

## **POLIMORFISMO VACUOLAR Y NUCLEAR EN EL TEJIDO EPITELIAL RINOSINUSAL CON DIAGNÓSTICO DE PAPILOMA INVERTIDO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO**

Aderito De Sousa<sup>1</sup>, María Zamora<sup>2</sup>, Marco Álvarez<sup>3</sup>

---

**RESUMEN:** *La cuantificación de los cambios histológicos asociados a la mayoría de los procesos neoplásicos se ha visto fortalecida con el análisis de las imágenes en ambiente digital. Sin embargo, en los estudios histopatológicos rutinarios del Papiloma Invertido Rinosinusal el análisis cuantitativo ha sido poco considerado. Se realizó un análisis morfométrico de cortes histológicos del tejido nasal teñido con H&E. Estos fueron registrados en imágenes digitales, analizados por segmentación a través del Programa Image J Fiji y valorados con el análisis de varianza, ANOVA de acuerdo al Programa Estadístico GraphPad Prism 7.0. Se observó un epitelio engrasado con numerosas invaginaciones cripticas dirigidas hacia el estroma, con un aumento de células escamosas en la superficie epitelial y la presencia de numerosas vacuolas. La población vacuolar y nuclear, presentaron polimorfismo, cuantificado a través de parámetros morfométricos como la circularidad y la redondez de dichas inclusiones celulares. El comportamiento estadístico ambos polimorfismos presento una correlación positiva y significativa, con \*\*\*\* $p < 0.0001$ . El uso del ambiente digital en el análisis histopatológico del tejido diagnosticado con Papiloma Invertido Rinosinusal, permitió ubicar a los parámetros morfológicos de circularidad y redondez como posibles índices descriptores de la arquitectura vacuolar y nuclear, así como posibles índices histológico descriptores a ser incorporados en la caracterización del estadio y pronóstico de las lesiones neoplásicas rinosinuales.*

**PALABRAS CLAVE:** *Papiloma Invertido Rinosinusal., Morfometría., polimorfismo vacuolar-nuclear.*

**ABSTRACT:** *The quantification of the histological changes associated with most of the neoplastic processes has been strengthened with the analysis of the images in a digital environment. However, in routine histopathological studies of rhinosinusal Inverted Papilloma, quantitative analysis has been little considered. A morphometric analysis of histological sections of nasal tissue stained with H&E was performed. These were recorded in digital images, analyzed by segmentation through the Image J Fiji Program and assessed with the analysis of variance, ANOVA according to the GraphPad Prism 7.0 Statistical Program. A greasy epithelium was observed with numerous cryptic invaginations directed towards the stroma, with an increase in squamous cells on the epithelial surface and the presence of numerous vacuoles. The vacuolar*

*and nuclear population presented polymorphism, quantified through morphometric parameters such as circularity and roundness of said cellular inclusions. The statistical behavior of both polymorphisms presented a positive and significant correlation, with \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . The use of the digital environment in the histopathological analysis of the tissue diagnosed with Inverted Rhinosinusal Papilloma, allowed to locate the morphological parameters of circularity and roundness as possible descriptive indices of the vacuolar and nuclear architecture as possible descriptive histological indices to be incorporated in the characterization of the stage. and prognosis of rhinosinusal neoplastic lesions.*

**KEY WORDS:** *Inverted Rinosinusal, Papilloma, Morphometry, Vacuolar-nuclear polymorphism.*

## INTRODUCCIÓN

Las características histológicas, celulares y nucleares, relacionadas con el comportamiento biológico agresivo de algunas neoplasias han sido descritas por técnicas de microscopía.<sup>1</sup> Sin embargo, en la mayoría de los casos resultan características de naturaleza descriptiva, de baja reproducibilidad y no cuantitativas. Particularmente en el caso

del Papiloma Invertido Rinosinusal (PIR), el estudio microscópico ha despertado un especial interés debido a su origen epitelial, su comportamiento agresivo y su propensión a recidivar y riesgo de malignizar<sup>2,3</sup>. A pesar de que sus características histológicas han sido muy bien definidas, al igual que en muchos otros tumores, el análisis cuantitativo de dichas características ha sido poco analizado.

