

Citología de mucosa bucal en diabéticos tipo II. Estudio morfológico y morfométrico con microscopía láser confocal

BUCCAL MUCOSA CYTOLOGY IN TYPE II DIABETICS. MORPHOLOGIC AND MORPHOMETRIC STUDY WITH CONFOCAL LASER MICROSCOPY

Ismael Ángel Rodríguez (1), Karina Grunberg (1), Carmen Carda (2), María Elsa Gómez de Ferraris (1)

1) Departamento de Biología Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

2) Departamento de Patología, Facultad de Odontología y Medicina, Universidad de Valencia, España.

Resumen

Se analizaron citologías de la mucosa bucal de pacientes con diabetes mellitus tipo II utilizando microscopía óptica y microscopía láser confocal (CLSM).

Se realizaron citologías exfoliativas de las zonas latero-ventral de lengua y mucosa yugal de 14 pacientes diabéticos y de 6 pacientes sin estos antecedentes (controles). Las muestras obtenidas con "cytobrush", fueron coloreadas con Papanicolau. En el análisis morfológico se calculó el índice eosinófilo (IE) y se obtuvieron imágenes con CLSM para la morfometría. Se registraron las variables: área del citoplasma (AC) y área del núcleo (AN), con las que se calculó la relación núcleo-citoplasma (N/C). El IE en los diabéticos presentó variaciones según las zonas, existiendo además marcada anofilia citoplasmática. Los valores del AN en los diabéticos fueron significativamente mayores que en el control, especialmente en lingual. El índice N/C de los diabéticos fue significativamente menor en la zona lingual comparado con el control. El análisis citológico y las alteraciones morfológicas y morfométricas observadas en este trabajo aportan datos de interés para el diagnóstico diferencial de las sialosis de origen diabético y alcohólico.

Palabras claves: Sialosis, Diabetes tipo II, Citología de mucosa bucal, Índice eosinófilo, Morfometría, Microscopía laser confocal.

Abstract

In this work we analyzed some cytological extensions of the buccal mucosa epithelium corresponding to type II diabetes patients using light and confocal laser microsocopy (CLSM). In all cases, exfoliative cytologies were taken from the cheek oral mucosa and tongue lateral side of 14 diabetic patients and 6 control patients without these antecedents. The obtained samples -cytobrush- were stained using Papanicolau technique. For the morphological analysis, the eosinophilic index (EI) was determined and CLSM images were taken for morphometry. Variables analyzed here were: cytoplasmic area (AC) and nuclear area (AN), and the ratio nucleus-cytoplasm (N/C) was calculated. In diabetic patients, EI varied according to the analyzed area, with a significant cytoplasmic amphophilia. AN parameters were significantly higher in diabetic patients than in controls, especially for lingual specimens. For the lingual region, N/C index was notably lower in diabetic patients as compared to controls. Cytological analysis and morphologic and morphometric alterations identified in this work reveal some crucial findings for the differential diagnosis of syalosis of alcoholic and diabetic origin.

Keywords: Syalosis, Type II diabetes, Buccal mucosa cytology, Eosinophilic index, Morphometry, Confocal laser microscopy.

1. Introducción

La diabetes mellitus (DM) tipo II, también denominada del adulto, afecta a la población de más de 40 años y actualmente, el

porcentaje de pacientes diabéticos tipo 2 representa entre el 80 y 90 % del total de enfermos diabéticos. Este tipo de diabetes es

uno de los factores etiológicos de la sialosis, patología de las glándulas salivales que en general clínicamente afecta a la glándula parótida (1,2). La sialosis diabética provoca cambios en la estructura y función del parénquima glandular, con modificaciones morfológicas y morfométricas específicas, que permiten diferenciarla de la sialosis alcohólica (3). Ambas sialosis se manifiestan con una hipofunción salival y xerostomía. Es conocido que la hiposalivación trae aparejado cambios tanto a nivel de los tejidos duros dentarios como en la mucosa bucal. En los diabéticos, las manifestaciones bucales más frecuentes incluyen: candidiasis, enfermedad periodontal, caries, xerostomía y sialomegalia (4).

