www.medigraphic.org.mx

Revista Odontológica Mexicana
Facultad de Odontología
Vol. 20, Núm. 4 ● Octubre-Diciembre 2016
pp 233-237
TRABAJO ORIGINAL

Correlación histológica de expresión de marcadores Ki-67 y ciclina D1 presentes en carcinomas de células escamosas en cavidad oral

Histological correlation of Ki-67 and D1 cycline markers expression in squamous cell carcinoma in the oral cavity

Edward Acero-Mondragón,* Rebeca Rodríguez-Farías,§
Martha Salazar-Hernández,§ Jenniffer Figueroa-Avendaño§

RESUMEN

Introducción: El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es una neoplasia maligna originada en los queratinocitos del epitelio. Biopsias tempranas, evidencian queratinocitos mitóticos displásicos e infiltrados inflamatorios subepiteliales que progresan a pérdida de la membrana basal. Sin embargo, en el diagnóstico histológico con hematoxilina y eosina (H&E) no se muestra adecuada correlación clínica, aspecto que mejora cuando se utilizan marcadores moleculares como Ki-67 y ciclina D1. El objetivo de este estudio es correlacionar la descripción histológica de casos de COCE con la expresión de Ki-67 y ciclina D1. **Material y métodos:** Se analizaron 12 pacientes con lesiones sugestivas de cáncer oral; fueron incluidos en el estudio pacientes con diagnóstico de COCE. Se tomaron biopsias únicas, procesamiento histotécnico para cortes en parafina, coloración con H&E y coloración inmunohistoquímica con ciclina D1 y Ki-67. Tres pacientes cumplieron con los criterios de inclusión, llamados C1, C2 y C3. Se clasificó el tipo de COCE según el *American Joint Committee on Cancer*. **Resultados:** Histológicamente el caso C1 fue clasificado como COCE tipo II, los casos C2 y C3 tipo I; en la inmunohistoquímica encontramos en C1 Ki-67 positivo y ciclina D1 negativo, para C2, Ki 67 negativo y ciclina D1 positivo y para C3 Ki-67 positivo y ciclina D1 negativo. **Conclusiones:** La búsqueda de marcadores como Ki-67 y ciclina D1 en diagnósticos de COCE preestablecidos, pueden influenciar los resultados histológicos, contribuyendo a un diagnóstico más acertado así como los tratamientos a realizar en el paciente.

ABSTRACT

Introduction: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignant neoplasia originated in the epithelium's keratocytes. Early biopsies reveal dysplastic mitotic keratocytes and sub-epithelial inflammatory infiltrate which progress towards a loss of basal membrane. Nevertheless, hematoxillin and eosin (H&E) histological diagnosis does not show suitable clinical correlation; this aspect improves when molecular markers such as Ki-67 and cyclin D1 are used. The aim of the present study was to correlate histological description of OSCC cases with Ki-676 and cyclin D1 expression. **Material and methods:** Twelve patients with lesions suggestive of oral cancer were analyzed, patients with OSCC diagnosis were included in the study. Single biopsies were taken, observing histological and technical processing for paraffin cuts, coloration with H&E and immunohistochemical coloration with cyclin D1 and Ki-67. Three patients met inclusion criteria, they were named C1, C2 and C3. OSCC type was classified according to the American Joint Committee on Cancer. **Results:** Histologically, C1 case was classified as type II OSCC. Cases C2 and C3 were classified as type I OSCC. Immunohistochemical analysis for C1 revealed Ki-67 positive and cyclin D1 negative; C2 exhibited Ki-67 negative and cyclin D1 positive, and C3 showed Ki-67 positive and cyclin D1 negative. **Conclusions:** Search for markers such as Ki-67 and cyclin D1 in pre-established OSCC diagnoses can influence histological results, contributing thus to more accurate diagnosis and treatment for the patients.

Palabras clave: Carcinoma oral de células escamosas, cáncer oral, ciclina D1, antígeno Ki-67.
Key words: Squamous cell oral carcinoma, oral cancer, cyclin D1, antigen Ki-67.

