

Marcadores histoquímicos de cancerización de campo en la mucosa bucal

M. A. PÉREZ*, M. E. ITOIZ

Cátedra de Anatomía Patológica,
Facultad de Odontología
de la Universidad de Buenos Aires

resumen

El término “cancerización de campo” en la cavidad bucal, se utiliza para definir a una mucosa en la que existen cambios subclínicos de malignidad debido a los cuales posee un riesgo aumentado de que se produzcan en ella tumores malignos en forma uni o multifocal.

Se han postulado métodos diversos para la detección temprana de la cancerización de campo, entre los cuales, los de mayor utilidad potencial son aquellos que puedan aplicarse al material de biopsias para estudio histopatológico de rutina.

En este trabajo se analiza la eficacia de tres biomarcadores histoquímicos de malignidad para detectar cancerización de campo en un modelo experimental de cáncer bucal: morfometría de regiones organizadas de nucleolo (NORs), análisis de la ploidia, y marcación inmunohistoquímica del factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2). Los tres detectaron variaciones en epitelios cancerizados antes de que se manifesten alteraciones histológicas. Dado que presentan diferencias en cuanto a su facilidad de aplicación y diferente sensibilidad para la detección de malignidad, el uso conjunto de éstos o más marcadores podría aumentar la certeza en la detección del potencial de malignidad.

PALABRAS CLAVE: Mucosa bucal, Cancerización, Cáncer bucal, Marcadores histoquímicos, Premalignidad.

abstract

In the oral cavity, the term “field cancerization” serves to define a mucosa with subclinical evidence of malignant transformation that is at a greater risk of developing unifocal or multifocal malignant tumors.

Several methods have been proposed to perform an early diagnosis of field cancerized areas. Among these methods, the most useful are those that can be applied to routine biopsy material.

The present study evaluates the efficacy of three histochemical biomarkers of malignant transformation in the

detection of field cancerization in an experimental model of oral cancer: morphometry of nucleolar organizer regions (NORs), ploidy analysis, and immunohistochemical labeling of the fibroblastic growth factor-2 (FGF-2). All three histochemical markers were capable of detecting alterations in cancerized epithelia before histological alterations became evident. Because these methods differ in complexity and sensitivity, the joint use of all three markers would contribute to the certainty of a diagnosis of potential malignant transformation.

KEY WORDS: Oral mucosa, Cancerization, Oral cancer, Histochemical markers, Premalignancy.

INTRODUCCIÓN

Los dos tumores malignos más frecuentes de la boca humana, el carcinoma de células escamosas y el carcinoma verrugoso, pueden darse en forma multifocal. Posteriormente al tratamiento de una lesión, con alguna frecuencia se observa ocurrencia de segundos tumores primarios en otra localización. Otro hecho frecuente es la aparición de lesiones premalignas multifocales o en áreas muy extensas de la mucosa. Estas observaciones llevaron a Slaughter y col. (1953)¹ a proponer, en un ya clásico trabajo, la hipótesis de “cancerización de campo” para definir a una mucosa con riesgo aumentado de malignización como consecuencia de la exposición repetida, en áreas extensas, a la acción de cancerígenos, como el tabaco o el alcohol. La hipótesis de Slaughter fue posteriormente apoyada por trabajos que le dieron soporte molecular al demostrar alteraciones genéticas en amplias regiones de la mucosa de fumadores^{2,3}.

En este contexto, los biomarcadores de malignidad tienen una gran importancia potencial en el diagnóstico precoz, en la evaluación de márgenes de seguridad quirúrgicos, y en la estimación del riesgo de recurrencia.

Se llaman biomarcadores de malignidad a las reacciones que detectan sustancias o estructuras cuya sola presencia o, si ya existieran en condiciones normales, sus



Figura 1. Bolsa de la mejilla de hámster evertida para su observación.

variaciones significativas sean indicadoras de actividad maligna o de grados de malignidad cuando las neoplasias ya están instaladas. La mayor parte de los marcadores de malignidad conocidos son reacciones bioquímicas. En número menor existen marcadores histoquímicos que son reacciones que asocian *in situ* cambios bioquímicos con las estructuras celulares que los manifiestan, ya que se efectúan sobre cortes histológicos.