En los últimos años los estudios cuantitativos llevados a cabo a través del análisis de imágenes en ambiente digital, han proporcionado una descripción más precisa y reproducible de los cambios histológicos asociados a los procesos neoplásicos de una manera rápida y económica, proporcionando información sobre las atipias celulares no perceptible

<sup>1</sup> Médico Cirujano. Especialista en Otorrinolaringología. Director de la Unidad de Otorrinolaringología endoscópica. Instituto Médico La Floresta, Caracas, Venezuela. ORCID:0000-0003-1883-0769

<sup>2</sup> Médico Cirujano. Especialista en Otorrinolaringología. Fellow en Endoscopia Rinosinusal de la Unidad de Otorrinolaringología endoscópica. Instituto Médico La Floresta, Caracas, Venezuela. ORCID:0000-0003-4431-2515

<sup>3</sup> Profesor Titular. Licenciado en Biología. MSc., PhD. Sección de Microscopía Electrónica del Instituto Anatómico "José Izquierdo". Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. ORCID:0000-0002-1781-4532

## POLIMORFISMO VACUOLAR Y NUCLEAR EN EL TEJIDO EPITELIAL RINOSINUSAL CON DIAGNÓSTICO DE PAPILOMA INVERTIDO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

por el ojo humano <sup>4,5,6</sup>. Esto ha venido a complementar al examen histopatológico de rutina, hasta los momentos insustituibles en los protocolos diagnósticos en donde se sospecha de lesiones tumorales, contribuyendo así con la reducción de la subjetividad en la evaluación microscópica de las características particulares de las diferentes lesiones tumorales <sup>7</sup>.

En tal sentido, en la presente investigación se propuso el análisis morfométrico de láminas histológicas con diagnóstico de PIR, acompañado de un análisis cuantitativo de las células del epitelio tumoral, las cuales revelan características en la arquitectura tisular, donde la diversidad histológica lo ha clasificado en subtipos de complejidad específica, pudiendo esto ser cuantificado y expresado de manera más detallada y reproducible.

### MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo con muestreo no probabilístico de muestras histopatológicas provenientes de biopsias de pacientes con diagnóstico de PIR que habían sido sometidos a resección quirúrgica endoscópica de

neoplasias y que posteriormente fueron examinadas y procesadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Médico La Floresta, en Caracas, Venezuela. Dichas muestras se obtuvieron mediante la autorización del paciente con su consentimiento informado de acuerdo con las directrices y la aprobación del Comité de Ética y de Investigación de dicha institución. Se analizaron una serie de 10 láminas contentivas de un promedio de 6 a 8 cortes de tejido contrastados con Hematoxilina y Eosina, procedentes de bloques de parafina cortados uniformemente a 5 µm de grosor.

Las láminas fueron examinadas con objetivo de inmersión a 100X, en un Microscopio Olympus BX50 y fueron registradas en imágenes digitales en número promedio de 5 imágenes por corte a través de un sistema de captura digital Capture IC.22. Imaging Source.

El análisis de las imágenes obtenidas fue realizado con el Programa Image J Fiji <sup>8</sup>. Comenzó con la deconvolución de color para la selección de material celular con propiedades tintóreas en el espectro de Hematoxilina, correspondiente a la cromatina nuclear y pared celular y

continuo con la transformación de las imágenes al blanco y negro en 8 bit, con ajuste de contraste y la calibración respectiva. Una vez realizadas las transformaciones de las imágenes originales, se procedió a la selección y segmentación de los fragmentos nucleares y otras áreas de interés, los cuales, a través de la cuantificación de su circularidad,  $C=4\pi \cdot \text{Área}/\text{Perímetro}^2$  y su Redondez,  $R=4 \cdot \text{Área}/\pi \cdot \text{eje mayor}^2$ , fueron definidos como parámetros morfométricos.

