

# Análisis de imágenes digitales de AgNORs en hiperplasia endometrial y adenocarcinoma

Catalina García-Vielma,<sup>1</sup>  Martha I. Dávila-Rodríguez,<sup>2</sup>  Ricardo M. Cerda-Flores,<sup>3</sup>   
y Elva I. Cortés-Gutiérrez,<sup>4\*</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Citogenética Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social; <sup>2</sup>Escuela de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León; <sup>3</sup>Escuela de Enfermería, Universidad Autónoma de Nuevo León; <sup>4</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

## Resumen

**Antecedentes:** Los AgNORs están ubicados en los satélites de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos. Se ha observado aumento de AgNORs en diferentes tipos de cánceres. **Objetivo:** Analizar el número, tamaño y forma de los AgNORs mediante imágenes digitales (DIA) en tejido de pacientes con cáncer de endometrio en diferentes estadios. **Material y métodos:** Se analizaron 42 secciones de bloques de parafina de tejido endometrial: lesiones benignas (proliferativo y secretor) y neoplásicas (hiperplasia y adenocarcinoma), teñidas con nitrato de plata. Se tomaron fotografías, se contabilizó el número de AgNORs, se midió área y contorno de núcleos por DIA. **Resultados:** Se observó aumento en número ( $5.85 \pm 4.15$  a  $13.55 \pm 5.9$ ), área ( $16.4 \pm 5.7$  a  $29 \pm 11.1$ ) y contornos nucleares ( $60.3 \pm 4.9$  a  $79.2 \pm 4.9$ ), con  $p < 0.05$ , desde lesión benigna hasta neoplásica. La forma esférica fue más frecuente en lesiones benignas (73 %) y la no esférica en neoplásicas (61.6 %), con  $p < 0.000$ . **Conclusiones:** La técnica de AgNORs y DIA, es una técnica sencilla que en conjunto con otras metodologías diagnósticas, podría apoyar el diagnóstico diferencial entre lesiones benignas y neoplásicas de tejido endometrial.

**PALABRAS CLAVE:** AgNORs. Cáncer de endometrio. Análisis de imágenes digitales. Hiperplasia. Adenocarcinoma.

## Digital image analysis of AgNORs in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma

### Abstract

**Background:** AgNORs are located on the satellites of the short arms of acrocentric chromosomes. Increased AgNORs have been observed in different types of cancer. **Objective:** To analyze the number, size, and shape of AgNORs using digital imaging (DIA) in tissue from patients with endometrial cancer at different stages. **Materials and methods:** Forty-two sections of paraffin blocks of endometrial tissue were analyzed: benign lesions (proliferative and secretory) and neoplastic lesions (hyperplasia and adenocarcinoma), stained with silver nitrate. Photographs were taken, the number of AgNORs was counted, and the area and contour of nuclei were measured by DIA. **Results:** An increase in number ( $5.85 \pm 4.15$  to  $13.55 \pm 5.9$ ), area ( $16.4 \pm 5.7$  to  $29 \pm 11.1$ ), and nuclear contours ( $60.3 \pm 4.9$  to  $79.2 \pm 4.9$ ) were observed, with  $p \leq 0.05$ , ranging from benign to neoplastic lesions. Spherical shapes were more common in benign lesions (73%) and non-spherical shapes in neoplastic lesions (61.6%), with  $p < 0.000$ . **Conclusions:** The AgNORs technique with DIA measurements is a simple technique that, when combined with other diagnostic methodologies, could aid in the differential diagnosis between benign and neoplastic lesions in endometrial tissue.

**KEYWORDS:** AgNORs. Endometrial cancer. Digital image analysis. Hyperplasia. Adenocarcinoma.

#### \*Correspondencia:

Elva I. Cortés-Gutiérrez

E-mail: elvairenegutierrez@yahoo.com.mx

0016-3813/© 2025 Academia Nacional de Medicina de México, A.C. Publicado por Permanyer. Este es un artículo open access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Fecha de recepción: 12-02-2025

Fecha de aceptación: 28-07-2025

DOI: 10.24875/GMM.M25001042

Gac Med Mex. 2025;161:627-633

Disponible en PubMed

[www.gacetamedicademexico.com](http://www.gacetamedicademexico.com)