INTRODUCCIÓN

Según criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el carcinoma oral de células escamosas o COCE, es una neoplasia originada en los queratinocitos pertenecientes al estrato escamoso del epitelio oral, considerado maligno por su poder infiltrativo y tendencia temprana a metástasis.[1,2] Constituye más del 90% de las neoplasias malignas de la cavidad oral y orofaringe,[1,2] tiene mayor frecuencia en hombres[2] y su incidencia es considerada alta en el mundo occidental.[2,3] En Colombia, cifras oficiales calcularon para cán-

www.medigraphic.org.mx

* Facultad de Medicina Universidad Militar Nueva Granada - Grupo Morfología Médica. Bogotá, D.C., Colombia. Facultad de Medicina Universidad de La Sabana - Grupo Proseim. Bogotá, D.C., Colombia.
§ Departamento de Cirugía Oral y Maxilofacial, Hospital Militar Central - Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, D.C., Colombia.

Recibido: septiembre 2015. Aceptado: diciembre 2015.

© 2016 Universidad Nacional Autónoma de México, [Facultad de Odontología]. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Este artículo puede ser consultado en versión completa en http://**www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam**

cer de boca el séptimo más frecuente, con 2,000 casos nuevos cada año, entre 1989 y 1997, siendo la lengua la ubicación más frecuente con 26.8%.[4,5] En estudios locales en el Hospital San Vicente de Paul (Medellín-Colombia), entre los años 1990 a 1996, hallaron 228 casos de neoplasia orales, siendo de mayor frecuencia el ubicado en lengua con 30%,[6] y entre los años 1996 y 2003 en la misma institución se relacionaron 41% de los cánceres orales con consumo de alcohol.[7] COCE es habitual en los tercios anteriores y dorsos laterales de la lengua,[1,2,8] apareciendo tempranamente como zonas rojizas o ulceradas que evolucionan a masas indu-radas de márgenes elevados; tardíamente se convierten en grandes masas con focos necróticos e infiltración a ganglios, hueso, músculo y piel.[1] Histológicamente biopsias de COCE en estados incipientes, evidencian frecuentemente infiltrados inflamatorios subepiteliales que progresan a estadios con pérdida de membrana basal mostrando queratinocitos escamosos displásicos hipertróficos, irregulares, en atipia y presencia de figuras mitóticas incluso infiltrando la lámina propia.[2] En el diagnóstico definitivo, se acepta que el grado histológico no muestra adecuada correlación con la evolución del paciente,[9,10] aspecto que mejora cuando se evalúa la profundidad e infiltración de los márgenes invasivos[11-15] o se usan marcadores moleculares[16] entre éstos, Ki-67, un marcador de proliferación celular que se expresa en fase «S» del ciclo celular,[17,18] se correlaciona de manera significativa con las tasas de proliferación de COCE lingual,[19] y ciclina D1, un marcador que se relaciona en su expresión con malignidad[20] al expresarse en la fase «G1» del ciclo celular.[21,22] El objetivo de este estudio es correlacionar la descripción histológica de casos de carcinoma de células escamosas en cavidad oral con la expresión de Ki-67 y ciclina D1.

MATERIAL Y MÉTODOS

Mediante un estudio retrospectivo desde agosto 2011 hasta abril 2012, se analizó un grupo de 12 pacientes con lesiones sugestivas de cáncer oral de los cuales fueron incluidos en el estudio pacientes con diagnóstico de carcinoma de células escamosas en cavidad oral, atendidos en las Clínicas Odontológicas San Rafael, Bogotá, D.C., Colombia, previo aval del comité de ética de la institución y consentimiento informado de los pacientes, donde autorizaron el uso de la información, objetando fotos de los procedimientos. Fueron excluidos pacientes con datos insuficientes en historia clínica para completar análisis y aquellos sin disponibilidad de láminas histológicas.

