AgNORs por núcleo se ha correlacionado con la tasa de transcripción del ARN ribosomal, proliferación celular y ploidía del ADN (19,20). La tinción de AgNORs ha sido utilizada en citología de glándulas salivales y mesoteliales (21,22). Recientemente, de Castro Sampaio et al (15) y Cançado et al (16), utilizando espátula de madera para la obtención de las muestras, han estudiado el efecto del tabaco en individuos fumadores con mucosa oral clínicamente sana.

Desde hace algunos años se ha descrito la eficacia de utilizar un cepillo para la toma de frotis debido a la obtención de células más profundas, tanto de mucosa oral (23-26) como en ginecología (27).

Por lo expuesto anteriormente, es objetivo de este trabajo el comparar el porcentaje de células queratinizadas y la actividad nucleolar observados en la mucosa oral del borde de lengua de individuos fumadores y no fumadores, utilizando para la obtención de la muestra un cepillo para frotis y espátula de madera.

MATERIALES Y METODOS

Se tomaron frotis de borde de lengua a 30 individuos fumadores que tuvieran como condición consumir más de 10 cigarrillos al día por un mínimo de 10 años, y que no bebieran alcohol ni usaran enjuagatorios con alcohol en forma diaria. Como grupo control se seleccionaron 30 individuos con similares características, excepto el hábito de fumar. El primer grupo se encontraba en un rango de edad entre los 29 y 57 años, con un promedio de 39,5 años y el segundo grupo en un rango de edad entre los 30 y 58 años, con un promedio de 40,5 años. La relación hombre : mujer fue de 12 : 18 y de 11 : 19, respectivamente. A todos los individuos se les solicitó su consentimiento y se tomaron 3 muestras citológicas, una con espátula de madera y dos con endobrush. Las muestras fueron fijadas con fijador citológico Citofix^R spray, en base a alcohol.

Las muestras obtenidas con espátula de madera y una de las muestras obtenidas con endobrush recibieron tinción de Papanicolaou, para determinar el número de células superficiales anucleadas, células superficiales nucleadas y células intermedias (14), empleando un aumento de 400x. Las segundas muestras obtenidas con endobrush se tiñeron con la técnica de AgNORs. Esta consiste en un preparado fresco que contiene una parte con gelatina al 2% en una solución de ácido fórmico al 1% y dos partes de nitrato de plata al 50% (28). Las muestras fueron sumergidas en esta solución e incubadas en la oscuridad por un período de 25 min. a temperatura de 45° C, y posteriormente se contó el número de AgNORs por célula, según el Método de Howat (29). Las muestras fueron observadas en un microscopio Nikon Microphot-FXA, utilizando un aumento 1000x y aceite de inmersión. El examinador, que desconocía el origen de las muestras, contó en 100 células por frotis el número de puntos de tinción de AgNORs, excluyendo para el recuento las células superficiales anucleadas y las nucleadas con gránulos de queratohialina que podían llevar a errores en el recuento. Luego de contar el número de AgNORs por célula, se

estableció el promedio para individuos fumadores y no fumadores. Los primeros diez frotis fueron contados en una manera no consecutiva tres veces para calibrar al examinador.

Las diferencias citológicas entre pacientes fumadores y no fumadores fueron evaluadas mediante la prueba de chi cuadrada (X^2) y la prueba de t de Student con el software estadístico PRIMER. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa al valor $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

En el grupo de individuos fumadores la distribución total de células observadas fue: 16,8% de células superficiales anucleadas, 29,6% de superficiales nucleadas y 53,6% de intermedias. En los individuos no fumadores se obtuvo 9,3% de células superficiales anucleadas, 38,5% superficiales nucleadas y 52,2% células intermedias. Al comparar las técnicas para tomar las muestras de frotis, observamos que con la espátula de madera se obtuvo un mayor porcentaje de células superficiales anucleadas ($P= 0.016$), mientras que con la técnica endobrush se obtuvo un mayor porcentaje de células de estratos más profundos (tipo intermedias) ($P= 0.035$) (Tabla 1).