En este trabajo comparamos tres marcadores histoquímicos de malignidad aplicados a la detección de la cancerización de campo, utilizando el modelo de cancerización química de la bolsa de la mejilla del hámster (CBMH). Este modelo es universalmente utilizado para estudios de cáncer bucal. Aprovecha la existencia de una particularidad anatómica del hámster: un bolsillo situado en el espesor de la mejilla, cubierto por una mucosa igual a la mucosa bucal. Esta estructura, que los hámsters utilizan fisiológicamente para el transporte de alimentos secos, se puede cancerizar mediante la aplicación tópica de cancerígenos químicos que actúan sobre toda la superficie de la mucosa. Con gran reproducibilidad se producen en el modelo lesiones premalignas y malignas muy similares a las de la boca humana. La bolsa se puede evertir fácilmente para el segui-

miento clínico de las lesiones (Figura 1). Aún después de tiempos largos de cancerización cuando se manifiestan los carcinomas, coexisten áreas de epitelio histológicamente normal, tal como sucede en la boca humana (Figura 2). Estas áreas “normales”, pero seguramente cancerizadas, han sido denominadas NUMF, por sus siglas en inglés (no unusual microscopic features) y constituyen un modelo muy adecuado para estudios de efectividad de marcadores de cancerización de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se comparan los datos obtenidos en áreas NUMF en trabajos previos realizados en el Laboratorio de Histoquímica de la Cátedra de Anatomía Patológica (FOUBA), en cada uno de los cuales se estudió la expresión de un marcador en las diferentes lesiones del modelo CBMH^{4,5,6}. En los tres trabajos se utilizó el mismo protocolo experimental^{7,8}. La cancerización se produce por la aplicación tópica de una solución al 0,5% de 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) en la bolsa derecha del hámster, tres veces por semana. Para este análisis comparativo se consideran las bolsas tratadas durante 16 semanas, tiempo en el cual aparecen los carcinomas. Se utilizaron como control animales tratados sólo con aceite mineral, el vehículo del cancerígeno. Luego del sacrificio se fijaron fragmentos de las bolsas en formol o en acetona y se incluyeron en parafina de acuerdo con el procesamiento de rutina para estudio histopatológico. Los valores analizados corresponden a 8 a 10 animales tratados y 10 a 12 animales control.

Técnicas histoquímicas

Regiones organizadoras de nucleolo

Se denominan NOR por sus siglas en inglés. Son zonas de ADN que codifican para ARN ribosomal necesario para síntesis proteica. Cuando están transcripcionalmente activas se asocian a proteínas argirofílicas por lo cual pueden teñirse en preparaciones de rutina con una técnica de impregnación argéntica⁹. Se observan en

las preparaciones como estructuras intranucleares de color marrón oscuro, denominadas AgNOR. Su número, tamaño y forma dependen de la intensidad de la actividad de síntesis proteica celular. Las variaciones de estos parámetros con respecto de los de las células normales han sido reiteradamente reportados en la literatura para evaluación de malignidad^{10,11}.