Todos los datos numéricos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza, ANOVA de una vía y representados en gráficas de distribución de frecuencia e histograma de acuerdo al Programa Estadístico GraphPad Prism 7.0.

## **RESULTADOS**

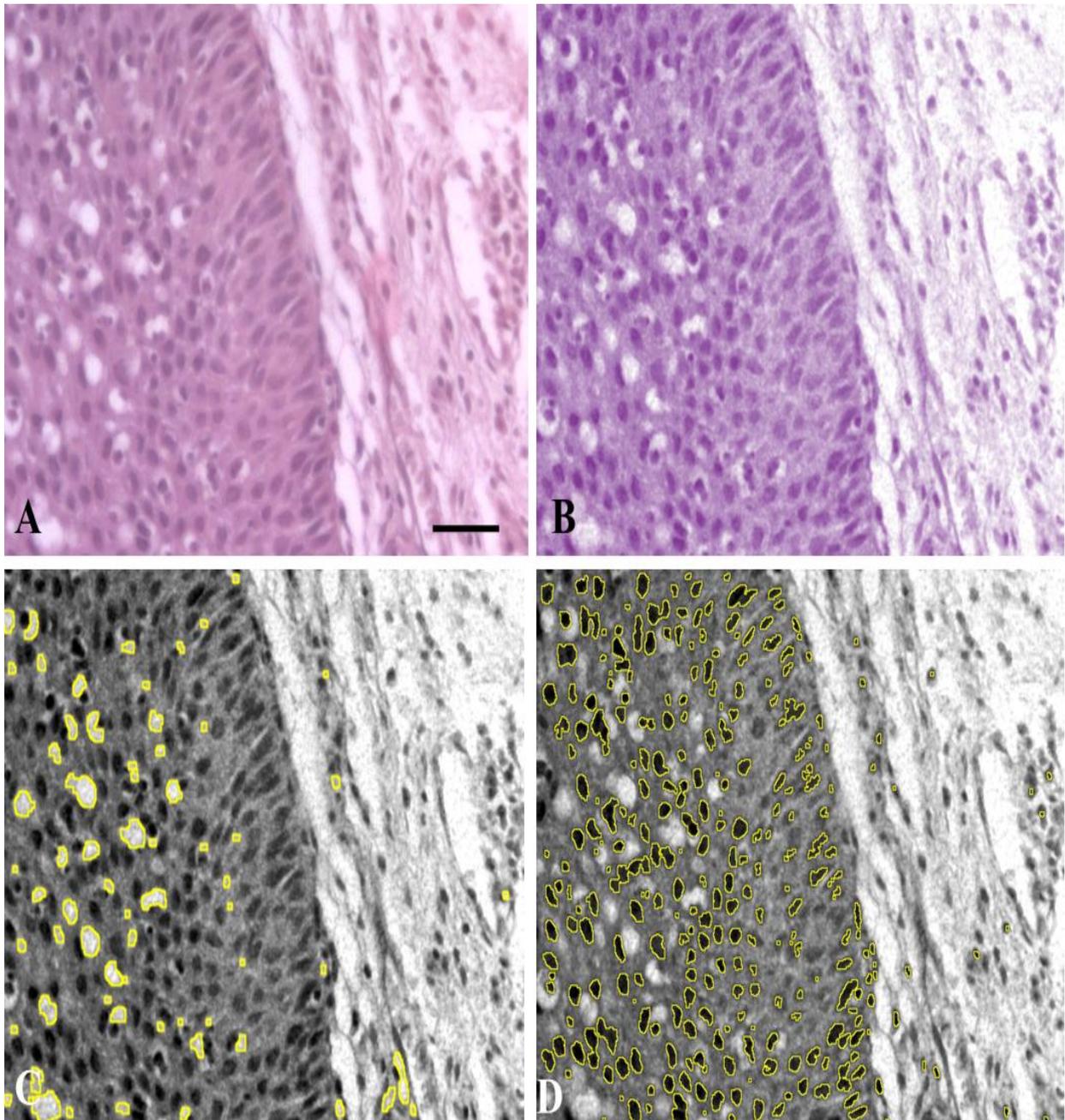
El análisis de todas las láminas aportadas permitió describir características particulares de la arquitectura histológica del Papiloma Invertido. Así se observó un epitelio engrosado con numerosas invaginaciones cripticas dirigidas hacia el estroma, con un aumento de células escamosas en la superficie epitelial y la presencia de numerosas vacuolas. Un