Se realizaron biopsias únicas de 5 mm^3, tomadas de zonas centrales de las lesiones. El protocolo de procesamiento del Laboratorio de Histología Luis A. Granobles-Universidad de La Sabana, Bogotá, D.C., Colombia, para el manejo de especímenes obtenidos de cavidad oral es el siguiente: fijación de la muestra con formol al 10%, procesamiento histotécnico para cortes en parafina a 4 μ y coloración con hematoxilina y eosina (H&E). Se realizó nueva lectura histológica de los casos que cumplieron con los criterios de inclusión, con microscopio Carl Zeiss Axiostar y posteriormente los bloques de parafina se enviaron para coloración inmunohistoquímica de ciclina D1 y Ki-67 con obtención de control positivo. Se tomaron fotos con cámara adaptada a PC con software analizador de imágenes licenciado Motic Versión 4.61.

RESULTADOS

Tres pacientes cumplieron con el criterio de inclusión, todos del género masculino, edades comprendidas entre los 31 y 62 años con un promedio de 46 años (DE ± 12.6). En los tres casos las lesiones se ubicaban en la región lingual.

Caso 1: paciente masculino de 45 años de edad, quien consultó por una lesión en lengua de cuatro meses de evolución, sin reporte de antecedentes tabáquicos, consumo de alcohol o enfermedad sistémica. Paciente refirió zona álgida en región hemandibular izquierda, con adenopatía ipsilateral centrado en triángulo submaxilar de esta zona. Al examen intraoral se evidenció en borde antero-lateral izquierdo de la mucosa lingual, masa de color blanquecino opaco, papular, de forma ovalada, con bordes ligeramente circunscritos, con un tamaño de 38 x 25 mm. Sobre esta mucosa descrita se apreciaron focos reticulados grisáceos. Se realizó biopsia incisional en la zona central de la lesión. Hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos se observan en las *figuras 1A-D*.

Caso 2: paciente masculino de 62 años de edad quien consultó por una lesión en lengua de dos meses y medio de evolución. Sin registro de antecedentes tabáquicos, con reporte de consumo habitual de alcohol. Como antecedente patológico reportó hipertensión arterial. El examen intraoral reveló lesión papular color blanquecino opaco, homogéneamente aplanada, forma irregular, de aspecto leucoplásico, bordes circunscritos, de 29 x 14 mm de diámetro, en borde lateral derecho lingual. Descripción quirúrgica reporta biopsia incisional de 5 mm^3. Hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos se observan en las *figuras 2A-D*.

Caso 3: paciente masculino de 31 años de edad que consultó por una lesión en lengua de ocho meses de evolución. Sin antecedentes tabáquicos, consumo de alcohol o enfermedad sistémica reportados en

