

**CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE DE GLÁNDULAS SALIVALES:
CORRELACIÓN ENTRE EL GRADO HISTOLÓGICO Y LA
PROLIFERACIÓN CELULAR. ESTUDIO DE 6 CASOS.**

Fernández, Javier Elías; Ávila, Rodolfo; Samar, María Elena.

Cátedra de Diagnóstico por Imágenes "A". Cátedra de Histología y Embriología "A". Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Javdens555@hotmail.com

RESUMEN

El carcinoma mucoepidermoide (CME) es el tumor epitelial maligno de glándulas salivales más común. La fracción de crecimiento corresponde a la proporción de células incluidas en el ciclo celular y puede ser fácilmente evaluada por el anticuerpo Ki-67. El objetivo del presente trabajo fue comparar la fracción de crecimiento tumoral en CME de bajo y alto grado, indicativa del comportamiento clínico y agresivo tumoral. Se realizaron cortes seriados de biopsias de CME de 6 casos donde se aplicó la siguiente metodología: estudio estructural e histoquímico (H/E, PAS, ATO y Dane/ Alcian Blue), evaluación de la proliferación celular (marcación para Ki-67) y determinación del índice mitótico con tricrómico de Hollande. El carcinoma mucoepidermoide está constituido por células mucosas, epidermoides, intermedias, claras y ocasionalmente de células oncocíticas. En el análisis y conteo de las muestras de CME de bajo y alto grado de diferenciación la expresión de Ki-67 fue muy evidente en los tumores de alto grado de malignidad. El cálculo del índice proliferativo para CME de bajo grado de diferenciación fue de 1.0% (rango de 1.2 - 0.8) y de 19.07% (rango de 21.7 a 17) para los CME de alto grado de diferenciación, siendo positivo para los CME de alto grado de malignidad. Con la técnica tricrómica de Hollande las células en división fueron fácilmente identificadas, pudiendo observarse las mitosis atípicas de las células neoplásicas. El índice mitótico fue de 4 mitosis cada 10 campos de mayor aumento en CME de alto grado siendo sensiblemente inferior o negativo en CME de bajo grado. Los resultados aportados demuestran que se obtiene una importante

información a partir del recuento de las mitosis en 10 campos de mayor aumento lo que permite obtener el porcentaje de células que en un momento dado están en mitosis. El grado histológico tumoral se asocia a la expresión de Ki-67.

Palabras claves: glándulas salivales, carcinoma mucoepidermoide, proliferación celular, inmunohistoquímica

INTRODUCCIÓN

Los marcadores de proliferación celular son herramientas de gran ayuda para el pronóstico y tratamiento de las neoplasias, ya que la proliferación celular constituye un mecanismo biológico de relevancia en la oncogénesis (Lazaro & Cleveland, 2000 Luuka et al. 2006 Loh et al. 2009.).

Algunos de estos marcadores se localizan de manera exclusiva en células en proliferación y su identificación inmunohistoquímica permite analizar la proliferación celular normal y patológica (Ochoa Gomez et al. 2009). Los marcadores de proliferación se han clasificado en: 1- marcadores de fracción de crecimiento, 2- marcadores de fases específicas del ciclo celular.

La fracción de crecimiento corresponde a la proporción de células incluidas en el ciclo celular y puede ser fácilmente evaluada por el anticuerpo Ki-67. El anticuerpo monoclonal Ki-67 se obtuvo por primera vez en la ciudad de Kiel (de allí su nombre) para el estudio de la línea celular de linfoma de Hodgkin, por Gerdes et al en 1983, tratando de conseguir un anticuerpo específico contra las células de Reed Sternberg (Scholsen & Verdes, 2000).

Este anticuerpo permite marcar el antígeno nuclear Ki-67, que es una proteína no histónica que se expresa en las células durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular y que está ausente en células en reposo (G0). Esto permite emplear Ki-67 para medir la fracción de crecimiento en tejidos normales y tumores malignos (García García et al. 2006).