análisis del tejido epitelial, a través de la imagen original, en cortes histológicos teñidos con H&E (Figura 1A), seguida de la imagen con deconvolución del color (Figura 1B), de la imagen en transformación a 8-bit y de la segmentación, permitió destacar a la población vacuolar (Figura 1C) y a la población nuclear del tejido epitelial (Figura 1D). En un área de tejido igual a  $5 \text{ mm}^2$ , la población vacuolar mostró una variedad de formas y tamaños (Figura 2).

El parámetro morfométrico C, permitió la selección de la población de vacuolas de mayor tamaño a una mayor frecuencia de distribución, mientras que el parámetro R permitió la selección de la población vacuolar de menor tamaño a una menor frecuencia.

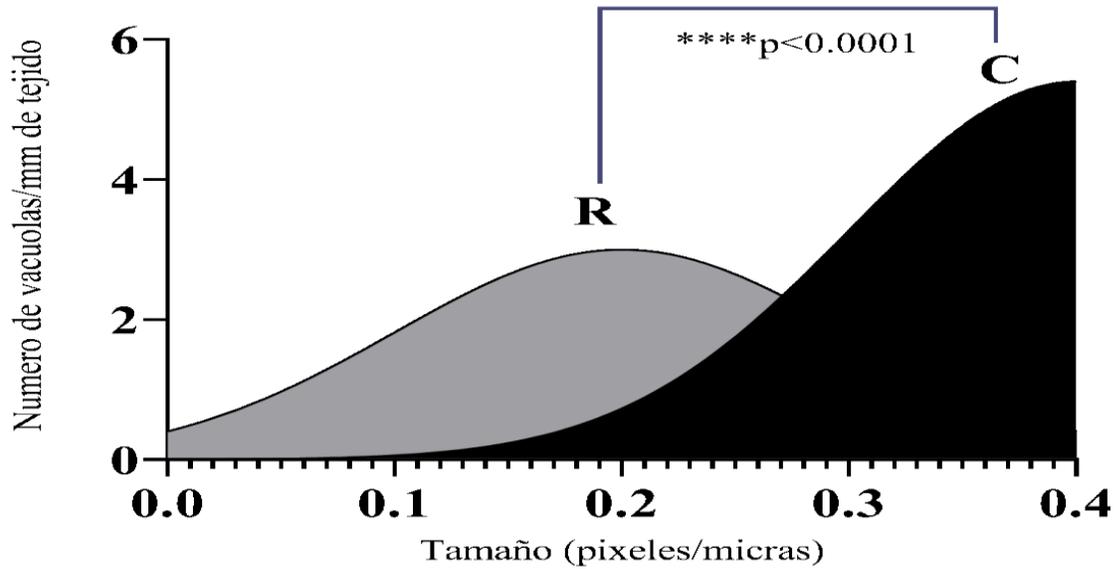
El comportamiento estadístico entre tales formas presento una correlación positiva y significativa, con un  $R^2=0.3412$  en un IC 95%, entre -0.7002 y -0.4380. Estimando un número de 30 vacuolas por área analizada, fue posible establecer un índice promedio de 6 vacuolas/  $\text{mm}^2$ . La segmentación de la población nuclear mostro también una variedad en forma y tamaño (Figura 3). Sin embargo, el parámetro morfométrico