La citología bucal actualmente ha ganado en importancia al permitir identificar en forma temprana cambios celulares en la mucosa bucal de apariencia clínicamente sana. Se trata de una técnica sencilla, no agresiva y bien aceptada por los pacientes, que permite interpretar los caracteres de las células que se descaman natural o artificialmente, facilitando el diagnóstico al ofrecer, en general, cuadros citológicos específicos (5,6). Estas muestras pueden ser analizadas a través de distintos métodos amplificantes como lo son la microscopía óptica y laser confocal, que permiten registrar o valorar distintas características de las células en lo que respecta a su estructura y morfología (7). A pesar de las ventajas mencionadas anteriormente la citología bucal ha sido escasamente utilizada para analizar los cambios en las células epiteliales de diabéticos tipo II (8,9). Por esta razón el objetivo de este trabajo fue analizar citologías de la mucosa bucal de pacientes con diabetes tipo II mediante microscopía óptica y confocal, con el propósito de verificar los posibles cambios estructurales y morfométricos atribuibles a esta patología y la posibilidad de utilizar estos resultados como un aporte más para el diagnóstico diferencial entre las sialosis de distinta etiología.

2. Materiales y métodos

2.1 Análisis morfológico

Se utilizaron un total de 40 muestras provenientes de 14 pacientes diabéticos tipo II (con diagnóstico clínico y de laboratorio) y de 6 pacientes sin estos antecedentes como controles, todos voluntarios (previo

consentimiento informado) y con un rango de edad entre 45 a 60 años. Se excluyeron pacientes con antecedentes alcohólicos y fumadores. Con un cepillo citobrush, se tomaron frotis de mucosa oral de dos zonas: yugal (próximo a la desembocadura del conducto parotídeo) y latero-ventral posterior de lengua. Realizado el extendido en un portaobjeto, las células se fijaron con Citofix spray, posteriormente las muestras fueron sometidas a tratamientos sistematizados de alcoholes y tinción de Papanicolau (Hematoxilina, Orange G y EA-31). Para obtener el índice eosinófilo (IE), previamente se identificaron células que según su apetencia tintorial se clasificaron en acidófilas, basófilas y anfófilas (captación de colorantes básicos y ácidos del citoplasma en forma simultánea), y se calculó el porcentaje de cada grupo celular contando al azar un total de 100 células en cada muestra y por cada zona (yugal y lingual respectivamente) utilizando un microscopio óptico Leitz Laborlux 12 y un objetivo de 40X (Leica, Barcelona, España).

2.2 Análisis morfométrico

Para el análisis morfométrico, las imágenes celulares de los extendidos bucales, se capturaron con un Microscopio de Barrido Láser Confocal Zeiss 5 Pascal (CLSM) y fueron analizadas con un programa LSM5 Image Browser. Las variables registradas para la morfometría fueron: área del citoplasma (AC) y área del núcleo (AN), con las que se calculó la relación núcleo-citoplasma (N/C). Los datos estadísticos se analizaron por prueba de diferencias de medias DGC (10) con un Programa Infostat (2003) Versión 2P1.

3. Resultados

3.1 Análisis morfológico

Al analizar con microscopía óptica los extendidos bucales del grupo diabético y control se observó en ambos la presencia de células acidófilas y basófilas (Fig. 1). Además, se observaron abundantes células anfófilas (Fig. 2) en el grupo diabético y sólo en el control de la zona lingual. El IE fue mayor en el grupo diabético de la zona lingual con respecto al control, aunque no se observaron diferencias significativas. Al analizar la zona yugal se observó en el grupo diabético un porcentaje menor del IE que fue significativo con respecto al control (Fig. 3).

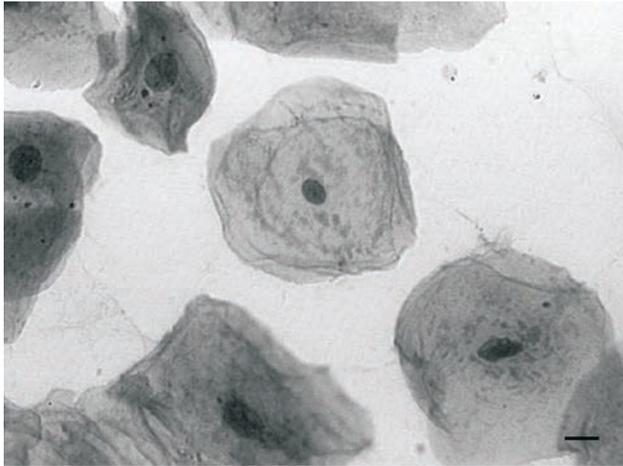


Fig 1. Se observa con microscopía óptica (40X) las células acidófilas y basófilas presente en todas las muestras citológicas de los grupos experimentales. Escala 20µm

