

María Elena Samar Romani, Rodolfo Esteban Ávila Uliarte, Ismael Bernardo Fonseca Acosta, Pedro Emilio García Esst, María Araceli Gomez Rosso . Expresión inmunohistoquímica de Ki67 y CD34 como marcadores de proliferación y angiogénesis en el carcinoma mucoepidermoide de glándulas salivales humanas. Morfovirtual 2022. VI Congreso virtual de Ciencias Morfológicas. Sexta Jornada Científica de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal. La Habana. Cuba. Noviembre 2022-enero 2023.

## **Expresión inmunohistoquímica de Ki67 y CD34 como marcadores de proliferación y angiogénesis en el carcinoma mucoepidermoide de glándulas salivales humanas**

**María Elena Samar Romani<sup>1</sup>, Rodolfo Esteban Ávila Uliarte<sup>2</sup>, Ismael Bernardo Fonseca Acosta<sup>3</sup>, Pedro Emilio García Esst<sup>4</sup>, María Araceli Gomez Rosso<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Doctora en Medicina y Cirugía. Departamento de Biología Bucal. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. <sup>2</sup>Doctor en Medicina y Cirugía. Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. <sup>3</sup>Doctor en Medicina y Cirugía. Cátedra de Patología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. <sup>4</sup>Doctor en Medicina y Cirugía. Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. <sup>5</sup>Odontóloga. Departamento de Biología Bucal. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. República Argentina. samarcongresomail.com

### **RESUMEN**

**Introducción:** Las neoplasias de las glándulas salivales son tumores raros y con diferente potencial maligno; corresponden a menos del 2% de todas las neoplasias humanas y el 3 a 4% de los tumores de cabeza y cuello. Su diagnóstico se enriquece con la inmunohistoquímica.

**Objetivo:** Basándonos en este antecedente investigamos la asociación entre los marcadores Ki67 (proliferación) y CD34 (angiogénesis) y el grado histológico del carcinoma mucoepidermoide (CME).

**Materiales y Métodos:** Este estudio inmunohistoquímico se realizó en casos de 10 pacientes seleccionados de una base de datos de tumores salivales de nuestro equipo de trabajo correspondiente al período 1995-2022.

**Resultados y discusión:** Los tumores se clasificaron como de baja y alta proliferación con un índice de marcación de Ki67 de  $\leq 15\%$  y  $> 30\%$ , respectivamente. La marcación de CD34 se calificó como positiva ( $>$ de 5 vasos sanguíneos marcados en el campo de visión) o negativa ( $<$ de 5 vasos sanguíneos

marcados en el campo de visión) en tumores de alto y bajo grado, respectivamente.

**Conclusiones:** Consideramos que la expresión cuantitativa del índice proliferativo tumoral se asocia con su grado histológico de malignidad y el diferente grado de marcación de CD-34 en el CME salival, factores vinculados a su pronóstico.

## INTRODUCCIÓN

Las neoplasias de las glándulas salivales son lesiones importantes de la patología oral y maxilofacial. Son tumores raros y con diferente potencial maligno; corresponden a menos del 2% de todas las neoplasias humanas y el 3 a 4% de todos los tumores de cabeza y cuello (1-2). El 90% de los tumores salivales primarios se origina del parénquima glandular y el resto corresponde a tumores no epiteliales (hemangionas, linfangiomas), etc.

La Organización Mundial de la Salud clasifica a los tumores salivales primarios en 39 subtipos histológicos benignos y malignos (3), con diferencias estructurales muy relevantes que conducen a grandes desafíos diagnósticos y de pronóstico.

El diagnóstico tumoral se enriquece con los aportes de la inmunohistoquímica, especialmente Ki67, que detecta un antígeno nuclear cuya expresión proporciona una medida directa de la fracción de multiplicación celular. (4-6).

Este anticuerpo reacciona con una estructura nuclear que sólo se encuentra en células normales y tumorales en proliferación. Las células quiescentes o en fase G0 no expresan este antígeno. Un alto índice de Ki67 se vincula con un peor pronóstico en las condiciones clínicas de los pacientes afectados con una neoplasia maligna (7).