Al comparar entre los individuos fumadores y no fumadores, observamos un mayor porcentaje de células superficiales anucleadas en los individuos fumadores, diferencia que fue estadísticamente significativa con la técnica endobrush ($P= 0.005$) (Tabla 2).

Los individuos fumadores tenían un promedio de 3,83 AgNORs por núcleo (Desviación estándar de 0,68) y los individuos no fumadores presentaban un promedio de 2,79 AgNORs por núcleo (Desviación estándar 0,62) (Figura 1, A y B). Esta diferencia en el número de AgNORs por núcleo entre los individuos fumadores y no fumadores fue estadísticamente significativa ($t= 3.488$, $P= 0,003$). La diferencia entre ambos promedios fue $-1,04$ con un Intervalo de Confianza de un 95% que se encuentra entre $-1,67$ y $-0,41$.

DISCUSION

Debido a que una de las limitaciones de la citología exfoliativa es la obtención de células superficiales, se está promoviendo el uso de cepillos para la toma de frotis de la mucosa oral (23-26). Nosotros observamos que efectivamente el endobrush permite obtener un mayor porcentaje de células de estratos más profundos, en este caso, células intermedias, mientras que con la espátula de madera se obtiene un mayor porcentaje de células superficiales anucleadas. Ogden et al (23) describieron que se obtenía un mayor grado de dispersión y una mayor cantidad de células con cepillos para frotis.

En la mucosa del borde de lengua, las células intermedias fueron las observadas con mayor frecuencia, tanto en individuos fumadores como en los no fumadores, alcanzando 55,5% y 60,4%, respectivamente, lo que coincide con lo descrito por Varvaky et al. (14). Estos autores encontraron que el mayor porcentaje de células en zonas de borde de lengua y mucosa de mejilla eran de tipo intermedias (60% y 62% respectivamente), mientras que el mayor porcentaje de células obtenidas de frotis de labio correspondían a células superficiales anucleadas.

En los individuos no fumadores el porcentaje de células superficiales anucleadas del borde de lengua fue 9.3%, similar al 10% observado por Varvaky et al. (14), quienes en su estudio excluyeron a los fumadores. En cambio, en los individuos fumadores de nuestro estudio, el porcentaje de células superficiales anucleadas del borde de lengua fue más alto, 17%. Este aumento en el número de células superficiales anucleadas u ortoqueratinizadas en mucosa oral de individuos fumadores ha sido observado por numerosos autores (2,6,30-32); sin embargo, esta respuesta de la mucosa oral no parece ocurrir de igual forma en todos los sitios anatómicos de la cavidad oral, Drouilly (30) no observó diferencias significativas en los tipos de células epiteliales obtenidas de frotis de piso de boca de pacientes fumadores y no fumadores. Se postula que este aumento en la producción de células queratinizadas sería provocado por la exposición directa al calor del cigarrillo y por la acción química de los productos volátiles del tabaco, con el fin de protegerse de estos agentes injuriantes(2,6). La importancia de evaluar los cambios celulares en el borde de lengua se debe a la alta frecuencia del cáncer espino celular en esta ubicación en nuestro país (33).

La técnica de AgNORs, se desarrolló en los años 80's y rápidamente se comenzó a emplear en el estudio de biopsias de diferentes tumores, y sólo recientemente se ha aplicado en citología (15,16). En nuestro estudio, el valor promedio de AgNORs por núcleo, en individuos fumadores fue de 3.83 y en el grupo de individuos no fumadores alcanzó a 2.79, resultados que son similares a los descritos por de Castro Sampaio et al. (15) quienes observaron un promedio de 3.4 AgNORs por núcleo en individuos fumadores, y de 2.6 en no fumadores. Recientemente, Cançado et al.(16) también determinaron un mayor recuento de AgNORs en los individuos fumadores, pero sus valores fueron menores a los observados por de Castro Sampaio et al (15) y por nosotros, 1.94 en los frotis de borde de lengua y 2.07 en los frotis de piso de boca.