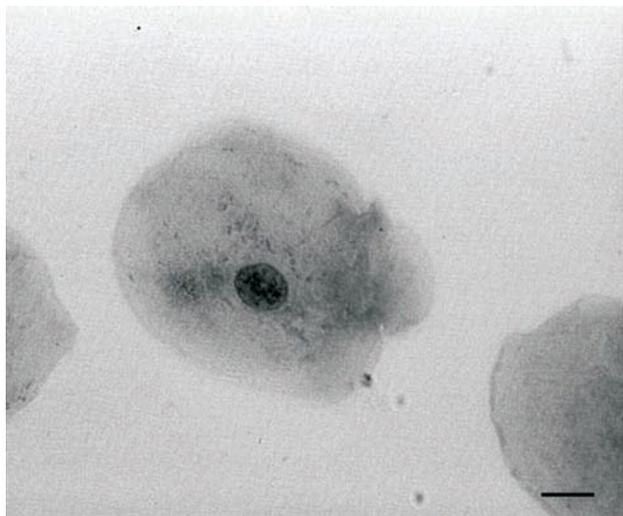


Fig 2. Se muestra con microscopía óptica (40X) una célula anfófila de un extendido del grupo diabético tipo II. Escala 20µm

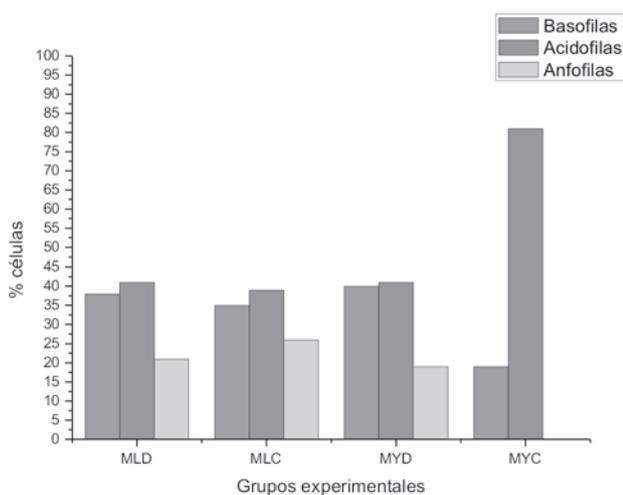


Figura 3. Se exponen los valores del índice eosinófilo de las células de las zonas mucosa lingual diabético (MLD), mucosa lingual control (MLC), mucosa yugal diabético (MYD) y mucosa yugal control (MYC) expresados todos ellos en porcentajes de células.

Con la microscopía laser confocal, las células eosinófilas pudieron ser fácilmente identificadas sobre un fondo oscuro al mostrar una fluorescencia rojiza cuando excitan el láser (Fig. 4).