Por otro lado, durante la embriogénesis se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los hemangioblastos, proceso denominando vasculogénesis. Después del nacimiento, este proceso es reemplazado por la angiogénesis, neovascularización derivada de vasos preexistentes, muy importante en una variedad de situaciones fisiológicas como el ciclo menstrual, el embarazo, la inflamación crónica y la reparación de heridas y estados patológicos como la progresión tumoral (8-9).

El crecimiento de un tumor, la invasión y las metástasis dependen de la angiogénesis, que puede ser evaluada y medida por la cantidad de vasos sanguíneos (densidad microvascular). La angiogénesis es una característica distintiva del cáncer (10-11). El método más común para evaluar la actividad de angiogénesis en un tumor es la estimación de la densidad microvascular (11).

CD34, CVD31, CD115 y VEGF se utilizan como marcadores para la evaluación de la angiogénesis (11).

CD34 es principalmente un marcador de células precursoras y progenitoras hematopoyéticas. Sin embargo, CD34 también es un marcador de varios tipos de células no hematopoyéticas, incluidos las células progenitoras endoteliales vasculares. Aunque aún se desconoce la exacta función de CD34 como antígeno

de superficie, se la relaciona con la inhibición o facilitación de la adhesión, la proliferación celular y la regulación de la diferenciación (12).

## **OBJETIVO**

Basándonos en estos antecedentes nos propusimos investigar la asociación entre Ki67 y CD34 y su correlación con el grado histológico en el carcinoma mucoepidermoide de bajo y alto grado de malignidad en glándulas salivales mayores y menores humanas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Este estudio se realizó en el carcinoma mucoepidermoide (ICD-O 8200/3) de glándulas salivales. Se emplearon tacos de parafina pertenecientes a tumores de 10 pacientes seleccionados de una base de datos de los protocolos de biopsias de Anatomía Patológica de nuestro equipo de trabajo, correspondiente al período 1995-2022; se utilizó un código numérico para identificar las muestras y preservar la identidad de los pacientes (Cuadro 1).

### **CUADRO 1. CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE. CASUÍSTICA (n=10)**

<b>LOCALIZACIÓN</b>	<b>GRADO HISTOLÓGICO DE MALIGNIDAD</b>
Parótida (50%)	Bajo grado (n=3). Alto grado (n=2)
Submandibular (10%)	Bajo grado (n=1)
Paladar (10%)	Alto grado (n=1)
Base de la lengua (20%)	Alto grado (n=2)
Paladar, nasofaringe y tonsila palatina (10%)	Alto grado (n=1)

El análisis histológico se realizó con H/E y Azul de toluidina a pH 3,8. Para la determinación de su grado de malignidad seguimos la gradación histológica según Ellis y Auclair (1):

<b>Parámetros</b>	<b>Puntaje</b>
*Componente intraquístico < 20%	+2
*Invasión neural	+2
*Necrosis	+3
*4 mitosis/10 campos a mayor aumento	+3
*Anaplasia	+4

<b>Grado</b>	<b>Score</b>
*Bajo	0-4
*Intermedio	5-6
*Alto	7

Estudio inmunohistoquímico: se utilizó el kit LSAB+ de DAKO en cortes histológicos de 4µm de espesor de las piezas quirúrgicas incluidas en parafina. La inmunomarcación nuclear con Ki67 se evaluó por el sistema de cálculo de conteo celular en campos de mayor aumento homogéneas en la población celular objeto de estudio y sin áreas de necrosis. Sobre cada campo se hizo el recuento del número total de células y las células marcadas. Se obtuvo un índice proliferativo aplicando la fórmula  $\frac{\text{células marcadas}}{\text{células totales}} \times 100$  (en porcentaje).

Los resultados se clasifican como de baja, intermedia y alta proliferación con un índice de marcación de Ki67 de  $\leq 15\%$ , 16-30% y  $> 30\%$ , respectivamente (13). La glicoproteína transmembrana CD34, antígeno marcador endotelial, se expresa en células precursoras hematopoyéticas y principalmente en el endotelio vascular. La marcación de CD34 se calificó como coloración positiva ( $>$ de 5 vasos sanguíneos marcados en el campo de visión a 400x) o negativa ( $<$ de 5 vasos sanguíneos marcados en el campo de visión a 400x) (14).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **-Características histológicas**

El carcinoma mucoepidermoide es un tumor maligno formado por proporciones variables de varios tipos celulares, mucocitos, células epidermoides, intermedias, columnares, claras y ocasionalmente oncocitos que presentó características morfológicas específicas, asociadas a su grado histológico. En los carcinomas de bajo grado de malignidad predominaron las formaciones quísticas revestidas por un epitelio mucosecretor. Algunas áreas sólidas con células

epidermoides, claras y mucosecretoras se disponían entre las estructuras quísticas predominantes (Figura 1 A y B).