En relación a la técnica, los tiempos de aplicación de la solución de plata fueron de 30 minutos en el estudio de Castro Sampaio (15), 25 minutos en el nuestro y 20 minutos en el estudio de Cançado (16); sin embargo, nosotros al igual que este último autor, no creemos que esta variación en la técnica influya en el recuento de los AgNORs.

Estas diferencias en el recuento de AgNORs podrían deberse a los distintos rangos de edad de los individuos, que en el estudio de Cançado (15) fue entre 50 y 70 años, y en nuestro estudio entre 29 y 57 años. Se ha descrito que en la mucosa oral durante el envejecimiento se produce una menor actividad proliferativa y atrofia epitelial (34). Otra explicación de este mayor recuento de AgNORs es la diferencia en el elemento utilizado para la obtención de la muestra, pues probablemente las células que nosotros obtuvimos eran más profundas debido al uso del endobrush.

El recuento de AgNORs se ha descrito como un buen método para determinar ploidia, actividad proliferativa (19,20), y como indicador de actividad metabólica no asociada a proliferación celular (35). En citología de mucosa oral normal la mayoría de las células obtenidas son del estrato intermedio y no del estrato basal o parabasal, y por lo tanto este aumento del recuento de

AgNORs lo asociamos a un aumento de la actividad metabólica o síntesis proteica en estas células.

La observación de los frotis puede ser a veces difícil, porque al parecer existiría una afinidad de la plata por el mucus y los residuos de alimentos(16), de tal forma que en la recolección de nuestras muestras pusimos énfasis en la realización de enjuagues con agua destilada, ya que observamos, previo a esta investigación en datos no mostrados, que sin estos enjuagues una gran cantidad de tinciones de fondo obstaculizaba el recuento.

Nuestros resultados sugieren que en la mucosa oral del borde de lengua clínicamente normal, el consumo de tabaco produce alteraciones celulares evidenciadas en la citología exfoliativa. Debido a que esta es una técnica no invasiva y un procedimiento fácil de realizar, el análisis de AgNORs puede ser un método auxiliar para monitorear individuos en grupos de riesgo para la prevención del cáncer oral.

ENGLISH

Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers

ORELLANA-BUSTOS AI, ESPINOZA-SANTANDER IL, FRANCO-MARTÍNEZ E, LOBOS-JAMES-FREYRE N, ORTEGA-PINTO AV. EVALUATION OF KERATINIZATION AND AgNORs COUNT IN EXFOLIATIVE CYTOLOGY OF NORMAL ORAL MUCOSA FROM SMOKERS AND NON-SMOKERS. MED ORAL 2004;9:197-203.

SUMMARY

Objective.In smokers with clinically normal buccal mucosa, cytological changes such as increased keratinization, and higher nucleolar activity have been observed. In these studies the cells for cytological smears were obtained with a wooden spatula.

Our objectives were to evaluate the depth of cytological smears of oral mucosa obtained with both a brush (endobrush) and a wooden spatula, and to compare the degree of keratinization and the nucleolar activity in smokers and non-smokers.

Design. We obtained cytological smears of clinically normal lateral tongues of 30 smokers and 30 non-smokers using both a wooden spatula and endobrush. The samples were dyed with Papanicolaou and the AgNORs.

Results. With the wooden spatula we found a greater percentage of enucleated superficial epithelial cells ($P = 0.016$) and deeper cells were obtained with an endobrush (intermediate cells) ($P =$

0.035). The smokers showed a greater percentage of enucleated superficial cells with both techniques, however this difference was significantly greater with Endobrush ($P=0.005$). The average of AgNORs in the nucleated cells was greater in smokers (3.83) than in non-smokers (2.79) ($P=0.003$).

Conclusion. The Endobrush allows the clinician to obtain deeper cells of buccal mucosa. Smokers with clinically normal mucosa show a greater percentage of keratinized cells and a greater nucleolar activity, suggesting that cigarette smoking influences the cellular activity of the mucosa of the lateral tongue.