## Introducción

Las regiones organizadoras del nucléolo (NOR) son asas de ADN ubicadas en la región de los satélites de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos, es decir, los cromosomas 13, 14, 15, 21 y 22.<sup>1</sup> Las NOR comprenden grupos de genes que codifican para ARNr y que están asociados con la actividad transcripcional de la célula.<sup>2,3</sup> El tejido endometrial normal exhibe fases proliferativa y secretora, que son afectadas por estrógenos y progesterona, respectivamente.<sup>4,5</sup> Los cambios histológicos observados en la hiperplasia endometrial pueden ser difíciles de distinguir de los cambios iniciales de la fase proliferativa o del adenocarcinoma bien diferenciado.<sup>4</sup> El proceso de transformación de una célula normal a una neoplásica se caracteriza por un aumento en la síntesis proteica, incrementando así el número de NOR.<sup>6,7</sup> En este sentido, las NOR pueden considerarse un marcador de proliferación celular, diferenciación y transformación neoplásica. Mediante tinción con plata (Ag) de las NOR (AgNOR), estas estructuras se muestran como puntos de color negro-marronoso<sup>8</sup> y su número, tamaño y forma (pleomorfismo) pueden analizarse. Se han demostrado diferencias en el tamaño y forma de los AgNOR en algunos tumores.<sup>9-14</sup> Existen informes de cáncer cervicouterino con pleomorfismo de AgNOR<sup>15-24</sup> relacionado con una mayor actividad transcripcional.<sup>19</sup> El análisis de AgNOR puede realizarse mediante observación directa con microscopía, y algunos autores han propuesto el análisis digital de imágenes (DIA) de los AgNOR basado en software de análisis de imágenes.<sup>1,3,25,26</sup> Se han realizado varios estudios de lesiones endometriales preneoplásicas y neoplásicas y AgNOR;<sup>27-41</sup> sin embargo, pocos de ellos emplearon un análisis por DIA.<sup>42,43</sup> En el presente trabajo, analizamos el número de AgNOR en cortes de tejidos incluidos en parafina provenientes de lesiones benignas y neoplásicas del endometrio mediante microscopía de campo claro, y medimos el área de los AgNOR y los contornos de los núcleos usando DIA.

## Material y métodos

### Población de estudio

Se estudiaron un total de 42 muestras de cortes de tejido incluido en parafina provenientes de endometrio. Las muestras se obtuvieron de biopsias de

pacientes atendidas en la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Monterrey, Nuevo León, México. Se obtuvo previamente el consentimiento informado por escrito de todos los sujetos. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Nacional de Investigación Científica y Ética del IMSS y se realizó de acuerdo con los estándares éticos internacionales de la Declaración de Helsinki para estudios de investigación con seres humanos.

A cada paciente se le practicó una evaluación ginecológica y las biopsias fueron indicadas a criterio del médico tratante. Las muestras se agruparon según el diagnóstico histológico: grupo de lesiones benignas: proliferativa y secretora (n = 20) y grupo de lesiones neoplásicas: hiperplasia y carcinoma grado I a III (n = 22) Los análisis histopatológicos fueron confirmados por el mismo patólogo del Departamento de Patología, IMSS No. 23. Este fue un diagnóstico de primera vez para todas las pacientes. Ninguna de ellas tenía antecedentes de radioterapia, quimioterapia, uso de drogas, tabaquismo o terapia de reemplazo hormonal.

### Tinción de AgNOR

La técnica de tinción de AgNOR se realizó de acuerdo con Ploton et al. (1986),<sup>44</sup> con modificaciones. Se utilizaron portaobjetos con cortes de 4 µm de espesor de tejido incluido en parafina. Las muestras se desparafinaron en xilol 2 veces, 10 minutos cada una. Posteriormente se deshidrataron en una serie de etanol al 100%, 95%, 80% y 70%, 1 minuto en cada una, y se sumergieron en una solución de ácido acético: etanol (1:3) durante 5 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron con agua destilada y se sumergieron (10 inmersiones) en celuloidina al 1% en etanol:éter (1:1), aplicándose 1 gota de nitrato de plata al 50%/gelatina al 2% en ácido fórmico al 1% (pH 3; 2/1 v/v). Luego, se montaron con cubreobjetos, se sellaron con silicona y se incubaron a 37 °C en cámara húmeda y en oscuridad durante 1 hora. Los cubreobjetos se retiraron, los portaobjetos se enjuagaron, se sumergieron en cloruro de oro al 1% durante 5 minutos, se enjuagaron nuevamente y se sumergieron (dos veces) en tiosulfato de sodio al 5%. Luego se tiñeron con Wright al 0,28% durante 15 segundos y se enjuagaron. Finalmente, los portaobjetos se deshidrataron en etanol al 70, 90 y 100%, se aclararon en xilol y se montaron con resina y cubreobjetos.<sup>44</sup>

## Análisis microscópico de AgNOR

Las preparaciones se analizaron en un microscopio de luz convencional con objetivo de 100x en áreas seleccionadas sin cambios inflamatorios o necrosis. Los puntos negros intranucleares no refractivos fueron considerados como AgNOR. Se analizaron 100 células de cada grupo (lesiones benignas y neoplásicas), clasificándose según su forma con base en los criterios de Cortés-Gutiérrez et al. (2001)<sup>19</sup> y evaluándose en porcentajes.