Por el contrario, en las lesiones de alto grado se destacaban cordones sólidos con células epidermoides con atipia, áreas con células intermedias y escasas células secretoras de mucinas. Las mitosis eran frecuentes. En la Figura 2 A y B se puede observar un caso localizado en la base de la lengua.

**-Inmunohistoquímica (Figuras 3 y 4).**

<b>CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE</b>	<b>Ki67 (proliferación)</b>	<b>CD34 (angiogénesis)</b>
<b>Bajo grado de malignidad (n=4, 40%)</b>	<b>Baja proliferación ≤ 15%</b>	<b>Negativa: &lt;de 5 vasos sanguíneos marcados en el campo de visión (400x)</b>
<b>Alto grado de malignidad (n=6, 60%)</b>	<b>Alta proliferación &gt;30%</b>	<b>Positiva: &gt;de 5 vasos sanguíneos marcados en el campo de visión(400x)</b>

En la bibliografía se menciona que el carcinoma mucoepidermoide es el tumor de glándulas salivales maligno más común; corresponde al 10-15% de todos los tumores salivales y un 30% de los cánceres de estas glándulas, seguido por el carcinoma adenoide quístico (15).

La localización anatómica principal es la glándula parótida, seguida de paladar, submandibular y otras glándulas salivales menores (16-17).

Esta lesión maligna se caracteriza por su diferente agresividad y pronóstico, que depende de su grado tumoral (18). Como es bien conocido existen diferentes esquemas de gradación tumoral histológica para abordar su potencial clínico/patológico, diferenciándose lesiones de grado de malignidad bajo, intermedio y alto.

El grado histológico de diferenciación tumoral se determina mediante análisis microscópico y es un factor importante para la sobrevida y para el tratamiento, ya que demuestra su potencial biológico y la agresividad de la neoplasia. En el presente trabajo clasificamos los casos de carcinoma mucoepidermoide siguiendo los criterios de Ellis y Auclair et al (1) porque consideramos que los criterios de gradación de esta clasificación cuantitativa son más objetivos y disminuyen la subjetividad en comparación con los métodos cualitativos.

Un diagnóstico diferencial certero y una valoración segura de la patología tumoral en la práctica diaria genera dificultades en muchos casos si se emplea solamente la coloración de H/E. Una herramienta de referencia ante esta situación es la inmunohistoquímica, que permite orientarnos hacia un

diagnóstico definitivo y a una determinación pronóstica del curso clínico de la neoplasia. (19).

El anticuerpo Ki67 brinda la información sobre la multiplicación celular de un tumor, constituyéndose en un factor pronóstico de gran valor relacionado con la potencial agresividad de la lesión (20).

Como ha sido plenamente demostrado, la proliferación celular es un proceso primordial en la oncogénesis y Ki67 es el marcador básico para distinguir tumores benignos y malignos. Asimismo, su expresión posibilita además marcar diferencias en el pronóstico si se comparan tumores con varios grados de malignidad como el carcinoma mucoepidermoide (21). En estos casos el porcentaje de células positivas con Ki67 coincide con su grado histológico, lo que concuerda con el resultado obtenido en nuestro estudio.

Como ya se mencionó en la Introducción la angiogénesis tumoral se asocia con los tumores malignos en muchos órganos.

Tabatabaei et al, (22) realizaron un estudio de la densidad de la microvasculatura de 17 casos de carcinoma mucoepidermoide de glándulas salivales con CD34 y encontraron diferencias significativas entre el promedio de la densidad microvascular y el grado histológico del tumor, siendo significativamente superior en lesiones de grado intermedio y alto comparados con las de bajo grado, datos que coinciden con nuestros resultados.