Key words: *AgNOR, nucleolar organizer region, oral cytology, oral mucosa, smoking.*

INTRODUCTION

One of the most important risk factors of oral cancer is tobacco smoking (1-5). This risk is associated with the number of cigarettes smoked and the length of time of the habit (2,6). In a survey made three years ago in Chile, it was observed that 48.7% of urban people between ages 12 and 64 consumed tobacco (7). The most common site for intraoral squamous cell carcinoma is the tongue usually the lateral and ventral surfaces (8,9).

In smokers with clinically healthy oral mucosa it has been determined some changes such as: a higher rate of proliferation of epithelial cells (10), nuclear and cytoplasm alterations (11-13) as well as an increase in the number of keratinized cells (14) and the AgNORs count (Nucleolar Organizer Regions affinity by Silver) (15,16).

The NORs or Nucleolar Organizer Regions are loops of DNA located in chromosomes 13-15 and 21. They are responsible for the ribosomic RNA copy (17,18). This ribosomic DNA is associated with nonhistone acidic proteins with silver affinity called AgNORs. The number of AgNORs per nucleus has been correlated with the rate of transcription of the ribosomal ARN, proliferative activity and DNA ploidy (19,20).

The silver staining technique for NORs has long been used in the cytology of salivary glands and mesothelial cells (21,22). Recently, De Castro Sampaio et al. (15) and Cançado et al. (16) have used wooden spatulas to obtain smears in order to study the effect of the tobacco in normal buccal mucosa from smokers. For some years, the effectiveness of brush biopsy has been emphasized as a method of obtaining deeper cells, from oral mucosa (23-26) and gynecologic mucosa (27).

The purpose of this article is to compare the percentage of keratinized cells and the nucleolar activity observed in the lateral tongue mucosa from smokers and non-smokers. The smears were obtained with wooden spatula and Endobrush.

MATERIALS AND METHODS

The sample for this study comprises 60 individuals, 30 smokers and 30 non-smokers. Smokers were determined by those who smoked over 10 cigarettes per day over 10 years. Both groups were free from systemic diseases, were non-alcoholic and non-users of mouth rinses containing alcohol. The smokers were between 29 and 57 (average of 39.5 years old) and the non-smokers were between 30 and 58 (average of 40.5 years old).

The ratio male/female was 12/18 and of 11/19, respectively. Following informed consent, lingual smears were obtained: one with a wooden spatula and two with Endobrush, and fixed immediately in Citofix[®] spray.

All smears obtained with the wooden spatula and one of the smears obtained with Endobrush received Papanicolaou's method to determine the number of enucleated superficial cells, nucleated superficial cells and intermediate cells (14) using an 400x magnification. The second smears obtained with Endobrush were stained with the silver soaking technique adapted by Ploton et al. (28). The staining procedure was a fresh solution of Part A (2 g. gelatin in 100 ml. of water containing 2% formic acid) and of Part B (50% silver nitrate). They were mixed (1:2 v/v) in a dark room (28). The smears were soaked in this solution and incubated 25 min. at 45° C. The nucleuses from the first 100 cells were included in the counting. Cells without nucleus and the nucleated cells with keratohialine granules that might produce errors were not included. The number of AgNORs per cell was counted according to the Howat's method (29).

The smears were observed at x1000 magnification under an oil immersion in a Nikon Microphot-FXA microscope by an examiner who did not know the origin of the samples. The first 10 slides were counted non-consecutively three times to calibrate the examiner. The average number of AgNORs obtained per slide were compared in both groups; smokers and non-smokers. The cytological differences between smokers and non-smokers were evaluated by a chi-square (X^2) test and a Student t - test with PRIMER statistical software. Statistical significance was defined as $P \leq 0.05$.