www.medigraphic.org.mx

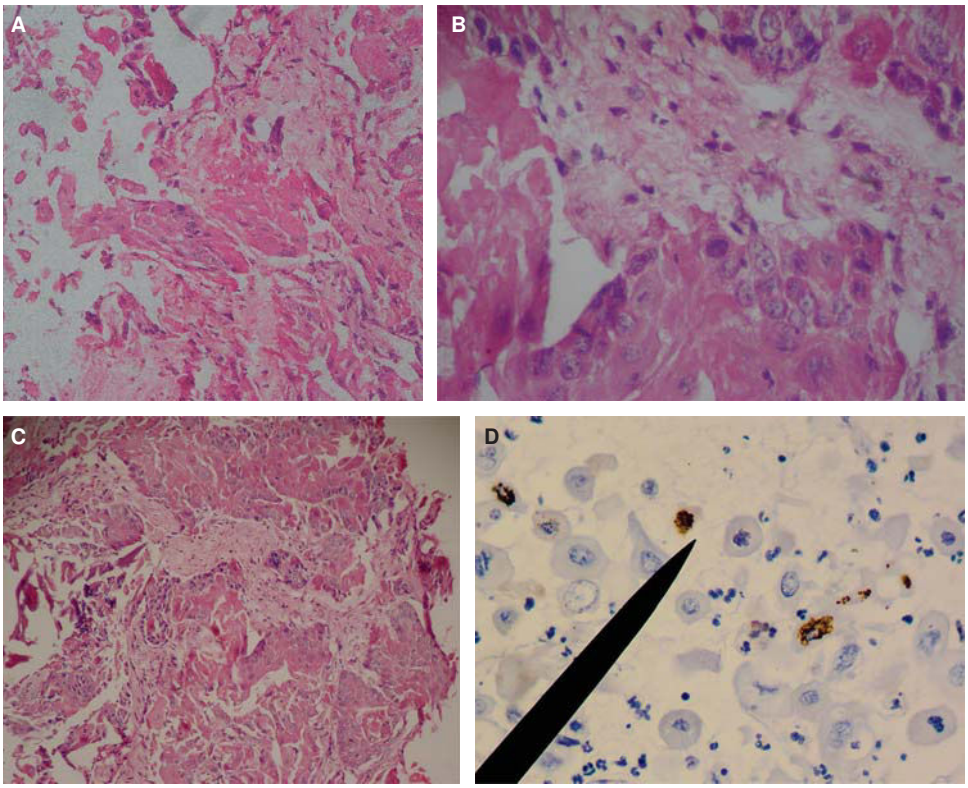

Figura 1.

Fotos histológicas COCE con H&E. **A)** Objetivo de 10x, se aprecia displasia epitelial con anaplasia conectiva. **B)** Objetivo de 40x, se evidencia queratinocitos con núcleos poiquilocarióticos, eucromáticos, de predominio megacariótico; se observa forma mitótica telofásica. **C)** Objetivo de 40x se observa tejido conjuntivo conspicuo con infiltrado de células epiteliales, megacarióticas, eucromáticas, poiquilocarióticas. **D)** Objetivo de 40x el señalador muestra inmunohistoquímica positiva leve para Ki-67 en queratinocitos infiltrados en lámina propia, y negativo para ciclina D1.

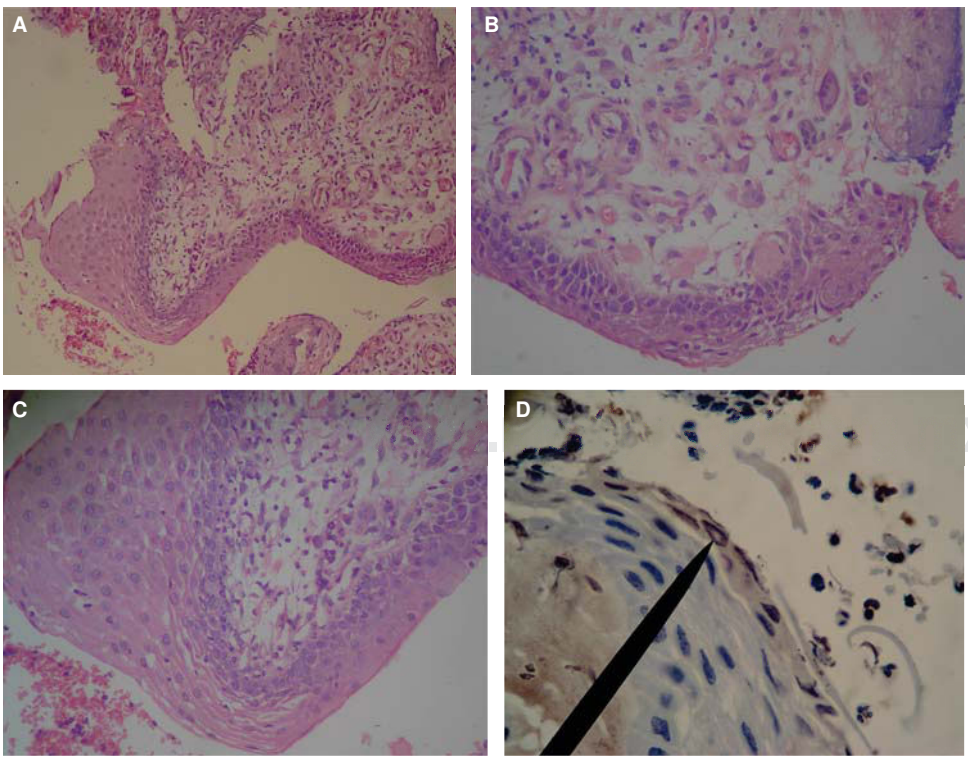

Figura 2.