## DIA de AgNOR

Los campos microscópicos representativos de las lesiones fueron fotografiados utilizando un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss®, Göttingen, Alemania) equipado con una cámara Axiocam MRm bajo las mismas condiciones de luz y aumento. Los contornos de los núcleos y las áreas que contenían AgNOR se examinaron con base en los criterios establecidos por Stemberger-Papic, 2006 utilizando el software ImageJ (NIH ImageJ Versión 1.4.3.67).<sup>45</sup> Se analizaron entre 100 y 300 células de los grupos benignos y neoplásicos del endometrio.

## Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando el software SPSS (IBM Corp. 2017. IBM SPSS Statistics para Windows, Versión 25.0. Armonk, NY). Se empleó un análisis descriptivo para determinar los valores promedio ( $\bar{x}$ ) y la desviación estándar (DE). Se utilizó ANOVA de una vía para comparar el número y el área de los AgNOR y los contornos nucleares entre los grupos de lesiones benignas y neoplásicas del endometrio. Se consideró significancia estadística un valor  $p \leq 0.05$ .

## Resultados

### Conteo de AgNOR

El rango de edad de las pacientes con lesiones neoplásicas fue de 23 a 67 años, mientras que en las pacientes con lesiones benignas fue de 23 a 61 años. Se analizaron 4.420 núcleos celulares. El número total de AgNOR por célula fue: lesiones benignas:  $5.85 \pm 4.15$ ; lesiones neoplásicas:  $13.55 \pm 5.9$  (Tabla 1)

**Tabla 1.** Número medio de AgNORs en pacientes con lesiones endometriales benignas y neoplásicas

Diagnóstico de lesiones endometriales	n de células estudiadas	n de AgNORs ( $\bar{X} \pm DE$ )
Benignas	2.000	$5.85 \pm 4.15$
Neoplásicas	2.420	$13,55 \pm 5,9^*$

\*Diferente a lesión endometrial benigna,  $p < 0.00$ .

**Tabla 2.** Número de AgNORs (%) según polimorfismos en pacientes con lesiones endometriales benignas y neoplásicas

Diagnóstico de lesiones endometriales	Esféricas		No esféricas		Total
	n	(%)	n	(%)	n (%)
Benignas	1.460	(73)	540	(27)	2.000 (100)
Neoplásicas	922	(38.4)*	1.498	(61,6)*	2.420 (100)

\*Diferente a lesiones endometriales benignas,  $p < 0.00$ .  
No esféricas = agrupado y elongado.

(Figura 1). Se observó una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.000$ ).