El carcinoma mucoepidermoide (CME) es un tumor epitelial maligno de glándulas salivales constituido por proporciones variadas de células mucosas, epidermoides, intermedias, claras y ocasionalmente de células oncocíticas. El grado histológico tumoral (bajo, intermedio, alto) condiciona su comportamiento biológico (Afip, Samar et al. 2004).

Basándonos en lo anteriormente expuesto hemos comparado la fracción de crecimiento tumoral en CME de bajo y alto grado, indicativa del comportamiento clínico y agresivo tumoral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron biopsias de CME de 6 casos provenientes de cirugías de clínicas privadas de la ciudad de Córdoba (Argentina), (Tabla 1 y 2). Se revisaron los informes de Anatomía Patológica existentes en los archivos para ser reevaluados de acuerdo a la actual clasificación de la OMS (Auclair et al. 1992).

Se realizaron cortes seriados de cada muestra de 5 µm donde se aplicó la siguiente metodología: estudio estructural e histoquímico (H/E, PAS, ATO y Dane/ Alcian Blue), evaluación de la proliferación celular (marcación para Ki-67 de las células incluidas en el ciclo celular) y determinación del índice mitótico con tricrómico de Hollande que permite observar los núcleos en mitosis de color rojo.

Se analizó y determinó su grado histológico en cortes histológicos coloreados con H/E según el sistema de gradación tumoral de Auclair et al basado en variables observables con el microscópico óptico.

La evaluación de la inmunomarcación con Ki-67 se realizó en las preparaciones histológicas a través del sistema de cálculo de contaje celular en campos que carecían de áreas de necrosis y eran homogéneas en la población celular objeto de estudio (Gil- Salú et al. 2001). Sobre cada campo se contabilizaron a mayor aumento el número total y acumulado de células y las células marcadas mediante Ki-67.

A partir de este contaje se obtuvo un índice proliferativo aplicando la fórmula células marcadas / células totales x 100 (en porcentaje). La expresividad se determinó dando sólo puntuación positiva si existía más de un 10% de células marcadas y negativo si este porcentaje no llegaba a esta cifra o no había expresión de células teñidas.

De la misma manera se determinó el índice mitótico en cortes coloreados con tricrómico de Hollande a partir de la topografía tisular puesta de manifiesto con esta coloración aplicando la siguiente fórmula: células coloreadas / células totales x 100 (en porcentaje) cada 10 campos de mayor aumento (Gray, 1995).

RESULTADOS

- Características estructurales e histoquímicas

El diagnóstico del grado histológico tumoral basado en los parámetros de Auclair y Goode nos permitió diferenciar CME de alto y bajo grado. En los tumores de bajo grado de diferenciación (score de 0 a 4) predominaban quistes y microquistes delimitados por un epitelio donde se destacaban células mucosecretoras cuyo citoplasma era intensamente PAS positivo, metacromático y alcianofílico. Entre las áreas quísticas se identificaron nidos celulares sólidos que presentaron células epidermoides y claras entre las que se disponían células mucosas dispersas. No se observó atipia celular. (Fig 1 y 2).

En los 3 casos de tumores de alto grado de diferenciación (score de 7 o más) se observó un patrón de crecimiento sólido donde se destacaban las células epidermoides e intermedias

con un alto grado de atipia, anaplasia y mitosis atípicas. Las células PAS positivas se identificaron ocasionalmente. Se observaron áreas necróticas e invasión vascular.

- Determinación del índice mitótico y evaluación de la proliferación celular

Del análisis y conteo de las muestras de CME de bajo y alto grado de diferenciación la expresión de Ki-67 fue muy evidente en los tumores de alto grado de malignidad (Fig. 3). El cálculo del índice proliferativo para CME de bajo grado de diferenciación fue de 1.0% (rango de 1.2 - 0.8) y de 19.07% (rango de 21.7 a 17) para los CME de alto grado de diferenciación, siendo positivo para los CME de alto grado de malignidad.