Luukkaa et al (9) evaluaron la importancia pronóstica de los vasos CD34 positivos en el carcinoma adenoide quístico y el carcinoma mucoepidermoide de glándulas salivales demostrando una mayor intensidad de marcación en el carcinoma mucoepidermoide de alto grado de malignidad, lo que predice una peor sobrevida.

Sin embargo, Taher et al (23) estudiaron la expresión de CD34 y D2-40 como marcadores de la angiogénesis y linfoangiogénesis en el carcinoma mucoepidermoide y no encontraron correlación entre su grado o estadio tumoral.

Hussien et al (24) revelaron una intensa coloración citoplasmática positiva con los anticuerpos CD34 y D2-40 en todos los casos estudiados de carcinoma mucoepidermoide de alto grado.

Consideramos que la expresión cuantitativa del índice proliferativo tumoral estudiada con Ki67 se asocia con la localización y el diferente grado de marcación de CD-34 en el carcinoma mucoepidermoide salival, factores ambos vinculados al pronóstico tumoral.

## **CONCLUSIONES**

-En el carcinoma mucoepidermoide las marcaciones inmunohistoquímicas con KI67 y CD34 tuvieron correlación con las características morfológicas y el grado histológico del tumor.

-Se observó un mayor índice de proliferación en los tumores de alto grado de malignidad.

-La densidad vascular fue superior en el carcinoma mucoepidermoide de alto grado.

-A posteriori se medirá la densidad microvascular comparando los resultados en los tumores salivales benignos y malignos.

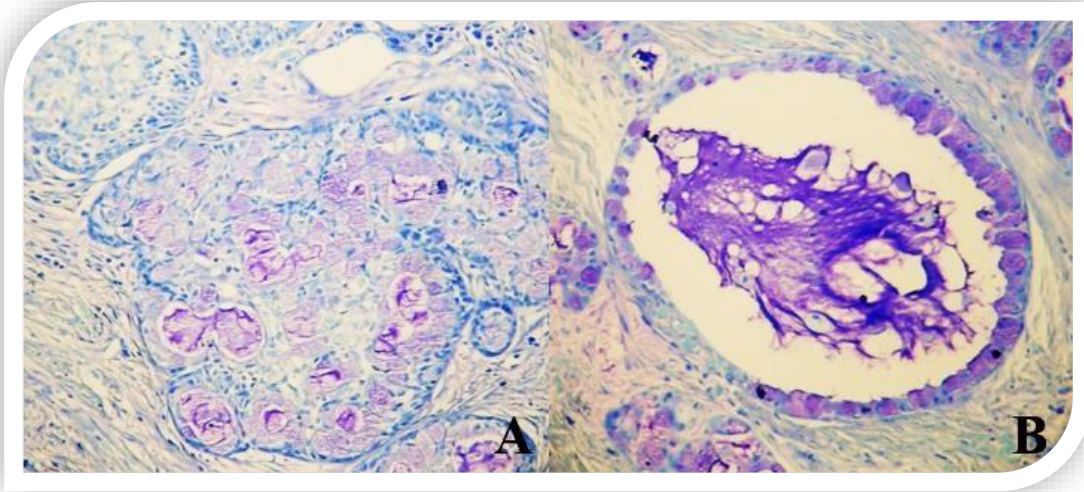
-También se realizará en estudio comparativo de la densidad vascular teniendo en cuenta la presencia o ausencia de mioepiteliocitos ya que se describe en la literatura que estas células producen en los tumores factores antiangiogénicos que pueden relacionarse con la mayor o menor agresividad y crecimiento que presentan los tumores malignos en general.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1-Ellis GL, Auclair PL. Tumors of salivary glands. Washington, DC, American Registry of Pathology Armed Forces Institute of Pathology. 2008.
- 2-Seethala MD. Salivary gland tumors current concepts and controversies. *Surg Patho* 2017; 10: 155-176.
- 3-World Health Organization. Classification of Head and Neck Tumours. Volume 9: WHO. 4th ed. Lyon. Edited by El-Naggar A.K., Chan JKC, Grandis J., Takata T y Slootweg J. IARC Press. 2017.
- 4- Zhu S, Schuerch C, Hunt J. Review and updates of immunohistochemistry in selected salivary gland and head and neck tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2015; 139: 55-66.
- 5- Seethala R, Stenman S. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Tumors of the Salivary Gland. *Head Neck Pathol* 2017; 11:55-67. doi: 10.1007/s12105-017-0795-0.
- 6- Bussari S, Ganvir SM, Sarode M, Jeergal PA, Deshmukh A, Srivastava H. Immunohistochemical detection of proliferative marker ki-67 in benign and malignant salivary gland tumors. *J Contemp Dent Pract* 2018; 19:375-383.
- 7- García PE, Samar ME, Avila RE. Le marqueur Ki67 dans les tumeurs des glandes salivaires. Signification pronostique: Etude clinicopathologique. Edition Natre Savoir. Scienza Scripts. Dodo Books Indian Ocean. Republic of Moldova. 2021.
- 8-Stanca Melincovici C, Boşca AB, Suşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IA, Roman AL. Vascular endotelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol* 2018; 59/2: 455-467.
- 9-Luukka H, Laitakari J, Vahlberg T, Klemi P, Stanbäck F, Grénman R. Morphometric analysis of CD34 -positive vessels in salivary gland in adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 695-700.
- 10- Dhanuthi K, Sappayatosok K, Yodsanga S, Rojanawatsirivej,S, Pausch NC, Pitak-Arnnop P. An analysis of microvessel density in salivary gland tumours. A single centre study. *Surgeon* 2013; 11: 147-152.
- 11-Pouloudi D, Sotiriadis A, Theodorakidfou M, Sarantis P, Pergaris A, Karamouzis M, Theocharis S. The impact of angiogenesis in the most common salivary gland malignant tumors. *Int J Mol Sci* 2020; 21, doi: 10.3390/ymS21249335.
- 12-Sidney L, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise Review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* 2014; 32: 1380-1389. <https://doi.org/10.1002/stem.1661>.