### Formas de AgNOR

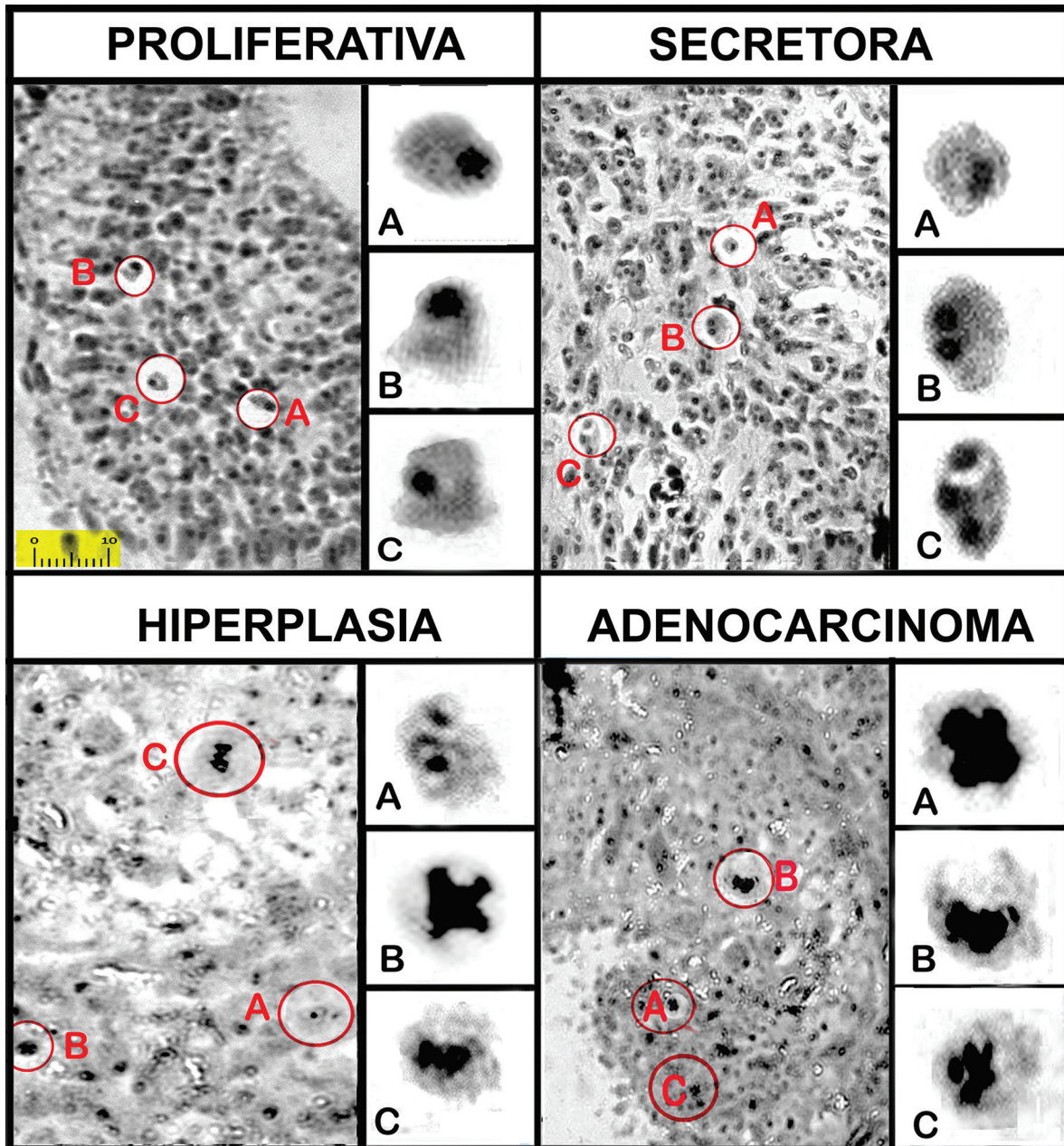
Se encontraron varios tipos de AgNOR: esféricos y no esféricos, estos últimos incluidas formas agrupadas y alargadas. La forma esférica fue la más común en las lesiones benignas (73%), pero se redujo en las neoplásicas (38.4%). En cambio, los AgNOR no esféricos fueron más comunes en las lesiones neoplásicas (61.6%) que en las benignas (27%) con  $p < 0.00$ . La forma alargada solo se observó en el grupo de lesiones neoplásicas (Tabla 2).

### Área de AgNOR

El área se calculó en píxeles mediante DIA: lesiones benignas:  $16.4 \pm 5.7$  píxeles; lesiones neoplásicas:  $29 \pm 11.1$  píxeles. Se observó una diferencia significativa entre grupos ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3).

### Contorno nuclear

La medición del contorno nuclear por DIA mostró un aumento de este parámetro en el grupo de lesiones neoplásicas ( $79.2 \pm 4.9$ ) frente al de lesiones benignas ( $60.3 \pm 4.9$ ), con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4).



**Figura 1.** Número y forma de AgNORs en pacientes con lesiones endometriales benignas (proliferativa y secretora) y neoplásicas (hiperplasia y adenocarcinoma). **A-C:** proyección endometrial proliferativa incluida en parafina y teñida con  $\text{AgNO}_3$ , aumento  $100\times$  ( $\approx 1000\times$ ), que muestra el núcleo con un AgNOR esférico. Tejido secretor con 1, 2 y 3 AgNORs esféricos (A, B y C, respectivamente). **A:** núcleo de tejido con hiperplasia con 2 AgNORs esféricos. **B:** AgNORs agrupados múltiples. **C:** núcleo con AgNORs alargados. **A-C:** núcleos de tejido con adenocarcinoma con múltiples AgNORs agrupados.