Fotos histológicas COCE con H&E. **A)** Objetivo de 10x se aprecia epitelio lingual plano estratificado no queratinizado con foco hiperplásico a expensas del estrato espinoso alternado con foco tisular altamente displásico. **B)** Objetivo de 40x se observan en lámina propia, abundantes núcleos basófilos de predominio redondeado y ovalado, megacarióticos y eucromáticos, alternados con espacios revestidos por células de aspecto epiteloide compatible con vasos sanguíneos. **C)** Objetivo de 40x se aprecia lámina propia infiltrada con formas nucleares polisegmentadas, heterocromáticos, compatibles con polimorfonucleares sobre trama de fibras delgadas eosinófilas compatibles con fibras reticulares. **D)** Objetivo de 40x el señalador muestra inmunohistoquímica positiva leve para ciclina D1 en queratinocitos del estrato espinoso y negativo para Ki-67.

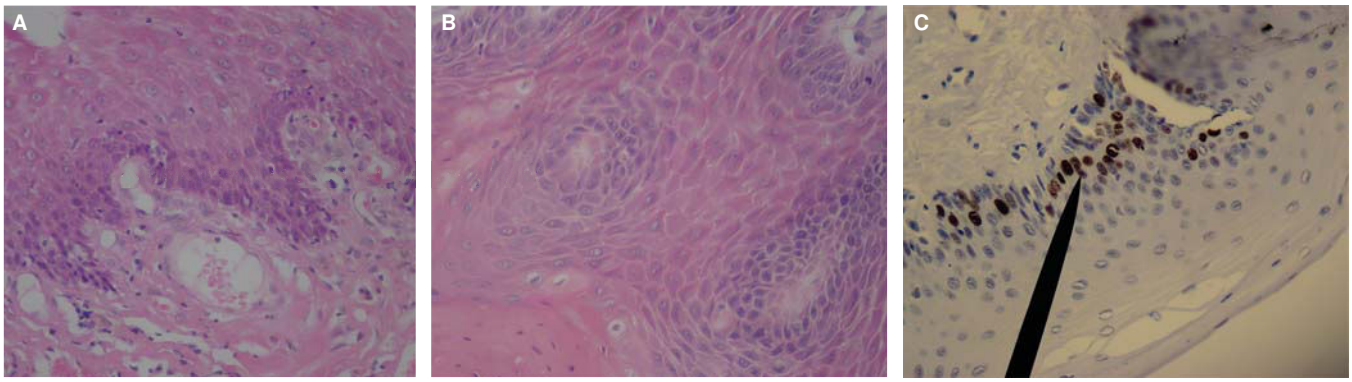

Figura 3. Fotos histológicas COCE con H&E. **A)** Objetivo de 10x se observa epitelio hiperplásico infiltrado hacia la lámina propia, engrosado. **B)** Objetivo de 40x se aprecia estrato escamoso de epitelio lingual con foco displásico, en el cual se observan queratinocitos entre mega y microcarióticos, con cromatina de predominio. **C)** Objetivo de 40x el señalador muestra inmunohistoquímica positiva moderada para Ki-67 en queratinocitos del estrato basal y espinoso, negativo para ciclina D1.

historia clínica. Al examen clínico de cabeza y cuello, ligero aumento ganglionar submaxilar simétrico y bilateral, sin algidez; en la cavidad oral se reporta gingivitis generalizada y sobre borde antero lateral derecho de mucosa lingual en relación con cúspide mesiolingual fracturada de primer molar inferior, masa de color blanquecino, sin elevación, circunscrita al trayecto del molar fracturado, de un tamaño aproximado de 11 x 7 mm. Historia clínica reporta antecedente de biopsia incisional de zona central de la lesión. Hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos se observan en las *figuras 3A-C*.