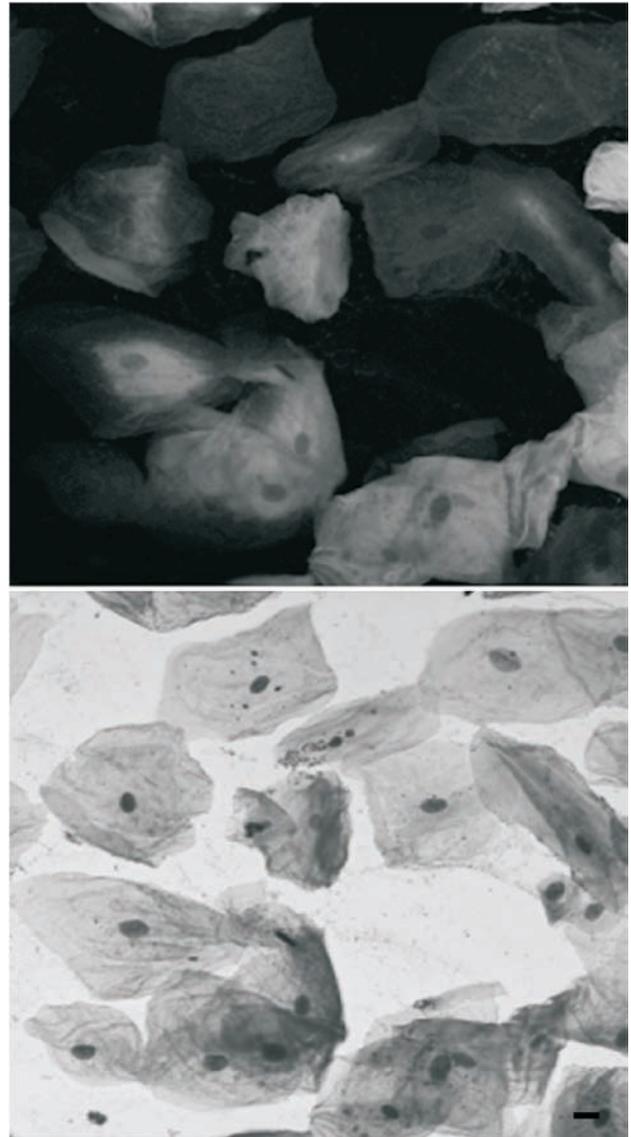


Fig 4. Se observan las células acidófilas en rojo brillante sobre fondo oscuro y anfófilas sobre fondo claro con CLSM. Escala 20µm

3.2 Análisis morfométrico

La morfometría demostró en general que los valores del área nuclear (AN) (Fig. 5) y área citoplasmática (AC) (Fig. 6) en los diabéticos en las distintas zonas de la mucosa analizada (mucosa yugal y lingual de diabéticos) fueron superiores comparado a los controles (mucosa yugal y lingual control), especialmente en lingual, donde las diferencias fueron estadísticamente significativas (* $p < 0,05$). El análisis de la relación núcleo/citoplasma de la

mucosa yugal mostró que esta fue mayor en el grupo diabético, aunque no significativa. Al evaluar la mucosa lingual la relación núcleo/citoplasma fue menor en los pacientes diabéticos y la diferencia fue estadísticamente significativas (* $p < 0,05$) (Fig. 7).

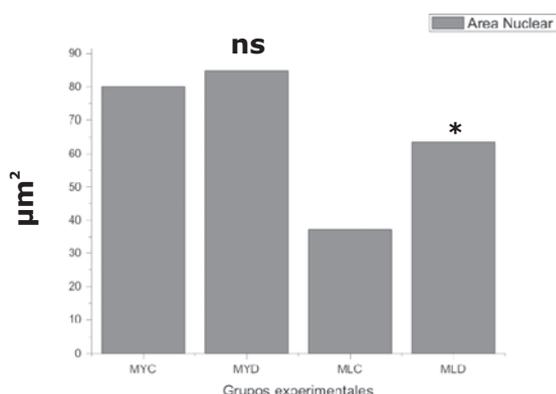


Figura 5. Gráfico que muestra los valores del área nuclear (μm^2) de las células de la mucosa yugal control (MYC), de la mucosa yugal diabético (MYD), mucosa lingual control (MLC) y mucosa lingual diabético (MLD) (ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$).

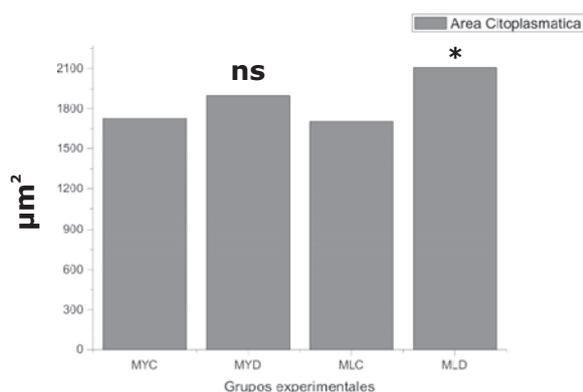


Figura 6. Gráfico que muestra los valores del área citoplasmática (μm^2) de las células de la mucosa yugal control (MYC), de la mucosa yugal diabético (MYD), mucosa lingual control (MLC) y mucosa lingual diabético (MLD). (ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$).