**POLIMORFISMO VACUOLAR Y NUCLEAR EN EL TEJIDO EPITELIAL RINOSINUSAL CON DIAGNÓSTICO DE PAPILOMA INVERTIDO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO**



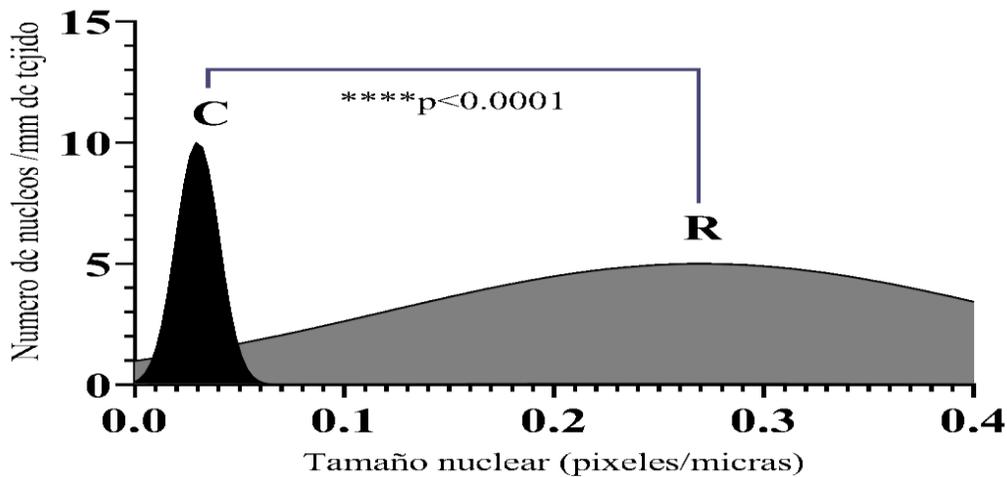
**Figura 1.** Histología de tejido epitelial Rinusinusual con diagnóstico de PIR. Coloración orriginal H&E (A). Deconvolución de color. Espectro de absorción de Hematoxilina (B). transformación 8-bit: selección de vacuolas 8C) y núcleos (D). Barra= 1.3 pixeles/micras.

**Fuente:** Elaboación propia.



**Figura 2.** Segmentación de la población vacuolar en epitelio Rinusinusual con diagnóstico de papiloma Invertido. Se destaca la variabilidad de formas y tamaños (A). Frecuencia de distribución. Circularidad (C), Redondez®. Vacuolas de mayor tamaño presentaron > frecuencia de distribución en función de C.N=100.

**Fuente:** Elaboración propia.



**Figura 3.** Segmentación de núcleos. Material de ADN en epitelio Risunisual con diagnóstico de Papiloma Invertido. Se destaca la variabilidad de formas y Tamaño (A). Frecuencia de distribución. Circularidad (C), Redondez (R). Material nuclear de menor tamaño presentaron > frecuencia de distribución en función de C.N=100.