## Discusión

Nuestros resultados mostraron una diferencia significativa en el número de AgNORs observada al comparar los grupos de lesiones benignas y neoplásicas. En base a estos resultados, podemos deducir que el número de AgNORs aumenta conforme progresa la

lesión neoplásica, tal y como se ha demostrado en investigaciones previas en otros tipos de cáncer.<sup>4,26-30</sup> El número de AgNORs refleja la actividad transcripcional de la célula desencadenada por una demanda en la biogénesis ribosomal; además, proporciona información sobre el comportamiento tumoral y podría ayudar a distinguir lesiones benignas de neoplásicas.<sup>3</sup>

Stemberg-Papic et al. (2006) hallaron diferencias significativas en el número de AgNORs, lo cual permitió distinguir entre lesiones benignas y neoplásicas en los 3 grupos de tumores de tejido ovárico estudiados por los autores.<sup>3</sup> Mahovlic et al. (1999) examinaron muestras endometriales y reportaron que las diferencias en el número de AgNORs podían diferenciar adenocarcinoma grado 1 de hiperplasia y de tejidos normales.<sup>43</sup>

La forma esférica de los AgNORs fue la más frecuente en los grupos de lesiones benignas y neoplásicas del endometrio, seguida de los AgNORs agrupados; en cambio, los alargados solo se observaron en muestras neoplásicas. Estos resultados son similares a los descritos por Cortés-Gutiérrez en citologías cervicales.<sup>16</sup> Los AgNORs varían en tamaño y forma de acuerdo con la fase del ciclo celular, la transcripción nucleolar o la ploidía de la célula.<sup>1,27</sup> Los AgNORs se utilizan con frecuencia en el estudio de la proliferación celular en diversos tipos de tumores, cuyos resultados sugieren que pueden emplearse como marcadores de proliferación celular y pronóstico en varios tipos de lesiones.<sup>28-37</sup>

La medición del área de los AgNORs mediante DIA reveló un aumento significativo de este parámetro conforme iban avanzando las lesiones neoplásicas. Stemberger-Papic et al. (2006) describieron AgNORs simples en muestras normales, grupos de AgNORs con bordes regulares en lesiones limitófes y grupos de AgNORs con bordes irregulares en tumores neoplásicos. Asimismo, la medición del área de los AgNORs mediante DIA en ese estudio mostró un incremento progresivo del área a medida que iba aumentando la malignidad tumoral.<sup>3</sup> Mahovlic et al. (1999) hallaron diferentes tamaños de AgNORs (extra-grandes, grandes, medianos, pequeños y diminutos) en muestras citológicas endometriales. Las áreas promedio medidas mediante DIA también mostraron diferencias significativas entre el grupo de adenocarcinoma y el de hiperplasia compleja.<sup>43</sup>

Las mediciones del contorno nuclear mediante DIA revelaron un aumento progresivo de este parámetro conforme iban avanzando las lesiones neoplásicas. Se halló una diferencia significativa en el tamaño del contorno nuclear al comparar lesiones benignas con neoplásicas. Mahovlic et al.<sup>42</sup> hallaron un aumento del perímetro (contorno) del núcleo, medido mediante DIA, en muestras de tejidos proliferativos, hiperplasia simple, hiperplasia compleja, hiperplasia atípica, adenocarcinoma grado I, adenocarcinoma grado II y adenocarcinoma grado III. Este parámetro aumentó con

**Tabla 3.** Valores del área de AgNORs en píxeles obtenidos con ImageJ en pacientes con lesiones endometriales benignas y neoplásicas

Diagnóstico de lesiones endometriales	N.º de células estudiadas	$\bar{X} \pm DE$
Benignas	2.000	16.4 ± 5.7
Neoplásicas	2.420	29 ± 11.1*

\*Diferente a lesión endometrial benigna,  $p < 0.05$ .

**Tabla 4.** Valores del contorno de AgNORs en píxeles obtenidos con ImageJ en pacientes con lesiones endometriales benignas y neoplásicas

Diagnóstico de lesiones endometriales	n de células estudiadas	$\bar{X} \pm DE$
Benignas	2.000	60,3 ± 4,9
Neoplásicas	2.420	79,2 ± 4,9*

\*Diferente a lesión endometrial benigna,  $p < 0.05$ .

el avance hacia carcinoma.<sup>42</sup> Stemberg-Papic et al.<sup>7</sup> describieron diferencias significativas en el contorno nuclear, medido mediante DIA, entre grupos de tejidos ováricos con distintos grados de malignidad.<sup>3</sup> Las células en propensas a mostrar atipia con un incremento en el tamaño del núcleo durante el proceso de transformación neoplásica, probablemente debido al aumento en la ploidía celular.<sup>7</sup>