DISCUSIÓN

Desde el punto de vista morfológico macroscópico el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), clasificó los carcinomas epiteliales en tipo I, II, III y IV, considerando como criterio el tamaño de la neoplasia, siendo los COCE tipo I y II aquellos menores de 4 cm y tipo III y IV mayores a 4 cm,[23] y desde el punto de vista histológico, es aceptado que los carcinomas se clasifiquen según grados de diferenciación celular en bien diferenciado, moderadamente diferenciado e indiferenciado.[24]

Con los criterios expuestos de COCE, los casos clínicos se clasificarían como: caso clínico 1, tipo II - moderadamente diferenciado, por tamaño de 38 x 25 mm e histología anaplásica con reconocimiento de queratinocitos *(Figuras 1A-C)*; para casos clínicos 2 y 3, tipo I - bien diferenciado, por tamaños de 29 x 14 mm y 11 x 7 mm respectivamente, e histológicamente reconociendo los epitelios planos estratificados no queratinizados *(Figuras 2A-C)*; sin embargo, al hacer demostraciones de inmunohistoquímica de Ki-67, en las histologías de los casos clínicos, se halló mayor expresión para el caso clínico 3 que mostró menor displasia *(Figura 3C)* y una menor expresión en el caso clínico 1 que mostró mayor displasia *(Figura 1D)*, aspecto contradictorio dado que la literatura reporta directa relación entre expresión de células en fase «S» y displasia.[18] Considerando sólo el inmunomarcaje reseñado, se puede replantear el diagnóstico de COCE por el de carcinoma basocelular oral, que demuestra expresión de Ki-67 limitada a queratinocitos basales y espinosos *(Figura 3C)*, concordando con estudios inmunohistoquímicos de expresión de Ki-67 en carcinomas basocelulares.[19]

Con respecto a la inmunohistoquímica con ciclina D1, la única expresión fue demostrada de manera leve limitada a los queratinocitos del estrato escamoso en el caso clínico 2 *(Figura 2D)*, un caso clasificado como tipo I por tamaño y bien diferenciado por histología; sin embargo, la literatura es consistente en demostrar que el valor biológico del marcador ciclina D1 en COCE indica mayor agresividad con peor pronóstico y recurrencia.[25] Para el caso clínico 2, no se evidenció compromiso ganglionar pero sí se admite consumo habitual de alcohol, un factor de riesgo que no establece correlación directa con ciclina D1, pero contribuye a un mal pronóstico con un posible desenlace metastásico.

www.medigraphic.org.mx

CONCLUSIONES

Consideramos que la búsqueda de marcadores como Ki-67 y ciclina D1 en diagnósticos de COCE preestablecidos, pueden influenciar y optimizar los resultados histológicos finales y en este sentido se sugiere deben ser considerados como parte de las he-

rramientas para perfeccionar el diagnóstico final así como los posibles tratamientos que se le reportan al paciente.

