

# Evaluación histomorfométrica de la elastosis en queilitis actínica

## Histomorphometric Evaluation of Elastosis in Actinic Cheilitis

Yadira V. Boza Oreamuno DDS, MSc<sup>1</sup>; Alejandra Martínez DDS<sup>2</sup>; Isolde G. Rojas DDS, PhD<sup>3</sup>

1. Departamento de Ciencias Diagnósticas y Quirúrgicas, Facultad de Odontología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

2. Departamento de Patología y Diagnóstico, Facultad de Odontología, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

3. Department of Periodontics and Endodontics, School of Dental Medicine, University at Buffalo, Buffalo, NY, EEUU.

Autor para correspondencia: Dra. Yadira V. Boza Oreamuno - yadira.boza@ucr.ac.cr

Recibido: 28-IX-2016

Aceptado: 5-X-2016

Publicado Online First: 7-X-2016

DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/ijds.v0i0.26496>

### RESUMEN

La queilitis actínica (QA) es una lesión potencialmente maligna del labio que se caracteriza por la degeneración basófila de la matriz extracelular (MEC) debido a la exposición crónica a la luz ultravioleta. Esta alteración conocida como elastosis actínica, no ha sido caracterizada histomorfométricamente en QA ni en labio normal (LN). MÉTODOS: Muestras de QA (n=33) y de LN (n=16), recolectadas en la Facultad de Odontología de la Universidad de Concepción, fueron teñidas con la tinción Verhoeff-Van Gieson y analizadas histomorfométricamente con el programa Image J. RESULTADOS: En QA las fibras elásticas se caracterizaron por un aumento de grosor y desorganización, también se observó degeneración de las fibras colágenas. El contenido de fibras elásticas estaba significativamente aumentado en QA comparado con LN ( $p<0.05$ ). La proporción entre fibras elásticas/colágenas también fue mayor en QA que en LN ( $p<0.02$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias en la densidad de fibras colágenas entre QA y LN. En AC se observó una correlación negativa entre la densidad de fibras elásticas y colágenas ( $p<0.0001$ ,  $r=0.6$ ). CONCLUSIONES: El análisis histomorfométrico mostró diferencias significativas en la composición de la MEC entre QA y LN. Estas diferencias fueron debidas principalmente al aumento del contenido de fibras elásticas en QA.

### PALABRAS CLAVE

Queilitis actínica; Elastosis actínica; Fibras elásticas; Fibras colágenas; Daño solar.

## ABSTRACT

Actinic cheilitis (AC) is a potentially malignant lesion of the lip characterized by basophilic degeneration of the extracellular matrix (ECM) as a result of chronic exposure to sunlight. This alteration, known as actinic elastosis, has not been previously characterized by histomorphometry in AC and normal lip tissues (NL). METHODS: Formalin-fixed and paraffin-embedded samples of AC (n=33) and NL (n=16) obtained from the Archives of the College of Dentistry of the University of Concepción, were stained with Verhoeff-Van Gieson technique. Elastic fibers were characterized and quantified by histomorphometry using Image J Program (NIH Image). RESULTS: In AC, elastin fibers were disorganized and increased in thickness and collagen fibers looked degenerated. A significant increase in elastin fibers was found in AC as compared to NL ( $p<0.05$ ). The ratio between elastin/collagen fibers was also higher in AC than NL ( $p<0.02$ ). However, collagen fiber density was similar between AC and NL. A negative correlation between elastic and collagen fibers was found in AC ( $p<0.0001$ ,  $r=0.6$ ). Conclusions: Using histomorphometry we found a significant difference in the composition of the ECM in AC as compared to NL. This difference was mainly due to the increase in elastin fiber content in AC.

## KEY WORDS

Actinic cheilitis; Actinic elastosis; Elastin fibers; Collagen fibers; Photodamage.

## INTRODUCCIÓN

La queilitis actínica (QA) es una lesión potencialmente maligna que afecta el bermellón del labio inferior de personas adultas y de piel clara (1-3). Se caracteriza por alteraciones en el epitelio y el tejido conectivo, inducidas principalmente por la sobreexposición a la luz ultravioleta solar (UV), un proceso conocido como fotoenvejecimiento (4-5).