Por otro lado, marcadores inmunohistoquímicos tales como el Ki-67 se utilizan para evaluar la proliferación celular en ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de mama. Estos marcadores están bien establecidos por el *International Ki-67 Working Group in Breast Cancer*. No obstante, en el cáncer endometrial, el valor pronóstico de Ki-67 sigue siendo incierto debido a la falta de guías bien definidas para estandarizar su medición y relevancia clínica. No obstante, varios estudios han demostrado una correlación positiva entre Ki-67 y el desarrollo tumoral.<sup>46</sup>

En la actualidad, el riesgo de cáncer endometrial se analiza utilizando biomarcadores moleculares que combinan secuenciación de nueva generación y marcadores inmunohistoquímicos sustitutos: deficiencia de reparación de errores de apareamiento (MMRd), p53 anormal (p53abn), perfil molecular no dirigido (NSMP) y mutaciones en POLE (POLEmut). Estos marcadores proporcionan información sobre el comportamiento biológico del cáncer endometrial y tienen importantes implicaciones clínicas y pronósticas. Sin

embargo, pocos laboratorios de patología o diagnóstico pueden implementar estas técnicas, ya que requieren equipos caros y personal capacitado.<sup>47</sup>

La técnica de AgNOR, por el contrario, es fácil de implementar, requiere un equipamiento básico de laboratorio y permite cuantificar un gran número de células en un corto tiempo. Además, el uso de DIA para cuantificar el tamaño nuclear y el contorno permite evaluar la proliferación celular, la actividad ribosomal y la actividad transcripcional, proporcionando información adicional sobre el comportamiento biológico del tumor,<sup>1</sup> lo cual podría ser importante para predecir la respuesta a ciertos tratamientos y abordajes terapéuticos. Futuros estudios para evaluar la utilidad de los AgNORs como biomarcadores pronósticos son importantes y deberán considerar tanto el resultado histopatológico de la muestra como los síntomas clínicos del paciente.<sup>48,49</sup>

## Conclusiones

El uso de DIA para AgNORs en tejido endometrial podría ayudar a distinguir entre lesiones benignas y neoplásicas y, cuando se complementa con otros biomarcadores, el resultado histopatológico de la muestra y la presentación clínica de la paciente, contribuirá a una mayor precisión en el diagnóstico diferencial del cáncer endometrial.

## Limitaciones y perspectivas

En el presente estudio se hallaron diferencias significativas entre los grupos de lesiones benignas y neoplásicas en el número, forma y contorno de los AgNORs. No obstante, el tamaño de muestra fue limitado. Se requieren estudios futuros con muestras más grandes y validación cruzada con otras técnicas diagnósticas o modelos predictivos para considerar a los AgNORs como biomarcador predictivo en cáncer endometrial.

## Agradecimientos

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo financiero para la corrección en inglés del manuscrito.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses en este manuscrito.

## Financiamiento

Ninguno.

## Consideraciones éticas

**Protección de seres humanos y animales.** Los autores declaran que no se realizaron experimentos con seres humanos ni animales para esta investigación.

**Confidencialidad, consentimiento informado y aprobación ética.** El estudio no involucra datos personales de pacientes ni requiere aprobación ética. Las guías SAGER no aplican.

**Declaración sobre el uso de inteligencia artificial.** Los autores declaran que no se utilizó inteligencia artificial generativa en la redacción de este manuscrito.