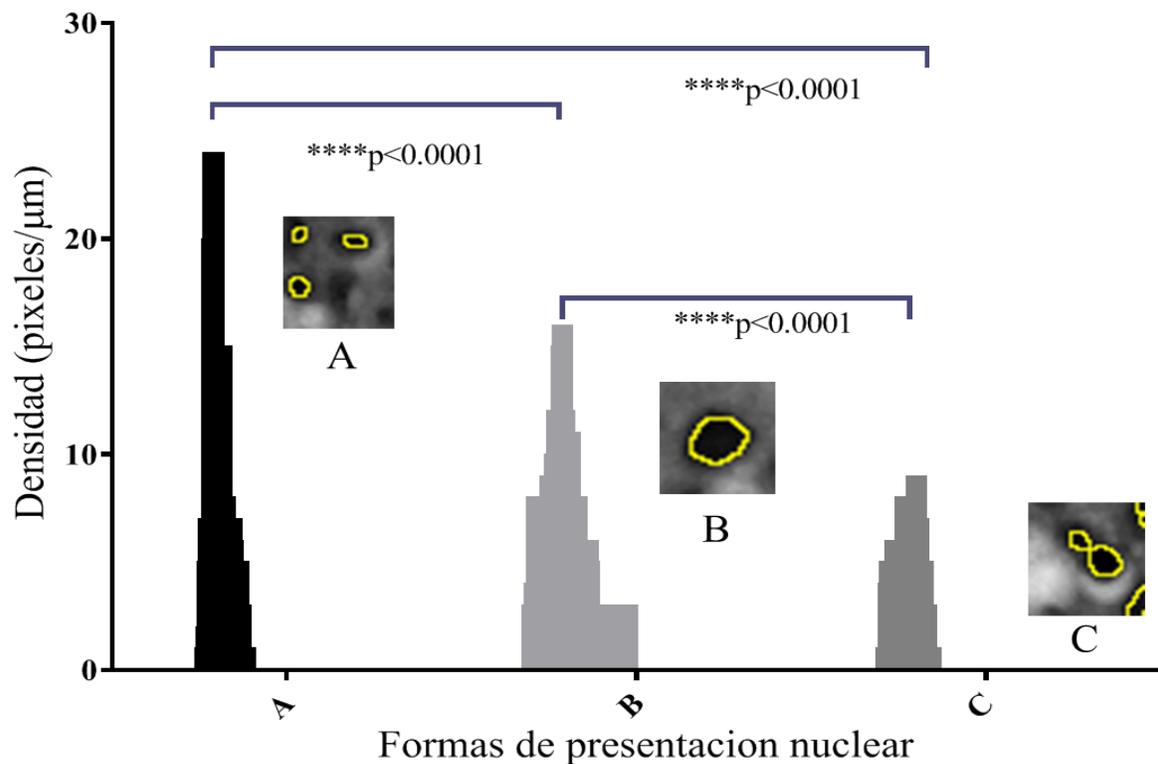
**Fuente:** Elaboración propia.

## POLIMORFISMO VACUOLAR Y NUCLEAR EN EL TEJIDO EPITELIAL RINOSINUSAL CON DIAGNÓSTICO DE PAPILOMA INVERTIDO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

C permitió la selección de núcleos de menor tamaño, o micro núcleos, con una selección de la población de núcleos de mayor tamaño a una menor frecuencia.

El comportamiento estadístico entre C y R nuclear, presento también una asociación positiva y significativa, con un  $R^2 = 0.3409$  en un intervalo de confianza (IC) 95%, entre -0.7000 y -0.4370. \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Dentro de la variedad de formas y tamaños del material nuclear se

mayor frecuencia de distribución, mientras que el parámetro R permitió la describieron los micro núcleos, encontrados en mayor frecuencia, también un material nuclear en forma compacta y uno en forma segmentada, en una mayor y menor frecuencia respectivamente. (Figura 4A,4B,4C). El comportamiento estadístico entre tales formas presento una correlación positiva y significativa, con un  $R^2 (A-C) = 0.2466$



**Figura 4.** Histograma de densidad de los diferentes formas de presentación de material nuclear. microcuerpos (A), cuerpos condensados (B), cuerpos en división (C). Valores medios entre grupos. ANOVA.  $P=0.330$  diferencias estadística significativa. Verificación Test de Bartlett  $p < 0.0001$ .  $N=256$ .

**Fuente:** Elaboración propia.

en un IC 95% entre 0.3982 y 0.5836, un  $R^2$  (A-B) = 0.5656 en un IC95% de 0.6934 y 0.8006 y un  $R^2$  (B-C) = 0.5866 en un IC 95%, entre 0.7099 y 0.8122.

## **DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos mostraron una expresión cuantitativa de las características morfológicas del tejido epitelial rinosinusal con diagnóstico de Papiloma Invertido; una característica regida por un polimorfismo vacuolar y un polimorfismo nuclear como fue puesto en evidencias a través de la diversidad de formas y tamaños de la población de vacuolas y núcleos encontrados en el tejido epitelial analizado.