En los estadios tempranos de la QA el epitelio se observa con hiperqueratosis, ya sea orto o paraqueratosis, atrofia epitelial, hiperplasia y en estadios posteriores puede presentarse algún grado de displasia intraepitelial (3, 6). En el tejido conectivo se observa siempre la presencia de elastosis (en distintos grados), que corresponde a una degeneración basófila de la matriz extracelular la cual es reemplazada por fibras elásticas amorfas producidas por fibroblastos residentes (7-9). Además, en la mayoría de las lesiones de QA se observa un infiltrado inflamatorio crónico de distinta intensidad y la aparición de vasos sanguíneos telangiectásicos (6).

Se ha propuesto que la elastosis actínica se produce tanto por procesos degenerativos como de síntesis anormal de fibras elásticas por parte de fibroblastos con daño solar, lo que va acompañado de cambios morfológicos del colágeno (10). Se ha descrito además un aumento de la proporción elastina/colágeno, que va en relación directa a la magnitud del daño actínico (8).

Por lo tanto, el propósito de este estudio fue caracterizar la elastosis en QA y compararla con muestras de labio normal (LN) mediante un método histomorfométrico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## PACIENTES Y MUESTRAS DE LABIO

Muestras de QA (n = 33, edad promedio de  $48.40 \pm 13.09$  años, 65% hombres) fueron obtenidas de los archivos del Departamento de Patología Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Concepción. Las muestras de LN (n= 16 edad promedio de  $40.95 \pm 13.31$  años,

43% hombres) fueron obtenidas de pacientes voluntarios, con menos de dos horas de exposición diaria al sol, pareados de acuerdo a edad y género con los pacientes de QA. Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes y este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Concepción. Las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10% (pH 7,4), incluido en parafina dentro de las 24 h. Las secciones seriadas, 4 µm de espesor, se obtuvieron de los bloques de tejido y procesadas para el análisis histopatológico e histoquímico.

#### TINCIÓN Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA ELASTOSIS

Secciones de tejido de 4 µm de espesor, fueron procesadas para tinción histoquímica de Verhoeff y contratinción de Van Giesson. Las secciones fueron fotografiadas con un microscopio Nikon Diaphot 300 conectado a una cámara digital utilizando el programa de captura de imagen Image Pro (media Cybernetics, Atlanta, GA). De cada muestra fueron seleccionados y analizados al menos 10 campos de la dermis papilar (tejido de la lámina propia subyacente al epitelio) y 10 campos de la dermis reticular (lámina propia entre dermis papilar y submucosa) (objetivo 20x). Para todas las lecturas morfométricas se mantuvieron constantes las condiciones de iluminación ambiental, la intensidad de iluminación y el diafragma del microscopio, así como el brillo y contraste del monitor.

Cada imagen fue procesada con el programa Image J (NIH Image) para obtener la densidad de fibras elásticas y colágenas en cada muestra mediante el análisis de la intensidad de color (píxeles) transformado a densidad de fibras (11).

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizaron los programas estadísticos JMP-IN 4.0 (SAS Institute, USA) y SPSS Program 14.0 (Chicago, USA). Todas las variables que se

analizaron fueron cuantitativas. Se obtuvieron los promedios  $\pm$  desviación estándar (DS) de densidad de fibras elásticas y colágenas por muestra, las que fueron analizadas para obtener los promedios  $\pm$  DS de cada grupo (QA y LN). Se utilizaron test paramétricos (t test) y no paramétricos (Mann-Whitney). Para analizar asociación entre variables se utilizó el test de correlación de Pearson. Se consideró como significativo un valor de  $p < 0.05$ .

#### RESULTADOS

##### DISTRIBUCIÓN Y MORFOLOGÍA DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS Y COLÁGENAS EN LN Y QA

En el tejido conectivo de las lesiones con QA se observó aumento del grosor y una desorganización de las fibras elásticas y colágenas en comparación con el LN (Fig. 1A-B).

Las fibras elásticas en el área papilar no sólo eran más numerosas y gruesas sino que perdían su verticalidad, y en el área reticular tendían a hipertrofiarse formando masas de material elastótico acelular (Fig. 1D-F).

También se observó desorganización de los haces de colágeno, éstos se encontraban adelgazados, fragmentados, desorientados y con aspecto deshilachado, tanto en el área papilar como reticular. En el LN la distribución de las fibras colágenas fue homogénea en toda la extensión de la muestra observándose haces de colágeno gruesos y compactos (Fig. 1C-E).