RESULTS

In smokers, the total distribution of observed cells was: 16.8% enucleated superficial cells, 29.6% nucleated superficial and 53.6% intermediate cells. In non-smokers, the total distribution of observed cells was: 9.3% enucleated superficial cells, 38.5% nucleated superficial and 52.2% intermediate cells. We observed a greater percentage of enucleated superficial cells with the wooden spatula ($P = 0.016$). Whereas with the Endobrush we obtained a greater percentage of deeper layer cells (type intermediate) ($P = 0.035$) (Table 1).

When comparing smokers and non-smokers, we observed a greater percentage of enucleated superficial cells in smokers, a difference that was significantly different with the Endobrush ($P = 0.005$) (Table 2). The smokers had an average of 3.83 AgNORs per nucleus (Standard deviation of 0.68) and the non-smokers had an average of 2.79 AgNORs per nucleus (Standard deviation 0.62) (Figure 1, A and B). This difference in the number of AgNORs per nucleus between smokers and non-smokers was statistically significant ($t = 3.488$, $P = 0.003$). The difference between both averages was -1.04 with an Interval of Confidence of 95% which is between -1.67 and -0.41.

DISCUSSION

Because one limitation of exfoliation cytology is the obtaining of superficial cells, the use of brushes for the smears of the oral

Tipo celular ----- <i>Cellular type</i>	Espátula Madera ----- <i>Wooden spatula</i>		Endobrush		t	P
	Promedio ----- <i>Average</i>	Desv. Est. ----- <i>Standard Deviation</i>	Promedio ----- <i>Average</i>	Desv. Est. ----- <i>Standard Deviation</i>		
Superficial anucleada ----- <i>Enucleated superficial cells</i>	16.67	±17.59	9.43	±14.60	2.45	0.016
Superficial nucleada ----- <i>Nucleated superficial cells</i>	35.50	±23.20	32.58	±22.34	0.70	0.484
Intermedia ----- <i>Intermediate cells</i>	47.83	±28.87	57.98	±23.08	-2.12	0.035

Table 1. Distribution of the three cellular types obtained with wooden spatula and Endobrush.

Tabla 1. Distribución de los tres tipos celulares obtenidos con espátula de madera y endobrush.

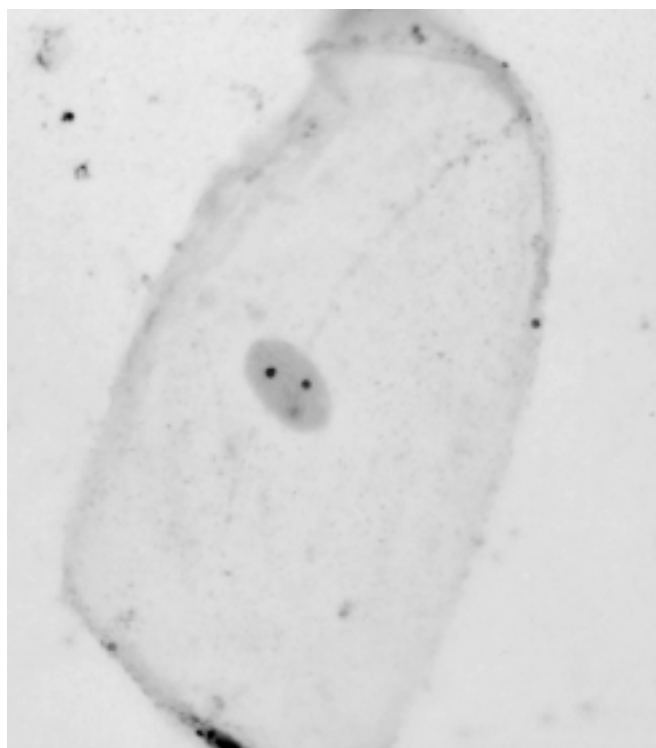


Fig. 1A.

Fig. 1B.