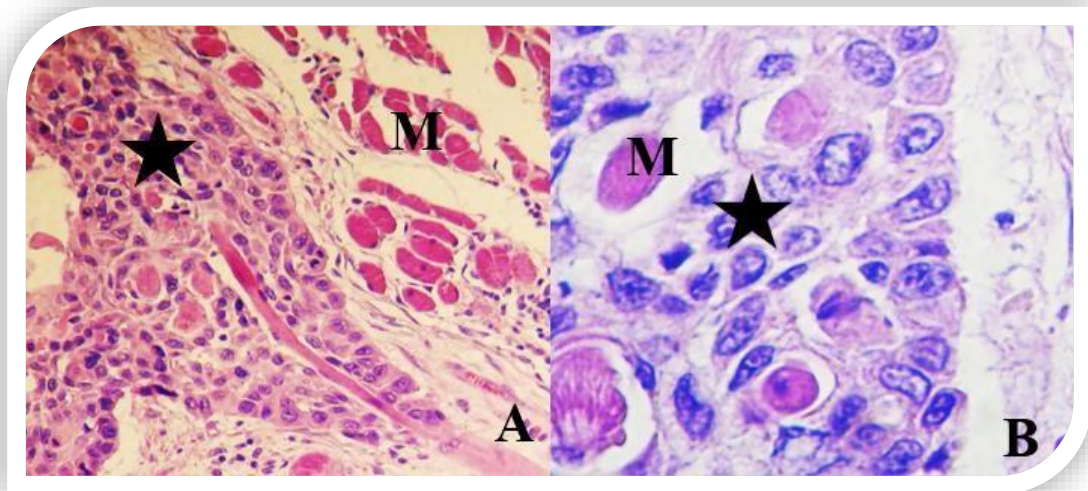
- 13- Li LT, Jiang G, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer. *Mol Med Reports* 2015; 11: 1566-1572. doi: 10.3892/mmr.2014.2914.
- 14- Blochowiak K, Sokalski J, Golusinzka E, Trzybulska D, Witmanowski H, Bodnar M, Marszalek A. Salivary levels and immunohistochemical expression of selected angiogenic factors in benign and malignant parotid gland tumors. *Clin Oral Invest* 2018. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2524-9>.
- 15- Peraza A, Gómez R, Beltran J, Amarista FJ. Mucoepidermoid carcinoma. An update and review of the literature. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg* 2020; 121: 713-720. doi:10.1016/j.jormas. 2020.06.003
- 16- Luna M. Salivary mucoepidermoid carcinoma revisited. *Adv Anat Pathol* 2006; 13: 293-307.
- 17- Avila RE, Samar ME, Ferraris R, La Rosa F. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma of the submandibular salivary gland: A challenging differential diagnosis of a very rare tumor. *Ann Clin Case Rep* 2019; 4: Article 1728.
- 18- Shafique K, Zhang PJ, Montone KT, Song S, LiVolsi VA, Baloch Z. Pathologic grading of mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland and its effect on clinicopathologic follow-up: an institutional experience. *Human Pathol* 2020; 98: 89-97. doi: 10.1016/j.humpath.2020.02.001.
- 19- Higgins KE, Cipriani NA. Practical immunohistochemistry in the classification of salivary gland neoplasms. *Semin Diagn Pathol* 2022; 39: 17-28. doi: 10.1053/j.semdp.2021.10.004.
- 20- Jing Y, Zhou Q, Zhu H, Znahg Y, Song Y, Zhang X, Huang X, Yang Y, Ni Y, Hu Q. Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2019; 17: 974-980. doi: 10.3892/ol.2018.9647
- 21- Živković N, Kostić M, Cvetanović A, Jovičić Milentijević M, Spacić M, Petrović M, Trajković M, Denčić T, Krtinić D. Differential challenges in salivary gland neoplasms. *Arch Biol Sci* 2021; 73: 65-72. <http://dx.doi.org/10.2298/ABS201201002Z>.
- 22- Tabatabaei SH, Maleki L, Sohrabi F. Immunohistochemical study of microvessel density in different microscopic grades of salivary glands mucoepidermoid carcinoma. *J Shahid Sadonghi Uni Med Sci* 2018; 26/4: 330-337.
- 23- Taher MG, Abdullah BH, Al-Kuri A. Immunohistochemical expression of CD34 as biological marker of angiogenesis and expression of D2-40 as marker of lymphangiogenesis in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *JPMS* 2012; 2: 3.
- 24- Hussien KA, Elgendy AR, Gaafar AI, Attia MA, Elrahawy KM, Khalil MG. Expression of CD34 and D2-40 in different grades of mucoepidermoid carcinoma. *Egyptian J Pathol* 2017; 37: 251-256.