Fue posible observar en áreas de elastosis variaciones en la tinción, en algunos casos el material elastótico se teñía de color morado y no del negro característico de las fibras elásticas (Fig. 2A), además en QA se observó un infiltrado inflamatorio de diferente intensidad (Fig. 2B).

Además, en algunos LN se observaron acúmulos de fibras elásticas semejantes a los

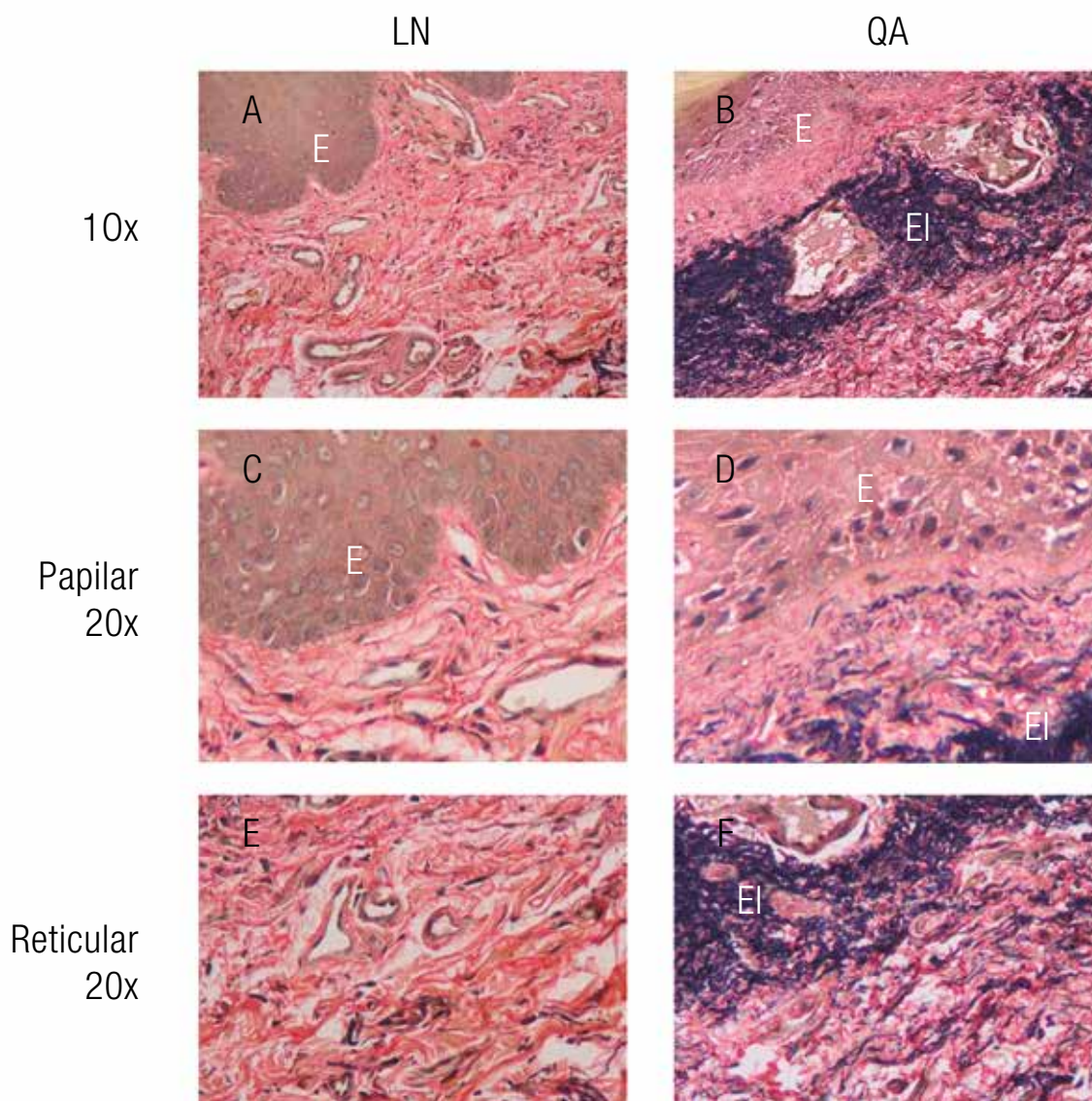
encontrados en lesiones de elastosis actínicas, sin embargo, se veían formados por fibras y no por masas amorfas de tejido elastótico (Fig. 3).

#### DENSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS Y COLÁGENAS EN LN Y QA

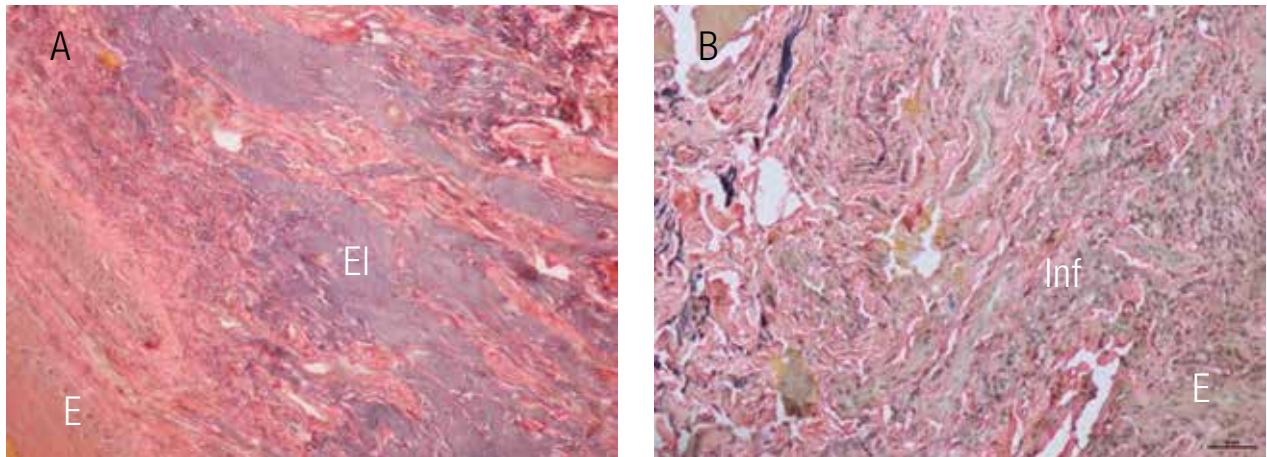
Al medir la densidad promedio de las fibras en el área papilar y reticular se encontró un aumento significativo en la densidad de fibras elásticas en QA en comparación con LN ( $p < 0.05$ , t-test) (Fig. 4), además la proporción de Fibras Elásticas/

Colágenas en QA estaba significativamente aumentada en relación al LN ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney) (Fig. 5), sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la densidad promedio de las fibras colágenas tanto en la dermis papilar como en la reticular al comparar QA y LN (Fig. 6).

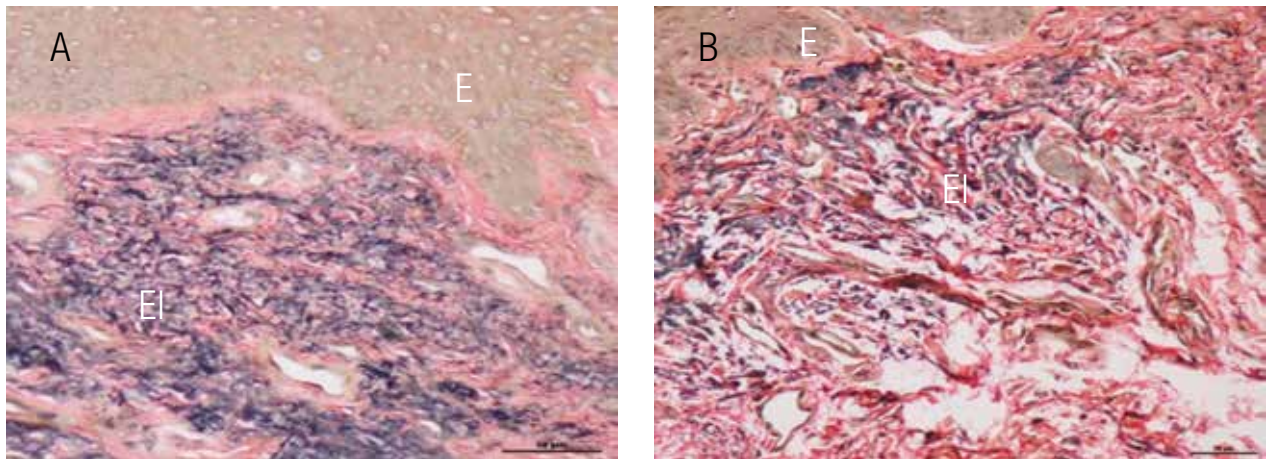
También en QA fueron encontradas correlaciones negativas entre la densidad de fibras colágenas y fibras elásticas totales ( $r = -0.6$ ,  $r^2 = 0.37$ ,  $p = 0.0001$ ) (Fig. 7 A) y en el área papilar ( $r = -0.73$ ,  $r^2 = 0.53$ ,  $p = 0.0001$ ) (Fig. 7 B).