La incorporación de la plataforma digital a los análisis de la histopatología de la neoplasia de los PIR, hizo posible ubicar a los parámetros morfológicos de circularidad (c) y redondez (R), de fragmentos nucleares y vacuolas, como posibles índices descriptores de dicha arquitectura tisular, con los cuales probablemente se podría contribuir con una mejor caracterización del estadio y pronóstico de las lesiones neoplásicas rinosinuales <sup>9,10</sup>, así como con la cuantificación del potencial de malignidad de las mismas, en término del

valor de frecuencia de distribución del polimorfismo, vacuolar y nuclear, definido a través de dichos parámetros. En ese sentido cabe destacar, que la incorporación de los datos cuantitativos obtenidos con la aplicación de algoritmos que extraen las mínimas diferencias estructurales que no son visibles para el ojo humano, han permitido discriminar entre núcleos benignos o cancerosos en diferentes muestras de tejido neoplásico <sup>11,12</sup>; discriminación esta que, de no ser detectada tempranamente, podría estar contribuyendo a la evolución de un proceso precursor de mayor daño para el epitelio.

Particularmente, la incorporación de datos cuantitativos referidos a posibles focos de displasia no queratinizante en un PIR, podría evitar la incesante progresión de eventos celulares, como el elevado índice mitótico y el incremento de atipias celulares, asociados con la propensión de la displasia que reafirma la naturaleza agresiva y comportamiento malignizante que preocupa en estas neoplasias <sup>13</sup>.

Algunos autores han señalado que de no ser fielmente detectadas la presencia de áreas de displasia moderada a severa y de atipias, con o sin queratinización

## **POLIMORFISMO VACUOLAR Y NUCLEAR EN EL TEJIDO EPITELIAL RINOSINUSAL CON DIAGNÓSTICO DE PAPILOMA INVERTIDO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO**

focal en la superficie epitelial del tumor, podrían ser interpretadas como focos de transformación maligna, en donde además el estroma puede pudiera estar comprometido <sup>14</sup>.

Otras características histopatológicas en el PIR que incluyen la hiperplasia epitelial, el sobre crecimiento epitelial del estroma y la afectación o invasión ósea, deberían ser características que no solo deben ser puesta en evidencia a nivel cualitativo, sino que deberían contar con la cuantificación o nivel valorativo, ya que de no ser confiablemente evaluadas podría comprometer también la salud del epitelio rinusinusal.

De todo lo antes expuesto, cabe destacar que la cuantificación de la arquitectura del epitelio neoplásico en el PIR, tendría un valor objetivo y complementario en el estudio histopatológico del comportamiento biológico y la predicción pronostica de la evolución clínica de estas neoplasias, al igual que en estudios de otras neoplasias, en donde variables morfométricos como son el diámetro mayor, el diámetro menor, su relación, así como el índice de contorno, la excentricidad y el índice de forma del núcleo y vacuolas, han sido asignadas

como parámetros indicativos del grado de agresividad, pronostico y recurrencia de varios tumores como los linfomas, el adenocarcinoma de próstata, el carcinoma renal y el cáncer de vejiga <sup>15,16,17,18</sup>. Resulta evidente que de igual manera podrían funcionar los parámetros morfométrico de C y R descritos en el presente trabajo, para un mejor diagnóstico de las neoplasias rinosinuales

### **CONCLUSIONES**

El análisis morfométrico del tejido de Papiloma Invertido Rinosinusal (PIR), revelo un polimorfismo nuclear y vacuolar que pudiera ser considerado, como valores de utilidad diagnóstico confiable y complementario, en términos de predecir el índice de agresividad y la evolución inherente a las neoplasias como el PIR. Dicha evaluación morfométrica resulto un método accesible, no sofisticado, para la valoración morfológica de la arquitectura celular y la configuración del patrón nuclear y vacuolar del tejido neoplásico.