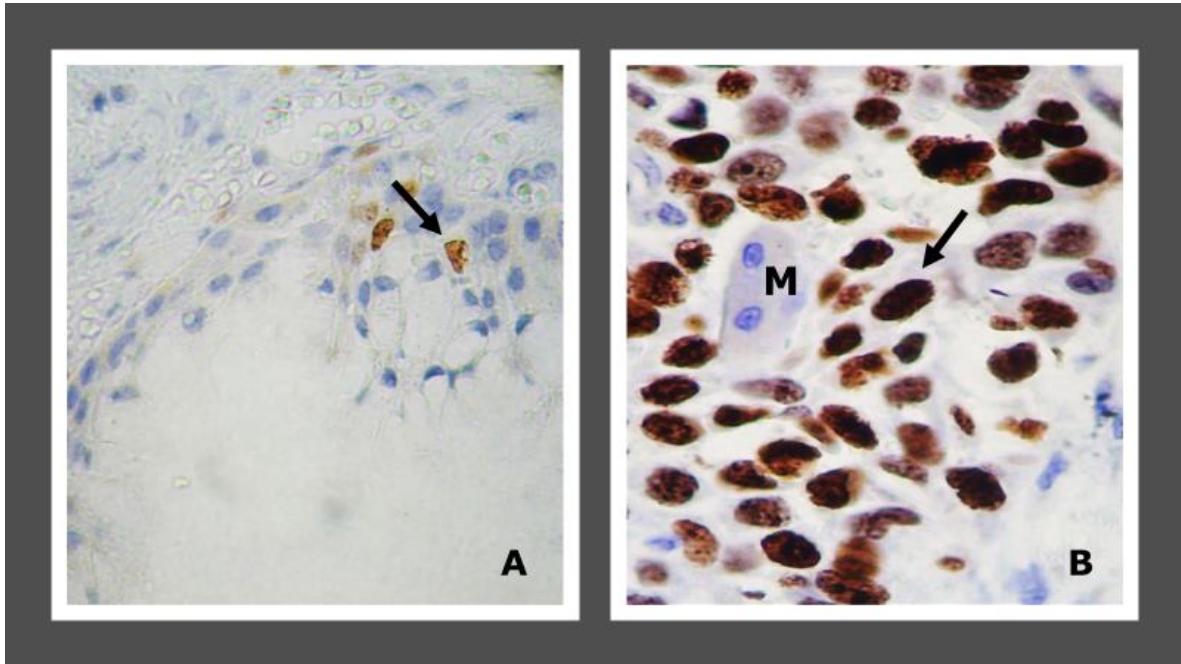
**Figura 1. Carcinoma mucoepidermoide de bajo grado de malignidad**