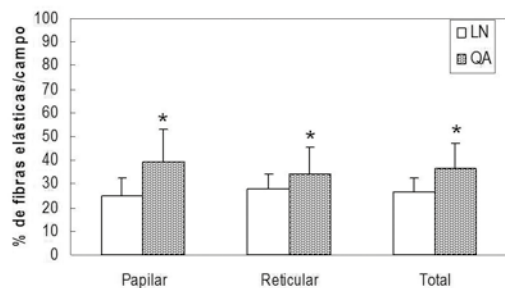
**Figura 1.** Detección histoquímica de fibras elásticas y colágenas mediante tinción de Verhoeff-Van Gieson en labio normal (LN) y queilitis actínica (QA). Fibras elásticas de color negro-morado, fibras colágenas rojo-rosado en LN (A, C y E) y QA (B, D y F). E, epitelio; EI, elastosis.



**Figura 2.** Variación en la tinción de las áreas de elastosis e inflamación en queilitis actínica (QA) (20x). Tinción de Verhoeff-Van Gieson. Áreas de elastosis (A) y de inflamación (B) en QA. E, epitelio; El, elastosis; Inf, inflamación.

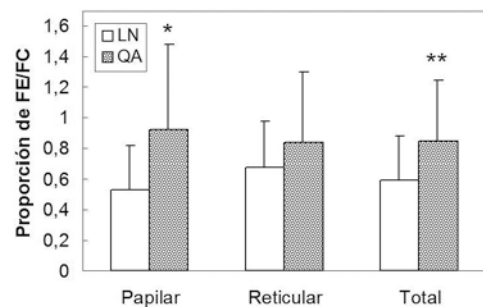


**Figura 3.** Áreas de elastosis y fibras elásticas en labio normal. Tinción de Verhoeff-Van Gieson (20x). Fibras elásticas de color negro. E, epitelio; El, elastosis.



**Figura 4.** Detección de la densidad de fibras elásticas por análisis histomorfométrico de secciones teñidas con el método histoquímico de Verhoeff-Van Gieson en labio normal y queilitis actínica. Los resultados son expresados como el promedio del % de fibras elásticas/campo  $\pm$  DS (n=16 para LN y n=33 QA).

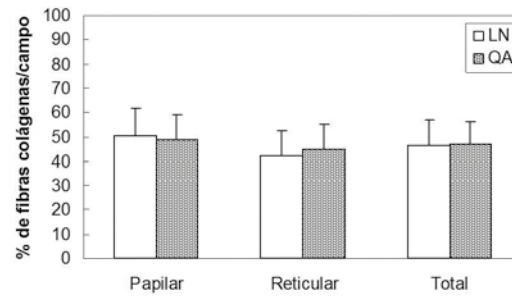
\*P<0.05, t-test comparado con LN.



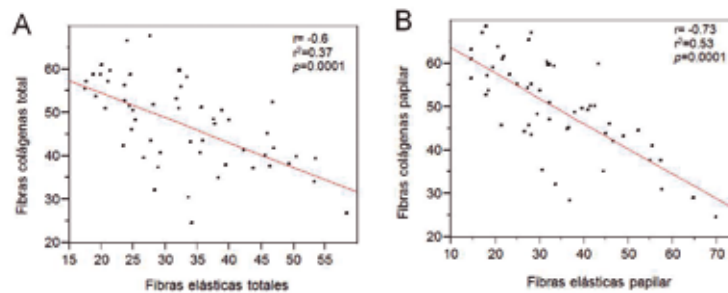
**Figura 5.** Proporción de fibras elásticas/fibras colágenas (FE/FC) en labio normal y queilitis actínica. Los resultados son expresados como el promedio del % de FE/FC por campo  $\pm$  DS (n=16 para LN y n=33 QA).

\*P=0.02, Mann-Whitney cuando está comparado con LN.

\*\*P=0.01, Mann-Whitney cuando está comparado con LN.