Expresión de Ki-67 para CME de bajo grado de diferenciación

| |
|------------------|
| Ki-67 (n=3) |
| Media: 1.0 % |
| Rango: 1.2 - 0.8 |

Expresión de Ki-67 para CME de bajo alto de diferenciación

| |
|--------------------|
| Ki-67 (n=3) |
| Media: 19.07 % |
| Rango: 21.7 - 17.0 |

Con la técnica tricrómica de Hollande en cortes histológicos de CME de bajo y alto grado de diferenciación las células en división fueron fácilmente identificadas, pudiendo observarse las mitosis atípicas de las células neoplásicas (Fig. 4). El índice mitótico fue de 4 mitosis cada 10 campos de mayor aumento en CME de alto grado siendo sensiblemente inferior o negativo en CME de bajo grado.

DISCUSIÓN

De acuerdo al criterio de Auclair et al (1992) los tumores estudiados por nosotros fueron clasificados en CME de bajo y alto grado de diferenciación. Este sistema de gradación es una herramienta que permite detectar casos de mayor riesgo con una coloración standard de H/E en cortes histológicos de rutina. La inmunohistoquímica mostró una diferente coloración nuclear siendo su expresión importante en tumores de alto grado (score de 7 o + según gradación tumoral), lo que se asocia a un índice proliferativo positivo y, en consecuencia, a un pronóstico desfavorable y posiblemente refleje su curso clínico. (Gil- Salú et al. 2001 Uzma et al. 2008 Lao & Chen 2011). Por el contrario, en CME de bajo grado (score de 0 a 4) el índice proliferativo era negativo.

En nuestra casuística no diagnosticamos casos de CME de grado intermedio (score de 5-6). Algunos autores consideran a estos tumores como potencialmente de alto grado (Okabe et al. 2001).

Por otro lado, un sin número de técnicas tricrómicas aportan importante información sobre aspectos funcionales normales y patológicos de células y tejidos (Samar et al. 2004). Basándonos en esas aplicaciones empleamos la técnica tricrómica de Hollande () en los 6 casos de CME para observar las células en mitosis dentro de la población celular neoplásica y determinar el índice mitótico.

Se concluye que:

Los resultados aportados demuestran que se obtiene una importante información a partir del recuento de las mitosis en 10 campos de mayor aumento lo que permite obtener el porcentaje de células que en un momento dado están en mitosis.

El grado histológico tumoral se asocia a la expresión de Ki-67, que nos permite evaluar la proporción de células en ciclo celular.

Se estudiará el factor de crecimiento transformante β (1) ya que su expresión elevada puede jugar un importante papel en la transformación y proliferación celular en el CME (Lao & Chen, 2011).

Finalmente, se debe investigar la historia de seguimiento de los pacientes para correlacionar su evolución con el tipo histológico tumoral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Auclair, P.L., Goode, R.K., Ellis, G.L., (1992). Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. *Cancer*, 69: 2021-2030.
- García García, V., Gonzalez- Moles, M.A., Bascones Martínez, A., (2006). Expresión del bcl-2, Ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral. Resultados preliminares. *Av. Odontoestomatol.*, 22: 263-269.
- Gil- Salú, J.L., Gonzalez-Darder, J.M., Barcia Albacar, J.A., Pesudo, J.V., Vera-Román, J.M., Lázaro, R., Alós, M., (2001). Significación pronóstica de los factores de proliferación celular y del gen p53 en gliomas malignos supratentoriales del adulto. *Neurocirugía*, 12: 125-132.
- Gray, P. *The microtome's formulary and guide*. RE Krenger Publishing Co, Inc. Humtintong, New York, 1975.