En este trabajo utilizamos un programa de computación

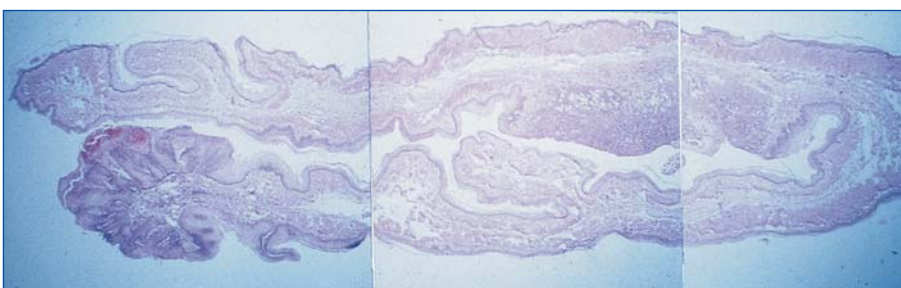


Figura 2. Corte histológico de bolsa cancerizada durante 16 semanas. Al evertir la bolsa ambas paredes quedan unidas por la adventicia, con el epitelio hacia fuera. Una pieza correspondiente a un corte transversal completo fue doblada sobre sí misma para facilitar la preparación. Se observan en el epitelio: A) un carcinoma exofítico; B) un carcinoma endofítico; C) áreas de lesiones displásicas premalignas, y D) áreas sin alteraciones microscópicas (NUMF).

para análisis de imágenes disponible en el Laboratorio de Microespectrofotometría del CONICET, instalado en la Comisión Nacional de Energía Atómica (LANAIS-MEF), para evaluar los siguientes parámetros en preparaciones de bolsas normales y cancerizadas: número de AgNORs por núcleo (nNOR); volumen individual promedio de los AgNORs (VNOR); volumen total de sustancia AgNOR por núcleo (TVNOR); e indicador de forma o índice de contorno de los AgNOR (CINOR).

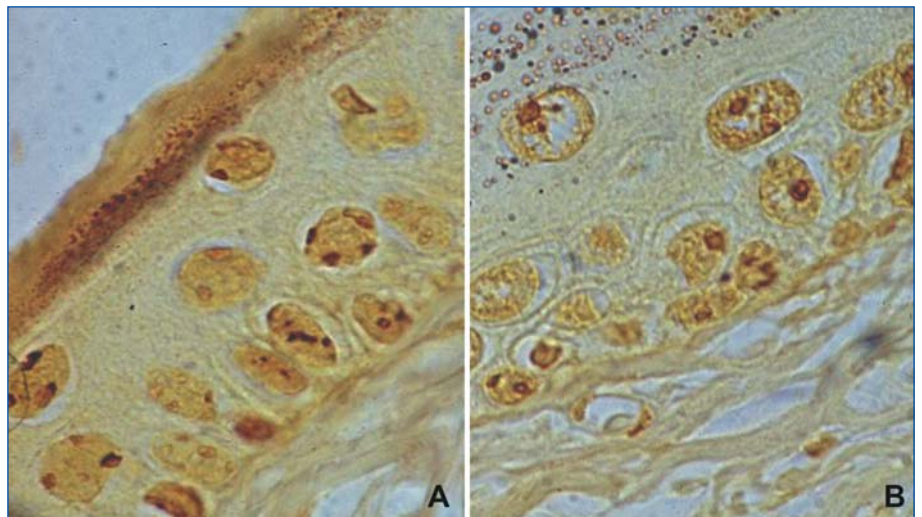


Figura 3. Tinción de AgNORs en: A) epitelio de bolsa control y B) epitelio NUMF en bolsa cancerizada durante 16 semanas, donde se observan AgNORs de mayor tamaño.

Análisis de la ploidía

Se tiñeron cortes de bolsas normales y cancerizadas con la reacción de Feulgen¹² que es estequiométrica para demostración de ADN. La cantidad de coloración de cada núcleo se midió en el software DNA-IBAS en el LANAIS-MEF arriba mencionado. Se tomó el valor de linfocitos contenidos en los mismos cortes como control de valor diploide (2c). El programa proporciona, además de los clásicos histogramas de ploidía utilizados en el diagnóstico y pronóstico de tumores¹³, distintos índices numéricos de malignidad. En este trabajo consideramos como más significativos: el índice de ploidía, que es la relación entre el valor promedio de los núcleos medidos y el valor control de los linfocitos, y el índice de aneuploidía, o 5cER (5c Exceeding Rate), que es el porcentaje de núcleos con valores de ADN mayores a 5c.