**Figura 6.** Detección de la densidad de fibras colágenas por análisis histomorfométrico de secciones teñidas con el método histoquímico de Verhoeff-Van Gieson en labio normal y queilitis actínica. Los resultados son expresados como el promedio del % de fibras colágenas/campo  $\pm$  DS (n=16 para LN y n=33 QA). P=0.8, t-test.



**Figura 7.** (A) Asociación negativa entre la densidad de fibras colágenas y fibras elásticas totales y (B) fibras elásticas y colágenas en el área papilar, análisis de correlación de Pearson, (n=16 para LN y n=33 QA).

## DISCUSIÓN

Nuestro estudio mostró que el análisis histomorfométrico de la densidad de fibras elásticas y colágenas en QA y LN arrojó diferencias significativas en la composición de la MEC entre ambos grupos. Se observó tanto un aumento significativo en la densidad de fibras elásticas en QA en comparación con LN, como un aumento en la proporción de fibras elásticas en relación a las colágenas en QA comparado con LN. Sin embargo, no se observaron diferencias en la densidad de fibras colágenas entre QA y LN, lo que sugiere que el cambio en la composición de la MEC se debe principalmente al aumento en el depósito de fibras elásticas, las que mostraban un aumento en grosor y desorganización.

Se ha descrito que la elastosis actínica es una degeneración basófila del tejido conectivo producida por la exposición crónica a la luz UV que se presenta en lesiones premalignas de piel y bermellón de labio, este proceso ha sido descrito como fotoenvejecimiento (8,12). Se caracteriza por la degeneración del colágeno y el reemplazo de la matriz extracelular por una red de material elástico alterado (7,12).

El bermellón del labio es un tejido similar a la piel, pero carece de glándulas anexas (glándulas sudoríparas y sebáceas, folículos pilosos), está cubierto por un epitelio de pocas capas celulares y posee muy poca queratina, lo que lo hace especialmente susceptible a la radiación UV solar (13). El fotoenvejecimiento de los labios también se caracteriza por una marcada elastosis, sin embargo, los mecanismos involucrados en su patogénesis han sido muy poco estudiados. Estudios han demostrado que en piel fotoenvejecida los principales cambios ocurren en la dermis superficial (unión de la dermis con la epidermis o zona papilar), donde se produce una reducción y/o reorganización de las fibras oxitalánicas, las cuales pierden su verticalidad y pasan a engrosar la red de tejido elastótico (14).

Grimbaldeston et al. (11) midieron la acumulación y diámetro de las fibras elásticas (teñidas con Verhoeff y tinción de Van Gieson), encontrando que la piel expuesta al sol presentaba mayor grado de elastosis.

Sgarbi FC et al. (15) reportaron que el porcentaje de fibras de colágeno fue significativamente mayor en los pacientes del grupo control que en los pacientes con QA, pero, no observaron diferencias significativas en relación con el porcentaje de fibras elásticas. Sin embargo, en este estudio los controles se realizaron con mucosa labial y no con el bermellón del labio inferior. En el presente trabajo, en las lesiones de QA se observó que las fibras elásticas en el área papilar no sólo eran más numerosas y gruesas sino que perdían su verticalidad, y en el área reticular tendían a hipertrofiarse formando masas de material elastótico acelular. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la densidad de fibras colágenas entre labio normal y QA. Este aumento de la densidad de las fibras elásticas y la no variación en las fibras colágenas en QA comparado con LN podría explicarse por un aumento de la producción de fibras elásticas y una disminución de los espacios entre ellas, ocupados en condiciones normales por vasos sanguíneos y la sustancia fundamental. Además los resultados mostraron una fuerte correlación negativa entre fibras elásticas y colágenas lo que sugeriría que en QA el colágeno es reemplazado por elastina.

En los últimos años se ha demostrado que el proceso de carcinogénesis no sólo requiere la transformación maligna de las células del parénquima de un órgano o tejido, sino que también requiere una participación activa del estroma tumoral (16). La elastosis es la consecuencia de un aumento del infiltrado inflamatorio y por ende de la producción de oxidantes, proteasas y citoquinas pro-inflamatorias (17). Todos estos componentes también se asocian con la promoción, progresión e invasión tumoral (16-17).

Por otra parte, un estudio reciente demostró que las muestras de cáncer labial con presencia de elastosis tenían un mejor pronóstico (18). Por lo tanto una mejor caracterización del estroma de las lesiones de QA podría contribuir a una mejor evaluación del pronóstico de las lesiones labiales premalignas y malignas.