- Lao, J.P., Chen, J.F., (2011). Expression of transforming growth factor – β (1) and Ki-67 nuclear antigen in salivary gland mucoepidermoid carcinoma. Zhonghua Kou Quiang Yi Xue Za Zhi, 46: 20-23.
- Lazaro, B., Cleveland, D., (2000). p53 and Ki-67 antigen expression in small oral biopsy specimens of salivary glands tumours. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., 89: 613-617.
- Loh, K.S. Barker, E., Bruch, G., O´Sullivan, B., Brown, D.H., Goldstein, D.P., Gilbert, R.W., Gullane, P.J., Irish, J.C., (2009). Prognostic factors in malignancy of the minor salivary glands. Head and Neck, 31: 58-63.
- Luuka, H., Klemi, I., Vahlberg, T., Grénman, R., (2006). Prognostic significance of Ki-67 and p53 as tumours markers in salivary gland malignancies in Finland: an evaluation of 212 cases. Acta Oncol., 45: 669-675.
- Ochoa Gomez, L.S., Martínez, E.M., Bustillo Rojas, J.A., (2009). Estudio comparativo de la expresión inmunohistoquímica del KI-67 en los ameloblastomas unicístico y sólido. Rev. Jav., 28: 67-73.
- Okabe, M., Inagaki, H.I., Murase, T., Inoue, M., (2001). Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. Mod. Pathol., 14: 1008-1014.
- Samar M.E., Avila R.E., Esteban Ruiz F., (2004). Técnicas histológicas. Fundamentos y aplicaciones. 1º edición. Córdoba. Ed SeisC.
- Scholsen, T., Verdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J. Cell. Physiol., 182: 311-332.
- Uzma, N., Nagi, A.H., Wagas, S., (2008). Ki-67 proliferating index and histological grade, type and stage of colorectal carcinoma. J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad., 20: 44-48.

ANEXOS

Tabla 1: Carcinoma mucoepidermoide de alto grado de malignidad: Distribución por sexo, edad y ubicación según caso.

| | Sexo | edad | ubicación |
|--------|------|---------|------------|
| Caso 1 | fem | 70 años | Parótida |
| Caso 2 | Fem | 15 años | Parótida |
| Caso 3 | Masc | 62 años | Submaxilar |

Tabla 2: Carcinoma mucoepidermoide de bajo grado de malignidad: Distribución por sexo, edad y ubicación según caso.

| | Sexo | edad | ubicación |
|--------|------|---------|-----------|
| Caso 1 | Fem | 44 años | Parótida |
| Caso 2 | Fem | 16 años | Paladar |
| Caso 3 | Fem | 51 años | Carrillo |

Tabla 3. Sistema de gradación tumoral de Auclair et al.

| GRADACION TUMORAL | |
|---------------------------------------|----------------|
| PARAMETROS | PUNTAJE |
| - Componente intraquístico < 20% | +2 |
| - Invasión neural | +2 |
| - Necrosis | +3 |
| - 4 mitosis/10 campos a mayor aumento | +3 |
| - Anaplasia | +4 |
| GRADO | SCORE |
| - Bajo | 0 - 4 |
| - Intermedio | 5 - 6 |
| - Alto | 7 |

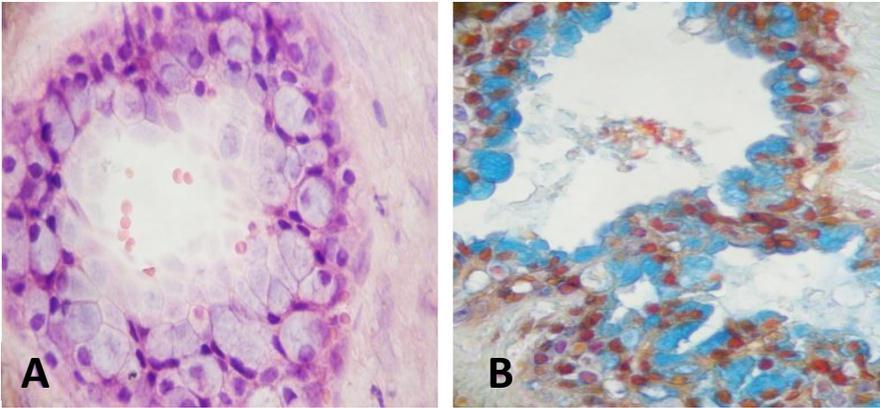


FIGURA 1: Carcinoma mucoepidermoide de bajo grado de malignidad. A. Nidos de células claras y epidermoides. H/E. 100x B. área quística con gran cantidad de células mucosas. Tricrómico de Dane/Alcian blue.100x.