## Referencias

1. Gupta B, Chandra S, Raj V, Gupta V. Quantitative analysis of Argyrophilic Nucleolar organizer regions in odontogenic cysts and tumor – A comparative study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2018;8(2):94–7.
2. Derenzini M. The AgNORs. *Micron*. 2000;31(2):117–20.
3. Stemberger-Papić S, Stanković T, Vrdoljak-Mozetic D, Versa-Ostojić D, Krasević M, Stifter S, et al. Morphometry and digital AgNOR analysis in cytological imprints of benign, borderline and malignant serous ovarian tumours. *Cytopathology*. 2006;17(6):382–9.
4. Czernobilsky B, Lifschitz-Mercer B. Endometrial pathology. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1997;9(1): 52–6.
5. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2009 May 27;105(2):103–4.
6. Liu J. The "life code": A theory that unifies the human life cycle and the origin of human tumors. *Seminars in Cancer Biology*. 2019 Feb;60: 380–97.
7. Martín de Civetta M, Civetta J. [Carcinogenesis]. *Salud Publica Mex*. 2011;53(5):405–14.
8. Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. The AgNORs proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron*. 2000;31(2):121–6.
9. Cibull ML, Heryet A, Gatter KC, Mason DY. The utility of Ki67 immunostaining, nuclear organizer region counting, and morphology in the assessment of follicular lymphomas. *The Journal of Pathology*. 1989;158(3):189–93.
10. Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *The Journal of Pathology*. 1987;151(2):111–8.
11. Crocker J, Skilbeck N. Nucleolar organiser region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *Journal of Clinical Pathology*. 1987;40(8):885–9.
12. Derenzini M, Romagnoli T, Mingazzini P, Marinozzi V. Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from neoplastic epithelial tumors of human intestine. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*. 1987;54(1): 334–40.
13. Yokoyama Y, Niwa K, Tamaya T. Scattering of the silver-stained proteins of nucleolar organizer regions in Ishikawa cells by actinomycin D. *Experimental Cell Research*. 1992 Sep;202(1):77–86.
14. Smith R, Crocker J. Original Paper. *Histopathology*. 2002;41(3a):98–110.
15. Alarcón L, Illades B, Flores E, Terán M, Antonio V, Reyes E. AgNORs polymorphism association with squamous intraepithelial lesions and invasive carcinoma with HPV infection. *Salud pública Méx*. 2009;51(2): 134–140.
16. Calore EE, Shirata NK, Shih LWS, Cavaliere MJ, de Siqueira M. Silver staining method for nucleolar organizer regions in cervical smears. *Diagnostic Cytopathology*. 1997;16(6):497–9.
17. Cardillo MR. Ag-NOR technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses. *Acta cytologica*. 1992;36(2):147–51.