Expresión de factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2)

En la mucosa bucal el factor de crecimiento fibroblástico interviene en la transmisión de señales entre el epitelio y el conectivo para producir crecimiento epidérmico, angiogénesis, y producción de colágeno. Se expresa en forma aberrante en la tumorigénesis. En este trabajo se utilizó una técnica inmunohistoquímica para demostración de FGF-2 en muestras de bolsas fijadas en acetona, utilizando como anticuerpo primario un monoclonal anti-FGF-2 humano (Santa Cruz Biotechnology).

RESULTADOS

La observación microscópica de los epitelios NUMF de las bolsas cancerizadas reveló en general AgNORs de mayor tamaño y de forma algo más irregular al compararlos con los controles (Figura 3). El análisis de imágenes corroboró estas observaciones. El Cuadro 1 mues-

CUADRO 1. Evaluación morfométrica de regiones organizadoras de nucleolo en epitelio de bolsas de mejilla de hámster sin alteraciones histológicas, no tratadas (CONTROL) y tratadas con cancerígeno (NUMF).

| Parámetro | Control | NUMF |
|-----------|-------------|--------------|
| nNOR | 2.26 ± 0.46 | 1.91 ± 0.39 |
| VNOR | 2.04 ± 0.57 | *3.86 ± 1.11 |
| TVNOR | 4.43 ± 0.84 | *7.15 ± 1.48 |
| CINOR | 3.96 ± 0.05 | *4.11 ± 0.08 |

nNOR: número de NOR por núcleo; VNOR: volumen individual de NOR; TVNOR: volumen total de AgNOR por núcleo; CINOR: índice de irregularidad de forma. *ANOVA: p<0.007.

tra los valores obtenidos. No se obtuvieron diferencias significativas en el número de NORs por núcleo, pero los otros tres parámetros estudiados resultaron significativamente diferentes.

El análisis de la ploidía reveló en las áreas NUMF una mayor cantidad de células en la región de los histogramas entre 2c y 4c al compararlos con los histogramas del control. Esto indica una mayor actividad proliferativa.

CUADRO 2. Índices de malignidad derivados del análisis de ploidía en epitelio de bolsas de mejilla de hámster sin alteraciones histológicas, no tratadas (CONTROL) y tratadas con cancerígeno (NUMF).

| Índices ADN | Control | NUMF |
|-------------|-------------|--------------|
| Ploidía | 2.22 ± 0.10 | *2.69 ± 0.08 |
| 5cER | 0.33 ± 0.5 | *5.70 ± 1.02 |

Ploidía: relación entre núcleos epiteliales y núcleos de linfocitos tomados como control de valor 2c; 5cER: porcentaje de núcleos con valores mayores a 2c. *ANOVA: p<0.001.