REFERENCIAS

1. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics, head and neck tumours*. Lyon: IARC Press; 2005. pp. 164-176.
2. Zini A. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39 (4): 299-305.
3. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. *Cancer incidence in five continents*. Vol. VIII. Lyon: IARC Press; 2003.
4. Tabaquismo. III Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB y V Estudio Nacional de Factores de Riesgo de Enfermedades Crónicas. ENFREC II. República de Colombia. Bogotá: Ministerio de Salud; 1999.
5. Rodríguez E, Ronderos M. *El hábito de fumar en Colombia 1977-1980*. Bogotá: Organización Panamericana de la Salud, Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Instituto Nacional de Cancerología; 1988.
6. Álvarez ME, Barbosa CHM, Gaviria NAM. Comportamiento clínico-epidemiológico del carcinoma escamocelular bucal de pacientes tratados en el Hospital Universitario San Vicente de Paúl (HUSVP) Medellín entre enero de 1990 y diciembre de 1996. *Rev Fac Odont Univ Ant*. 2005; 16 (1 y 2): 26-32.
7. Restrepo D, Correa C, Martínez C, Gómez G, Molina H. Frecuencia del consumo de bebidas alcohólicas entre los pacientes con cáncer bucal de la Unidad de Cirugía Maxilofacial y Estomatología del H.U.S.V.P., Medellín, entre enero de 1996 y junio de 2001. *Rev Fac Odont Univ Ant*. 2001; 13 (1): 58-64.
8. Mashberg A, Samit A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA Cancer J Clin.* 1995; 45: 328-351.
9. Agra IM. Biological markers and prognosis in recurrent oral cancer after salvage surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 134 (7): 743-749.
10. de Jong EP, Xie H, Onsongo G, Stone MD, Chen XB, Kooren JA et al. Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. *PLoS One.* 2010; 5 (6): e11148.
11. Chang YC. Invasive pattern grading score designed as an independent prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2010; 57 (2): 295-303.
12. Odell EW, Jani P, Sherriff M, Ahluwalia SM, Hibbert J, Levison DA et al. The prognostic value of individual histologic grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. The importance of the pattern of invasion. *Cancer*. 1994; 74: 789-794.
13. Weijers M. Malignancy grading is no better than conventional histopathological grading in small squamous cell carcinoma of tongue and floor of mouth: retrospective study in 128 patients. *J Oral Pathol Med*. 2009; 38 (4): 343-347.
14. Goerkem M, Braun J, Stoeckli SJ. Evaluation of clinical and histomorphological parameters as potential predictors of occult metastases in sentinel lymph nodes of early squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17 (2): 527-535.
15. Seki S. Prediction of outcome of patients with oral squamous cell carcinoma using vascular invasion and the strongly positive expression of vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol*. 2011; 47 (7): 588-593.
16. Shah NG. Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis. *Head Neck*. 2009; 31 (12): 1544-1556.
17. Chimenos E, Font I, López J. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004; 9: 377-384.
18. Wangsa D, Ryott M, Avall-Lundqvist E, Petersson F, Elmberger G, Luo J et al. Ki-67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma. *Br J Cancer*. 2008; 99 (7): 1121-1128.
19. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Ueda Y, Misawa K, Harada H et al. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2000; 36 (2): 194-198.
20. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003; 36 (3): 131-149.
21. Montebugnoli L, Badiali G, Marchetti C, Cervellati F, Farnedi A, Foschini MP. Prognostic value of Ki67 from clinically and histologically normal distant mucosa in patients surgically treated for oral squamous cell carcinoma: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 38 (11): 1165-1172.
22. Chi AC. *Epithelial pathology.* In: Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE (Eds.). Oral and maxillofacial pathology. 3rd ed. St. Louis: Saunders, Elsevier; 2009. pp. 362-452.
23. Kantola S, Jokinen K, Hyrynkangas K, Mäntyselkä P, Alho OP. Detection of tongue cancer in primary care. *Br J Gen Pract*. 2001; 51 (463): 106-111.
24. Saiz-Bustillo R, Corchero MG, García-Montesinos PB, González TT, Sánchez SS. Carcinoma oral de células escamosas: parámetros citométricos de interés pronóstico. *Med Oral patol Oral Cir Bucal*. 2005; 10 (5): 462-467.
25. Huang SF, Cheng SD, Chuang WY, Chen IH, Liao CT, Wang HM et al. Cyclin D1 overexpression and poor clinical outcomes in Taiwanese oral cavity squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2012; 10: 40.

Dirección para correspondencia:
Rebeca Rodríguez Farías
E-mail: rebe26@gmail.com

www.medigraphic.org.mx