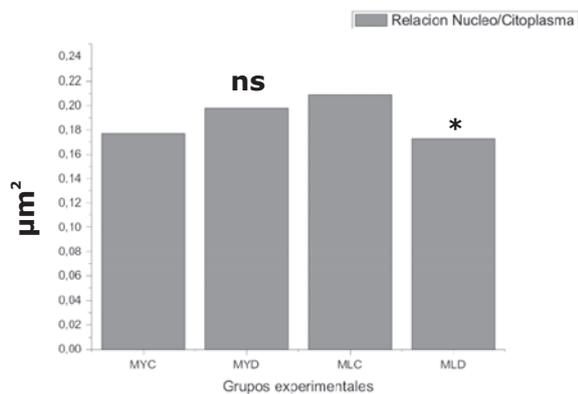


Figura 7. Gráfico que muestra los valores de la relación núcleo/citoplasma de las células de la mucosa yugal control (MYC), mucosa yugal diabético (MYD), mucosa lingual control (MLC) y mucosa lingual diabético (MLD). (ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$).

4. Discusión

La diabetes tipo II no sólo afecta distintos órganos, sino que es una de las causas etiológicas de la sialosis, patología de las glándulas salivales que se caracteriza por modificaciones morfológicas y funcionales que se traducen en cambios del flujo y composición salival (2,3).

La citología bucal al ser una técnica incruenta es bien aceptada por los pacientes y es en general uno de los métodos auxiliares del diagnóstico clínico de distintas patologías (5,6). El análisis de extendidos de mucosa bucal de pacientes diabéticos tipo II, abre la posibilidad de disponer de indicadores que permitan confirmar el diagnóstico de las sialosis de distinta etiología. Los resultados de nuestro trabajo permitieron confirmar que la diabetes tipo II origina distintas alteraciones a nivel de las células de la mucosa bucal. Cuando analizamos el índice eosinófilo (IE) observamos que en la zona lingual fue levemente mayor que el control, pero no significativo, posiblemente porque como se describió en el control lingual encontramos un 26% de células anfófilas, las que están en relación con procesos inflamatorios. En este sentido Hassan et al. (11) encontraron un incremento significativo de inflamación en el dorso de lengua del grupo diabético respecto a la zona yugal y al grupo control, postulando que se debería a la disminución del flujo salival por hipofunción glandular. A nuestro juicio ello podría deberse a que el órgano lingual está más expuesto por su función masticatoria a ser asiento de inflamación, sobre todo en el borde lateral posterior. En yugal el IE fue significativamente menor en un 40% respecto al grupo control que presentó un 81% de células eosinófilas, relacionado con una mayor maduración celular. Por otra parte Cano et al.(5) en frotis linguales de diabéticos tipo II con valores de glucosa mayores a 200mg/dL, citan en sus hallazgos una menor cantidad de células superficiales y profundas y una mayor cantidad de células intermedias respecto al control, proponiendo que la mayor cantidad de células intermedias y la menor cantidad de células profundas es debido a una alteración del metabolismo y la maduración celular.

Por otra parte, el análisis morfométrico demostró que la diabetes tipo II produce cambios de volumen en las células epiteliales de la mucosa bucal y que este varía en las distintas zonas analizadas. Los valores morfométricos del área nuclear (AN) y del área citoplasmática (AC) en las células de los pacientes diabéticos, fueron superiores comparado a los controles, especialmente la zona lingual, donde las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Alberti et al.(8) y Shareef et al.(9). Por otra parte, en nuestro estudio la relación núcleo/citoplasma si bien esta aumentada en la zona de la mucosa yugal de diabéticos, esta diferencia no fue significativa, mientras que en la zona lingual se observó una disminución que es estadísticamente significativa con respecto al control, valores estos que están en coincidencia con lo descrito por Alberti et al. (8) y Shareef et al. (9). Por su parte Ogden et al. (6) y Ramaesh et al. (12) destacan que los cambios citomorfométricos observados en células de la mucosa bucal de fumadores son similares a los descritos en los diabéticos. Zimmermann and Zimmermann (13) destaca que en pacientes fumadores se encontraron importante número de células no queratinizadas del estrato parabasal las cuales eran relativamente pequeñas y con núcleos grandes. Estos hallazgos serían comparables a nuestros resultados donde la relación núcleo/citoplasma esta disminuida, por el mayor área nuclear que resultó estadísticamente significativa a nivel lingual en los pacientes diabéticos. Maeda et al.(14) destacan que estos importantes cambios cualitativos y cuantitativos encontrados en mucosa bucal de pacientes diabéticos, podrían ser confundidos con criterios de malignidad, aunque esto puede ser diferenciado de este por la disminución de la relación núcleo/citoplasma y la uniformidad en la configuración nuclear.