A- Nido tumoral sólido con mucocitos fuertemente metacromáticos. Coloración Azul de toluidina pH 3,8. 20x. B- Estructura quística con mucocitos y contenido luminal intensamente metacromáticos. Coloración Azul de toluidina pH 3,8. 40x.



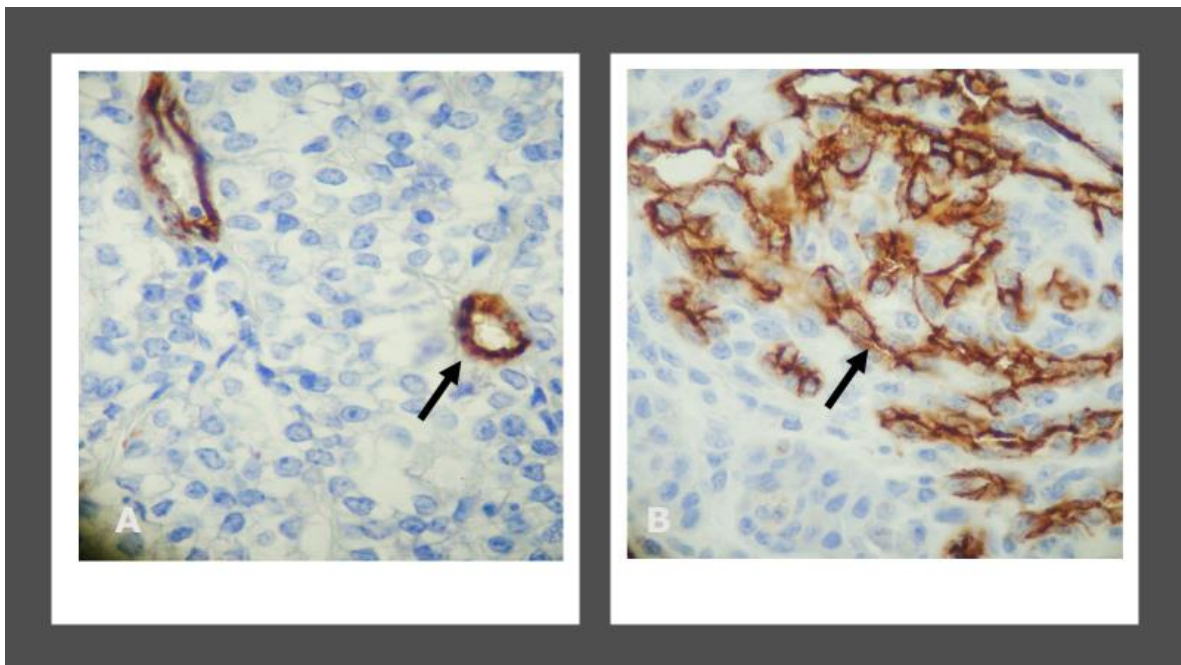
**Figura 2. Carcinoma mucoepidermoide de alto grado de malignidad**

Células tumorales (estrella). Músculo lingual (M). Coloración H/E. A-Objetivo 10x. B-Coloración H/E. Objetivo 40x.



**Figura 3. Carcinoma mucoepidermoide**

A-Bajo grado de malignidad. Inmunomarcación Ki67. Objetivo 40x.  
B-Alto grado de malignidad. Inmunomarcación Ki67. Objetivo 40x.



**Figura 4. Carcinoma mucoepidermoide**

A-Bajo grado de malignidad. Inmunomarcación CD34. Objetivo 40x.  
B-Alto grado de malignidad. Inmunomarcación CD34. Objetivo 40x.