Tipo celular ----- <i>Cellular type</i>	Fumadores ----- <i>Smokers</i>		No Fumadores ----- <i>Non Smokers</i>		t	P
	Promedio ----- <i>Average</i>	Desv. Est. ----- <i>Standard Deviation</i>	Promedio ----- <i>Average</i>	Desv. Est. ----- <i>Standard Deviation</i>		
Superficial anucleada ----- <i>Superficial cells</i>	14.63	±18.46	4.23	±6.1	2.93	0.005
Superficial nucleada ----- <i>Nucleated superficial cells</i>	29.83	±17.35	35.33	±26.43	-0.95	0.345
Intermedia ----- <i>Intermediate cells</i>	55.53	±19.22	60.43	±26.50	-0.82	0.416

Table 2. Distribution of the type of cells obtained with Endobrush in smokers and non smokers.

Tabla 2. Distribución del tipo de células obtenidas con endobrush en individuos fumadores y no fumadores.

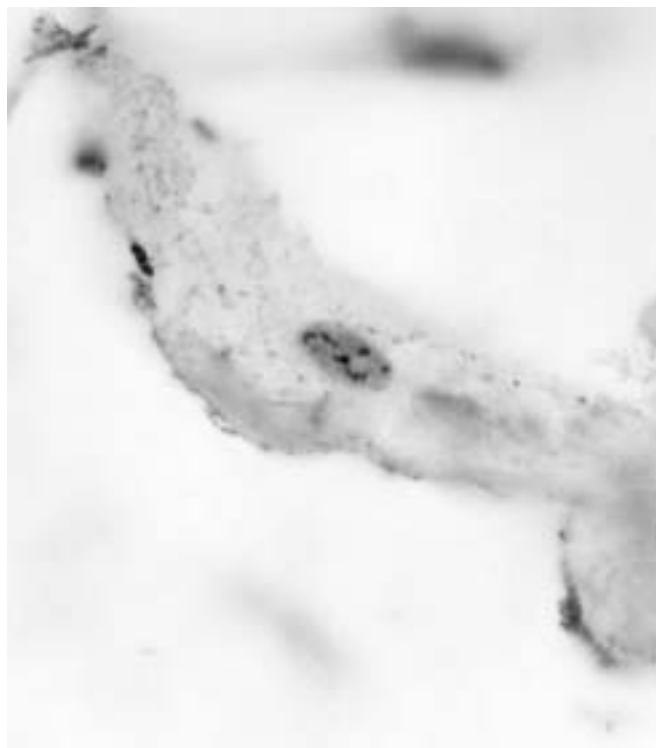


Fig. 1. Oral cytology of lateral tongue obtained with Endobrush and staining with AgNORs (1000x). 1A, non-smoker patient, 1B smoker patient.

Frotis de borde lingual tomados con endobrush, con tinción AgNORs (1000x). 1A, extendido de un paciente no fumador, 1B extendido de un paciente fumador.

mucosa is being promoted (23-26). We observed that indeed Endobrush allows one to obtain a greater percentage of deeper layers cell, in this case intermediate cells, whereas with the wooden spatula a greater percentage of enucleated superficial cells are obtained. Ogden (23) described that they received a greater rate of dispersion and a greater amount of cells using brushes for smears.

In the lateral tongue mucosa, the intermediate cells were the most frequently observed, as much in smokers as in non-smokers, 55.5% and 60.4 %, respectively, which concurs with Varvaky et al (14). These authors found that the greater percentage of intermediate cells in lateral tongue and cheek (60% and 62% respectively), whereas the greater percentage of cells obtained from smears of lips corresponded to enucleated superficial cells.

In non-smokers the percentage of enucleated superficial cells of the lateral tongue was 9.3%, similar to 10% observed by Varvaky et al (14) who in their study excluded smokers. However, in the smokers of our study, the percentage of enucleated superficial cells of the lateral tongue was higher, 17%. This increase in the number of enucleated or orthokeratinized superficial cells in oral mucosa of smokers has been observed by numerous authors (2,6,30-32). Nevertheless, this behaviour of the oral mucosa does not seem to happen in all anatomical sites of the oral cavity, Drouilly (30) did not observe significant differences in the types of epithelial cells obtained in smears of the mouth floor of smokers or non-smokers. It is postulated that this increase in the production of keratinized cells would be caused by the direct stimulation of the heat of the cigarette and the chemical action of volatile products of the tobacco, with the purpose of protecting itself from these injurious agents (2,6). The importance of evaluating the cellular changes in the lateral tongue relates directly to the high frequency of the cancer in this part of the mouth in our country (33).