En síntesis, nuestros resultados apuntan a determinar un patrón celular de la mucosa bucal de pacientes diabéticos tipo II, como un aporte más para el diagnóstico diferencial entre las sialosis de etiología diabética y alcohólica.

Financiado por: Secyt UNC Res 159/09

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Darío Sánchez, del servicio de cirugía maxilofacial del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, por su generoso aporte al permitirnos obtener parte de las muestras citológicas de este estudio.

Referencias

1. Bohl L, Carda C, Gómez de Ferraris ME, Carranza M (2008) Morphometric analysis of the parotid gland affected by alcoholic sialosis. *J Oral Pathol & Med* 37(8): 499-503.
2. Carda C, Mosquera L, Loreda N, Salom L, Peydró A, Gómez de Ferraris ME (2006) Structural and functional salivary disorders in type II diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11: 309-314.
3. Carda C, Carranza M, Arriaga A, Díaz A, Peydró A, Ferraris ME (2005) Structural differences between alcoholic and diabetic parotid sialosis. *Oral Medicine and Pathology* 10: 309-314.
4. García ER, Aranda RS, Cruz Mérida S, Mondragón Padilla A (2006) Frecuencia de manifestaciones bucales en pacientes diabéticos tipo 2 de una unidad de Medicina Familiar del IMSS. *Rev Cienc Clín* 7(2): 81-88.
5. Cano Cabeza CG, Ovalle Castro JW, Zintzung López LE (1999) Frotis lingual como auxiliar en el diagnóstico de pacientes diabéticos tipo II. *Rev. ADM* LVI (5): 191-195.
6. Ogden GR, Cowpe JG, Wight AJ (1997) Oral exfoliative cytology: review of methods of assessment. *J Oral Pathol Med* 26: 201-205.
7. Freitas MD, Garcia-Garcia A, Carneiro JLM, Crespo-Abeleira A, Gándara Rey J (2003) Citología esfoliativa da mucosa oral comparacao citomorfométrica da mucosa oral normal em pacientes com cancer oral e individuos sadios. *Revista Brasileira de Patología Oral* 2, 4:2-6.
8. Alberti S, Taveira L, Spadella C, Francischone T, Cestarim T (2003) Exfoliative cytology of the oral mucosa in type II diabetic patients: morphology and cytomorphometry. *J Oral Pathol Med* 32: 538-543.
9. Shareef BT, Ang KT, Venkatesh RN (2008) Qualitative and quantitative exfoliative cytology of normal oral mucosa in type 2 diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13(11): 693-696.
10. Rienzo JA, Guzmán AW, Casanoves F (2001) A multiple comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological and Environment Statistics* 7 (1): 146.

11. Hassan HJ, Nooshin M, Afsaneh R (2008) Evaluation of oral mucosa epithelium in type II diabetic patients by an exfoliative cytology method. *J Oral Science* 50 (3): 335-340.

12. Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO (1999) The effect of tobacco smoking and of betel chewing with tobacco on the buccal mucosa: a cytomorphometric analysis. *J Oral Pathol Med.* 28 (9): 385-388.

13. Zimmermann ER, Zimmermann AL (1965) Effects of race, age, smoking habits, oral and systemic disease on oral exfoliative cytology. *J Dent Res* 44:627-631.

14. Maeda MY, Di Loreto C, Shirata NK, Shih LW, Cavaliere MJ, Longatto Filho A, Alves VA (1997) Image analysis of nuclear/cytoplasmic ratio in cervical smears to discriminate three grades of cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Cytol* 41(3): 744-748.