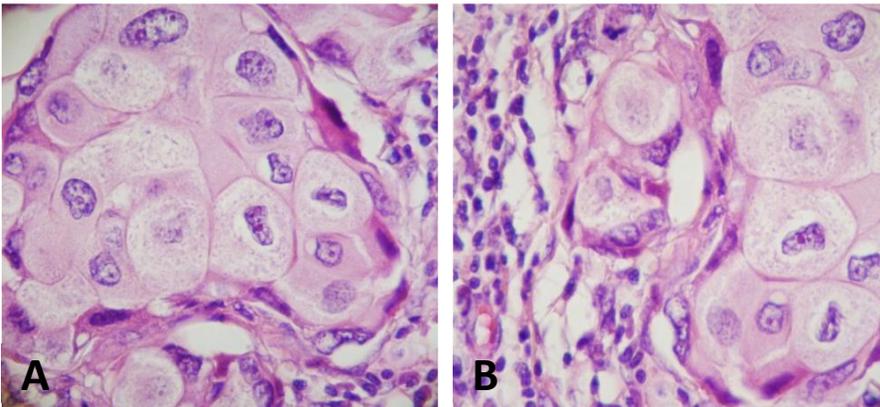


FIGURA 2: Carcinoma mucoepidermoide de alto grado de malignidad. A y B. nidos sólidos de células con signos de anaplasia. Mitosis atípicas. H/E. 200x.

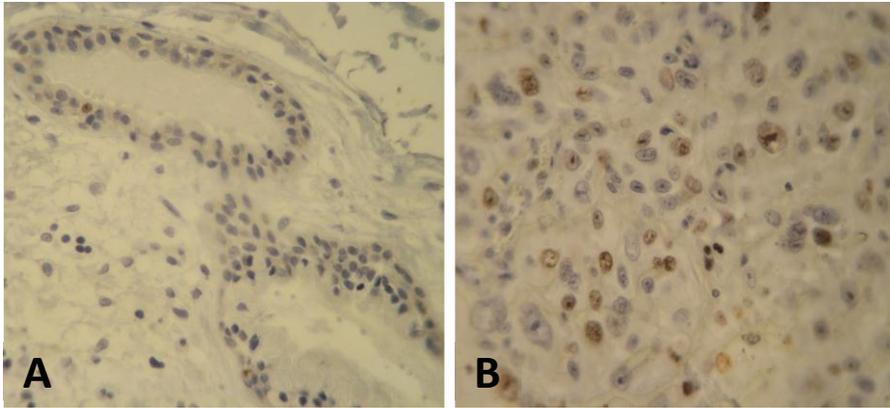


FIGURA 3: carcinoma mucoepidermoide. A. CME de bajo grado de malignidad con débil y escasa marcación. Ki-67. 100x. B. CME de alto grado de malignidad con abundante células marcadas. Ki-67. 100x.

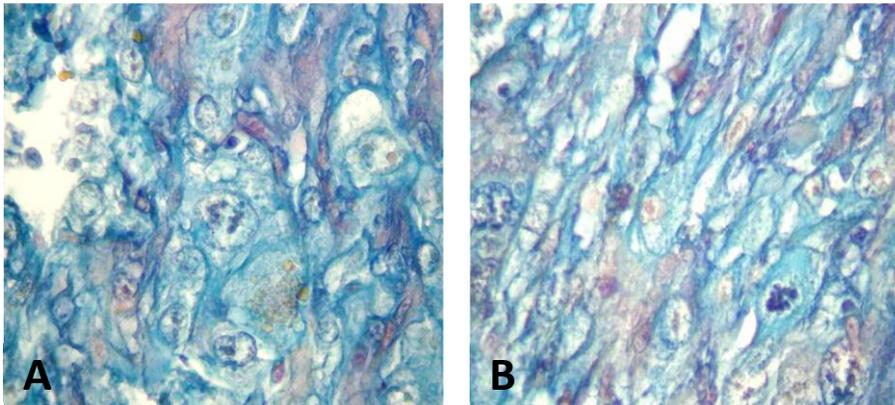


FIGURA 4: Carcinoma mucoepidermoide de alto grado de malignidad. Ay B. Células anaplásicas con signos de mitosis atípicas. Tricrómico de Hollande. 100x.