18. Chowdhry A, Deshmukh RS, Shukla D, Bablani D, Mishra S. Quantitative estimation of AgNORs in normal, dysplastic and neoplastic oral mucosa. *Biomedical Papers*. 2014;158(2):282–7.
19. Cortés-Gutiérrez EI, Leal-Elizondo E, Cerda-Flores RM, Leal-Garza CH. Polymorphism of Ag(+)-NORs in cervical smears from women with cervical cancer. *Analytical and quantitative cytology and histology*. 2001;23(1):9–14.
20. Cortés-Gutiérrez EI, Reyna-Hinojosa R, Silva-Cudish J, Rojas-Alvarado MA, Leal-Garza CH. Activity satellite association and polymorphism of Ag stained nucleolus organizer regions (Ag+ NORs) in lymphocytes from women with cervical uterine cancer. *Archives of medical research*. 1997;28(1):19–23.
21. Derenzini M, Trerè D. [Silver-stained Nucleolar Organizer Regions (AgNORs)]. *Pathologica*. 2001;93(2):99–105.
22. Fiorella RM, Saran B, Kragel PJ. AgNORs counts as a discriminator of lesions of the endocervix. *Acta cytologica*. 1994;38(4):527–30.
23. Rüschoff J, Plate K, Bittinger A, Thomas C. Nucleolar Organizer Regions (NORs). *Pathology - Research and Practice*. 1989;185(6):878–85.
24. Srivastava A, Srivastava S, Bansal C, Misra J. Diagnostic importance of AgNORs pleomorphism in cervical carcinogenesis. *Ecancermedicalscience*. 2013;7:287.
25. García-Vielma C, Dávila-Rodríguez M, Hernández-Garza F, Cerda-Flores R, Cortés-Gutiérrez E. Digital image analysis of AgNORs in cervical smears of women with preneoplastic and neoplastic lesions of the uterine cervix. *Biotechnic & Histochemistry*. 2016;91(2):102–7.
26. Palaoro L, Rocher A. AgNORs technique could be useful for differential diagnosis of squamous carcinomatous cells and atypical cells related to human papillomavirus in cervical smears. *Biotechnic & Histochemistry*. 2009;84(3):73–8.
27. Bojarowska K. [Prognostic significance of AgNORs expression in endometrial cancer]. *Ginekologia polska*. 2004;75(7):522–7.
28. Brustmann H, Riss P, Naudé S. Histochemische Charakterisierung der Endometriumproliferation mittels AgNORs. *Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau*. 1994;34(4):220–2.
29. Brustmann H, Riss P, Naudé S. Nucleolar organizer regions as markers of endometrial proliferation: A study of normal, hyperplastic, and neoplastic tissue. *Human Pathology*. 1995;26(6):664–7.
30. Brustmann H, Riss P, Naude S. Nucleolar organizer regions as markers of endometrial proliferation: a study of normal, hyperplastic, and neoplastic tissue. *Hum Pathol*. 1995 26(6): 664-7.
31. Elagöz Ş, Arıcı DS, Aker H. Relationship between FIGO grade and AgNORs, S100-positive Langerhans cells in endometrial adenocarcinoma. *Pathology International*. 2000;50(8):616–9.
32. Ellinidi VN, Novik VI, Pozharisskii KM. [Investigation of nucleolar organizer region activity in epithelial cells of hyperplastic endometrial carcinoma tissue]. *Voprosy onkologii*. 2000;46(2):187–90.
33. Mauri F. AgNORs counts in endometrial and endocervical carcinomas. *Pathologica*. 1990 82(1080):399-403.
34. Miller B, Morris M, Silva E. Nucleolar Organizer Regions: A Potential Prognostic Factor in Adenocarcinoma of the Endometrium. *Gynecologic Oncology*. 1994;54(2):137–41.
35. Nielsen AL, Juul Nyholm HC, Engel P. Expression of MIB-1 (Paraffin ki-67) and AgNORs Morphology in Endometrial Adenocarcinomas of Endometrioid Type. *International Journal of Gynecological Pathology*. 1994;13(1):37–44.
36. Niwa K, Murase T, Morishita S, Tanaka T, Shimokawa K, Tamaya T. Changes in the number of silver-stained nucleolar organizer regions in the normal, preneoplastic, and neoplastic endometrium. *Cancer detection and prevention*. 1995;19(5):436–40.
37. Niwa K, Yokoyama Y, Tanaka T, Mori H, Mori H, Tamaya T. Silver-stained nucleolar organizer regions in the normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*. 1991;419(6):493–7.
38. Papadimitiou CS, Athanasiadou S, Stylianidou A, Karameris A. Nucleolar organizer regions in the normal, hyperplastic and carcinomatous epithelium of endometrium. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*. 1991;60(1):155–60.
39. Terlikowski S, Lenczewski A, Famulski W, Sulkowska M, Kulikowski M. Proliferative activity in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2001;39(2):163–4.
40. Terlikowski S, Lenczewski A, Sulkowski S, Kulikowski M. Nucleolar Organizer Regions in Differentiated Preneoplastic and Neoplastic Endometrial Lesions. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 1999;47(3):205–9.
41. Wilkinson N, Buckley CH, Chawner L, Fox H. Nucleolar Organiser Regions in Normal, Hyperplastic, and Neoplastic Endometria. *International Journal of Gynecological Pathology*. 1990;9(1):55–9.
42. Mahovlić V, Ovanin-Rakić A, Skopljanac-Macina L, Barisić A, Rajhvajn S, Juric D, et al. Digital morphometry of cytologic aspirate endometrial samples. *Collegium antropologicum*. 2010;34(1):45–51.
43. Mahovlić V, Audy-Jurković S, Ovanin-Rakić A, Bilusić M, Veldić M, Babić D, et al. Digital image analysis of silver-stained nucleolar organizer region-associated proteins in endometrial cytologic samples. *Analytical and quantitative cytology and histology*. 1999;21(1):47–53.
44. 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. *The Histochemical Journal*. 1986;18(1):5–14.
45. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671–5.
46. Kitson S, Sivalingam VN, Bolton J, McVey R, Nickkho-Amiry M, Powell ME, Leary A, Nijman HW, Nout RA, Bosse T, Renehan AG, Kitchener HC, Edmondson RJ, Crosbie EJ. Ki-67 in endometrial cancer: scoring optimization and prognostic relevance for window studies. *Mod Pathol*. 2017;30(3):459–468. doi: 10.1038/modpathol.2016.203.
47. Nagel, J., Paschoalini, RB, Barreto, PSD et al. Biomarcadores predictivos en carcinomas endometriales: una revisión de su relevancia en la patología anatómica diaria. *Surg Exp Pathol* 2024;7:21. <https://doi.org/10.1186/s42047-024-00164-2>
48. Leyva-Huerta E.R., Flores-Flores G., Gaitán-Cepeda L.A. ¿Son los AgNORs una herramienta útil como marcadores pronósticos de cáncer oral?. *Av Odontostomatol [Internet]*. 2008; 24(3): 211-218.
49. Wutzl A, Ploder O, Kermer C, Millesi W, Ewers R, Klug C: Mortality and causes of death after multimodality treatment for advanced oral and oropharyngeal cancer. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:255-60.