## CONCLUSIONES

La técnica de Verhoeff-Van Gieson es una tinción útil para observar y cuantificar la elastosis presente en las lesiones de QA. La elastosis en QA es similar a la observada en piel fotodañada, con aumento significativo de la densidad de fibras elásticas, y una alteración de la proporción de Fibras Elásticas/Fibras Colágenas en la matriz extracelular, además se encontró fuerte correlación negativa entre fibras elásticas y colágenas.

De los resultados aquí expuestos, se deriva la necesidad de impulsar estudios destinados a determinar los mediadores específicos que participan en la formación de elastosis en labios fotodañados.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por proyectos Fondecyt 1050581 y 1090287 (CONICYT, Chile).

## REFERENCIAS

1. Main J. H., Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J. Can Dent Assoc.* 1994; 60: 113-6.
2. Markopoulos A., Albanidou-Farmaki E., Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis* 2004;10: 212-216.
3. Lopes M. L. D. de S, da Silva Júnior F. L., Lima K. C., de Oliveira P. T., da Silveira É. J. D. Clinicopathological profile and management of 161 cases of actinic cheilitis. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2015;90(4):505-512.
4. Picascia D. D., Robinson J. K. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. *J. Am Acad Dermatol* 1987; 17: 255-64.
5. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009; 45:317-23.
6. Kaugars G. E., Pillion T., Svirsky J. A., Page D. G., Burns J. C., Abbey L. M. Actinic cheilitis. A review of 152 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod* 1999; 88: 181-6.
7. Imayama S., Nakamura K., Takeuchi M., Hori Y.; Takema Y.; Sakaino Y.; Imokawa G. Ultraviolet-B irradiation deforms the configuration of elastic fibers during the induction of actinic elastosis in rats. *J. Dermatol Sci* 1994; 7:32-8.
8. Lewis K. G., Bercovitch L., Dill S. W., Robinson-Bostom L. Acquired disorders of elastic tissue: Part I. Increased elastic tissue and solar elastotic syndromes. *J. Am Acad Dermatol.* 2004; 51:1-21.
9. Yaar M., Gilchrest B. A. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J. Dermatol* 2007; 157: 874-87.
10. Özcan G., Shenaq S., Chahadeh H., Spira M. Ultraviolet-A induced delayed wound contraction and decreased collagen content in healing wounds and implant capsules. *Plast. Reconstr. Surg.* 1993; 92:480-484.
11. Ghomrasseni S., Dridi M., Bonnefoix M., Septier D., Gogly G., Pellat B., et al. Morphometric analysis of elastic skin fibres from patients with: cutis laxa, anetodermia, pseudoxanthoma elasticum, and Buschke-Ollendorf and Williams- Beuren syndromes. *J. Eur Acad Dermatol Venereol.* 2001; 15: 305-311.
12. Imayama S., Nakamura K., Takeuchi M., Hori Y.; Takema Y.; Sakaino Y.; Imokawa G. Ultraviolet-B irradiation deforms the

- configuration of elastic fibers during the induction of actinic elastosis in rats. *J. Dermatol Sci* 1994; 7:32-8.
13. Nicolau S. G., Baelus L. Chronic actinic cheilitis and cancer of the lower lip. *Br J. Dermatol.* 1964; 76: 278-89.
  14. Tsourelis-Nikita E., Watson R. E., Griffiths C. E. Photoageing: the darker side of the sun. *Photochem Photobiol Sci.* 2006 Feb; 5 (2): 160-4.
  15. Sgarbi F. C., Bertini F., Tera T. M., Cavalcante A. R. Morphology of collagen fibers and elastic system fibers in actinic cheilitis. *Indian J. Dent Res.* 2010; 21: 518-22.
  16. Coussens L. M., Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different! *J. Exp Med*, 2001; 193: F23-6.
  17. Coussens L. M., Raymond W. W., Bergers G. et al. Inflammatory mast cells upregulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*, 1999; 13: 1382-97.
  18. Abreu M. A., Silva O. M., Neto Pimentel D. R., Hirata C. H., Weckx L. L., Alchorne M. M., Michalany N. S. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Braz J. Otorhinolaryngol.* 2006 Nov-Dec; 72 (6): 767-71.



Attribution (BY-NC) - (BY) You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggest the licensor endorses you or your use. (NC) You may not use the material for commercial purposes.