## REFERENCIAS

1. Auer G, Askensten U, Ahrens O: Cytophotometry. *Human Pathology*. 1989;20(6): 518-527.1.
2. De Sousa A, Jiménez M, Urdaneta-Lafée N, Duran PA, Páez EL, De Sousa CA: Sinonasal Papillomas in a private referral otorhinolaryngology center: Review of 22-year experience. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2017; 68(5):251-61.
3. Buchwald C, Franzmann MB, Tos S: Sinonasal papillomas: a report of 82 cases in Copenhagen Country, including a longitudinal epidemiological and clinical study. *Laryngoscope*. 1995; 105:72-9.3.-
4. Garavello W, Gaini RM: Histopathology of routine nasal polypectomy specimens: a review of cases 2147. *Laryngoscope* 2005; 115(10):1866–18684.
5. Vorasubin N, Vira D, Suh JD, Bhuta S, Wang MB: Schneiderian Papillomas: comparative review of exophytic, oncocyte, and inverted types. *Am J Rhinol Allergy*. 2013;27(4):287-92.
6. Garavello W, Gaini RM. Incidence of inverted papilloma in recurrent nasal polyposis. *Laryngoscope* 2006;116(2):221-3.
7. Andrade G, Fujise L, Fernandes A, Azoubel R: Rhinosinusal Polyposis and Inverted Papilloma: A Morphometric Comparative Study. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2015 Jul;19(3):196-9.
8. Schwendy M, Unger RE, Bonn M, Parekh SH. Automated cell segmentation in FIJI® using the DRAQ5 nuclear dye. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(1):20–39.
9. Lawson W, Schlecht NF, Brandwein-Gensler M: The role of the human papillomavirus in the pathogenesis of Schneiderian inverted papillomas. An analytic overview of the evidence. *Head Neck Pathol*. 2008; 2:49-59.
10. Anari S, Carrie S. Sinonasal inverted papilloma: narrative review. *J Laryngol Otol*. 2010; 124:705-15.
11. De Sousa A, Jiménez M, De Sousa CA: Papiloma invertido rinosinusal en una niña de nueve años. *Pediatr*. 2016; 49(3):95-9.
12. Reger JF, Babin RW. Comparative aspects of cell fine structure in three cases of inverted, Schneiderian papilloma. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*. 1989;21(2):329-38.
13. S. Mirza, P.J. Bradley, A. Acharya, M. Stacey, N.S. Jones Sinonasal inverted papillomas: recurrence, and synchronous and metachronous malignancy. *J Laryngol Otol*, 2007; 121,857-864.
14. Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. ISBN 92 832 2417 5.
15. Thaina A Azevedo Tosta, Leonardo A Neves, Marcelo z do Nascimento. Segmentation methods of H&E-stained

**POLIMORFISMO VACUOLAR Y NUCLEAR EN EL TEJIDO EPITELIAL RINOSINUSAL CON DIAGNÓSTICO DE PAPILOMA INVERTIDO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO**

histological images of lymphoma. Informatic Medicine Unlocked. 2017;9: 35-43.

16. Bibbo M, Kim DH, Galera-Davidson H, di Loreto C, Dytch HE. Architectural, morphometric and photometric features and their relationship to the main subjective diagnostic clues in the grading of prostatic cancer. Anal Quant Cytol Histol. 1990;12(2):85–90.

17. De Sanctis PN, Concepcion NB, Tannenbaum M, Olsson C: Quantitative morphometry measurements of transitional cell bladder cancer nuclei as indicator of

tumor aggression. Urology. 1987;29(3):322-324.

18. Nielsen K, Colstrup H, Nilsson T, Gundersen HJ: Stereological estimates of nuclear volume correlated with histopathological grading and prognosis of bladder tumour. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1986;52(1):41-54.

**CORRESPONDENCIA**

Marco Álvarez. Dirección: Instituto Anatómico “José Izquierdo” Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Teléfono: 0212 6053449. Dirección de correo electrónico: alvarezmenator@gmail.com.