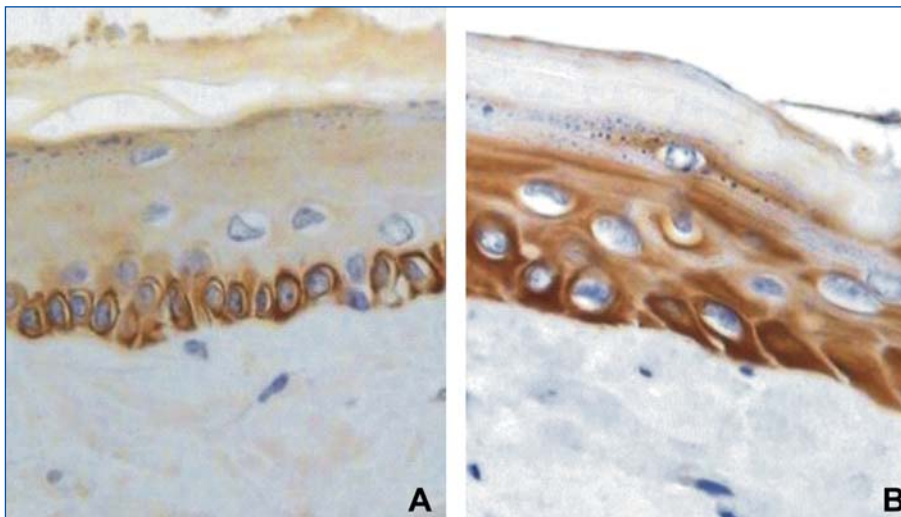


Figura 4. Expresión de FGF-2 en A) epitelio de bolsa normal con marcación en la capa basal y B) epitelio NUMF en bolsa cancerizada, donde se observan además células marcadas en los estratos suprabasales.

Los dos índices analizados mostraron valores significativamente diferentes entre áreas NUMF y control (Cuadro 2). El dato más relevante se obtuvo con el índice 5cER. El valor de 0,33% está dentro del error metodológico, pero el valor de 5,70% indica que muchas áreas NUMF tienen un número considerable de células con contenido aneuploide de ADN.

El FGF-2 se expresa en las bolsas de hámsters normales o tratadas sólo con el vehículo, en el citoplasma de las células basales. En las bolsas cancerizadas, las regiones NUMF muestran un patrón marcadamente alterado en el cual, además de las células basales, las células suprabasales aisladas o en grupos expresan el factor (Figura 4). Se efectuó un conteo por análisis de imágenes de las células suprabasales reactivas realizado en 8 casos cancerizados, en los cuales se midieron áreas al azar correspondientes a 1.500 a 2.000 μm lineales de superficie de epitelios NUMF de cada caso. El valor resultante expresado como relación de células suprabasales marcadas sobre el total de células fue de $0,15 \pm 0,08$. En ningún caso control se encontraron células suprabasales marcadas.

DISCUSIÓN

Los tres marcadores analizados han resultado, en el modelo utilizado, ser eficaces en la detección de cancerización de campo, antes de la aparición de cambios morfológicos. Los tres pueden ser aplicados a material de biopsias humanas tomado para estudio histopatológico.

Existe abundante literatura sobre la utilidad de la marcación de AgNORs en el diagnóstico y seguimiento de entidades neoplásicas^{10,11,14}. En nuestro laboratorio demostramos también que pueden detectarse con este

método variaciones atribuibles a la cancerización de campo, tomando como modelo el epitelio no invasor, cercano a carcinomas bucales humanos¹⁵. No obstante, debe tenerse en cuenta que las variaciones de AgNOR no son indicadores directos de transformación maligna sino que revelan cambios en la actividad de síntesis proteica que si bien son una de las características importantes de las células malignas, también tienen lugar en otras situaciones normales o patológicas. Dentro de este contexto es que deben considerarse a las AgNORs como marcadoras de riesgo aumentado de malignidad.

Su demostración se realiza con una técnica sencilla que puede implementarse entre las técnicas de rutina de los laboratorios de Patología Quirúrgica pero para su evaluación subjetiva se requiere un importante entrenamiento en las imágenes normales, por lo que resulta de mucho mayor seguridad, la evaluación objetiva con un programa de análisis de imágenes.

El análisis de la ploidía en cortes histológicos requiere siempre la medición del ADN de cada núcleo revelado por una reacción cuidadosamente estandarizada y evaluado con citofotómetro o analizador de imágenes. Es algo más difícil de implementar en los laboratorios de rutina pero se brinda como servicio en laboratorios especializados. Es un método de reconocida aplicación al diagnóstico y pronóstico de neoplasias malignas¹³, pero hasta el momento no se había reportado su aplicación a la detección de cancerización de campo en la mucosa bucal. De las tres técnicas analizadas en el presente trabajo es, sin duda, la de mayor objetividad. Valores del índice 5cER mayores al producido por factores metodológicos, indican inequívocamente la presencia de aneuploidías, dado que ninguna célula epitelial normal excede el valor diploide (2c) en reposo, o 4c (tetraploide) en la división celular normal. La presencia de células aneuploides no significa necesariamente la progresión a neoplasia clínica, pero sí indica seguramente un riesgo aumentado de malignización.