The technique of AgNORs was developed in the years 80's and was quickly used in the study of biopsies of different neoplasm, and only recently has it been applied to cytology (15,16). In our study, the value average of AgNORs per nucleus, in smoker was of 3.83 and in the group of non-smokers was of 2.79, results that are similar to those described by De Castro Sampaio et al. (15) who observed an average per 3.4 AgNORs per nucleus in smokers, and of 2.6 in non-smokers. Recently, Cañado (16) also determined a greater count of AgNORs in smokers, but their values were smaller than those observed by De Castro Sampaio et al. (15) and by our study, 1.94 in smears of lateral tongue and 2.07 in smears of mouth floor.

Technically, the application times of silver solution were 30 minutes in the De Castro Sampaio et al. study (15), 25 minutes in our study and 20 minutes in the Cañado' study (16). Nevertheless like Cañado we do not think that this variation in the technique influences the count of the AgNORs.

These differences in the count of AgNORs could be due to different ages of the participants. For example, the Cañado study included participants between 50 and 70, and in our study between 29 and 57. It has been described that oral mucosa during

the aging has a smaller proliferation activity and epithelial atrophy (34). Another possibly explanation of this higher count of AgNORs is the difference of the implements used to obtain smears because the cells that we obtained were deeper due to use of Endobrushes.

The count of AgNORs has been described as a good method to determine ploidy, proliferation activity (19,20), and metabolic cell activity not associated with proliferation capacity (35). In our study, the most common type of cells obtained in normal oral mucosa were intermediate layer cells, but not basal or parabasal layers cells. Therefore this increase of the count of AgNORs was associated with a promotion of the metabolic activity or protein synthesis in these cells.

The observation of smears can sometimes be difficult by what is believed to be a silver affinity to mucous, food residues and other debris (16). Therefore, we performed mouth rinsing with distilled water before collecting smears, since we previously observed (data not shown) that a great amount of background stains without rinsing make counting difficult.

The results obtained in this study suggest that tobacco smoking produces cellular alterations in clinically normal mucosa of the lateral tongue shown in exfoliation cytology. Because this method of using a brush to obtain deeper cells is a non-invasive technique and an easy procedure, the AgNORs count can be an auxiliary method to control risk groups for the prevention of oral cancer.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

1. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 2001;65:328-39.
2. Winn DM. Tobacco use and oral disease. *J Dent Educ* 2001;65:306-11.
3. Mirbod SM, Ahing SI. Tobacco-associated lesions of the oral cavity: Part I Nonmalignant lesions. *J Can Dent Assoc* 2000;66:252-6.
4. Mirbod SM, Ahing SI. Tobacco-associated lesions of the oral cavity: Part II Malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 2000;66:308-11.
5. Rassekh CH. Tobacco cancer of the oral cavity and pharynx. *W V Med J* 2001;97:8-12.
6. Grinspan D. Lesiones de los fumadores de tabaco y masticadores de betel, tabaco y coca. En: *Enfermedades de la boca. Patología clínica y terapéutica de la mucosa bucal*. Vol. 2. Buenos Aires: Ed. Mundi; 1970. p. 891-98.
7. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. Diagnóstico epidemiológico del tabaquismo. En: *Salud sin Tabaco. Guía técnica – metodológica. Programa Ambientes libres del Humo de Tabaco*. Santiago 2001. p. 19-23.
8. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE, eds. *Oral & Maxilofacial Pathology*. Philadelphia: Ed W.B. Saunders Company; 1995. p. 297-301.
9. Wood NK, Goaz PW, eds. *Diagnóstico diferencial de las lesiones orales y maxilofaciales*. Madrid: Ed Harcourt Brace; 1998. p. 587-9.
10. Van Oijen MG, Gilsing MM, Rijkse G, Hordijk GJ, Slootweg PJ. Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and exsmokers. *Oral Oncol* 1998;34:297-303.
11. Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. The effect of tobacco smoking and of betel chewing with tobacco on the buccal mucosa: a cytomorphometric analysis. *J Oral Pathol Med* 1999;28:385-8.
12. Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med* 1990;19:53-5.
13. Hillman R, Kissin B. Oral cytologic patterns in relation to smoking habits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976;42:366-74.
14. Varvaky P, Santána M, Diniz J, Quadros O, Fatturi L, Capra P. Citología exfoliativa da cavidade bucal. *R Fac Odontol Porto Alegre* 1999; 40:53-9.
15. de Castro Sampaio H, Loyola AM, Gómez RS, Mesquita RA. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Acta Cytol* 1999;43:117-20.
16. Cañado R P, Yurgel L S, Santana Filho M. Evaluation of the nucleolar

- organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. *Oral Oncol* 2001;37:446-54.
17. Goessens G. Nucleolar structure. *Int Rev Cytol* 1984;87:107-58.
18. Smith R, Crocker J. Evaluation of nucleolar organizer regions associated proteins in breast malignancy. *Histopathology* 1988;12:113-26.
19. Derenzini M, Trere D. AgNORs proteins as a parameter of the rapidity of cell proliferation. *Zentralbl Pathol* 1994;140:7-10.
20. Egan MJ, Crocker J. Nucleolar organizer regions in pathology. *Br J Cancer* 1992;65: 1-7.
21. Cardillo MR. AgNOR technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses. *Acta Cytol* 1992;36:147-51.
22. Sujathan K, Kannan S, Raveendran K, Chandralekha B, Sreedevi N, Krishnan M. Significance of AgNOR count in differentiating malignant cells from reactive mesothelial cells in serous effusions. *Acta Cytol* 1996;40:724-8.
23. Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology. A comparison. *Acta Cytol* 1992;36:706-10.
24. Scuibba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions: Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. *JADA* 1999;130:1445-57.
25. Felefl S, Flaitz CM. The oral brush biopsy: It's as easy as 1,2,3. *Texas Dental J* 2000; 117:20-4.
26. Christian DC. Computer-assisted analysis of oral brush biopsies at an oral cancer screening program. *JADA* 2002;133:357-62.
27. Voupala S, Klemi PJ, Maenpaa J, Salmi T, Makarainen L. Endobrush sampling for endometrial cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1989;68:345-50.
28. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986;18:5-14.
29. Howat A, Giri D, Cotton D, Slater D. Nucleolar Organizer Regions in Spitz Nevi and Malignant Melanomas. *Cancer* 1989;63:474-8.
30. Drouilly D. Citología exfoliativa en pacientes fumadores. Tesis para optar al título de Cirujano-Dentista. Universidad de Chile. 1986.
31. Bastiaan RJ, Reade PC. The histopathologic features which follow repeated applications of tobacco tar to rat lip mucosa. *Oral Surg* 1980; 49:435-40.
32. Banoczy J, Gintner Z, Dombi C. Tobacco use and oral leukoplakia. *J Dent Educ* 2001;65:322-7.
33. Ferrada C, Oddo D, Harbst H, Madrid A, Capdeville F, Rondón C, et al. Cáncer de lengua. Presentación clínica y resultados a largo plazo. *Rev Chil Cancerología Hematología* 1998;8:91-106.
34. Hill MW, Squier CA. Epithelial proliferation and turnover in oral epithelia and epidermis. Squier CA, Hill MW eds. En: *The Effect of Aging in Oral Mucosa and Skin*. Boca Raton: CRC Press. 1994. p. 75-83.
35. Dayan D, Vered M, Sivor S, Hiss Y, Buchner A. Age-related changes in proliferative markers in labial salivary glands: a study of argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) and Ki-67. *Exp Gerontol* 2002;37:841-50.