El análisis de la expresión del FGF-2 puede ser aplicado a biopsias de rutina pero requiere una toma adicional, dado que deben ser fijadas en acetona en lugar de la fijación formólica convencional. Su detección es relativamente sencilla y las alteraciones en los campos cancerizados en nuestro modelo fueron muy objetivas dado que se evidencian por la sola presencia de células marcadas en los estratos suprabasales. No obstante, la

utilidad de este marcador debe ser más evaluada, dado que no se conoce su aplicación al estudio de neoplasias bucales ni se han reportado estudios relativos a variaciones semejantes a las encontradas en nuestro modelo que hubieren sido producidas por otras lesiones no neoplásicas.

Dado que todos los marcadores de malignización estudiados hasta el momento en la mucosa bucal presentan grados de certeza muy variables en función del tipo de lesión y de su localización, la utilización de una batería de marcadores podría aumentar la exactitud del diagnóstico y pronóstico. Así por ejemplo, si se comprobara la transferencia a la clínica de los datos experimentales arriba mencionados, la detección precoz de un campo cancerizado en la mucosa bucal, sin manifestaciones clínicas, podría basarse en la conjunción de un epitelio con ploidía alterada, aumentos del volumen y cambios de forma de las AgNORs y expresión aumentada de FGF-2.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multimeric origin. *Cancer* 6: 968, 1953.
- 2) Chung KY, Mukhopadhyay T, Kim J, Casson A, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, Roth JA: Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Res* 53: 1676-1683, 1993.
- 3) Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D: Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 332: 712-717, 1995.
- 4) Schwint AE, Folco A, Morales A, Cabrini RL, Itoiz ME: AgNOR mark epithelial foci undergoing malignant transformation in hamster cheek pouch carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 25: 20-24, 1996.
- 5) Raimondi AR, Cabrini RL, Itoiz ME: Ploidy analysis of field cancerization and cancer development in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. *J Oral Pathol Med*, 2004 (en prensa).
- 6) Raimondi AR, Molinolo AA, Itoiz ME: *Role of fibroblast growth factor-2 in the epithelium-connective tissue interactions during experimental oral carcinogenesis* (enviado a publicación).
- 7) Salley JJ: Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. *J Dent Res* 33: 253-262, 1954.
- 8) Morris AL: Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *J Dent Res* 40: 3-15, 1961.
- 9) Howat AJ, Giri DD, Cotton DWK, Slater DN: Nucleolar organizer regions in Spitz nevi and malignant melanomas. *Cancer* 63: 474-478, 1989.
- 10) Derenzini M, Ploton D: Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol* 32: 149-192, 1991.
- 11) Shiro T, Seki T, Naitoh Y, Inoue K, Okamura A: A correlation of argyrophilic nucleolar organizer regions with stages of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 71: 44-49, 1993.
- 12) Feulgen RY, Rossenbeck H: "Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thimonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in Mikroskopischen Präparaten". *Ztschr F Physiol Chem* 135: 203-248, 1924.
- 13) Abou-Rebyeh H, Borgmann V, Nagel R, Al Abadi H: DNA ploidy is a valuable predictor for prognosis of patients with resected renal cell carcinoma. *Cancer* 92: 2280-2285, 2001.
- 14) Öfner D, Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M, Giménez-Mas J, Hufnagl P, Ploton D, Trere D, Rüschoff J: Guidelines for AgNOR quantification. *Committee on AgNOR Quantification within ESP. Virchows Arch* 427: 341, 1995.
- 15) Schwint A, Lanfranchi H, Cabrini R, Savino T, Marschoff E, Itoiz M. Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma of oral mucosa. *Cancer* 73: 2674-2679, 1994.