

ESTUDIO DEL ESTROMA DEL CARCINOMA EPITELIAL/MIOEPITELIAL DE GLÁNDULA PARÓTIDA CON MICROSCOPIOS FOTÓNICO, LASER CONFOCAL Y DE POLARIZACIÓN EN PREPARACIONES COLOREADAS CON HEMATOXILINA/ EOSINA Y (YELLOW) Y PICROSIRIUS RED

Autores: María Araceli Gomez Rosso¹, María Elena Samar Romani², Rodolfo Esteban Avila Uliarte³, Javier Elías Fernández Calderón⁴, Ismael Bernardo Fonseca Acosta⁵

¹Odontóloga. Departamento de Biología Bucal. Facultad de Odontología. ²Doctora en Medicina y Cirugía. Departamento de Biología Bucal. Facultad de Odontología.

³Doctor en Medicina y Cirugía. Facultad de Ciencias Médicas. ⁴Doctor en Odontología. Departamento de Biología Bucal. Facultad de Odontología. Doctor en Medicina y Cirugía. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Provincia de Córdoba. República Argentina.

Subsidio Secretaría de Ciencia y Tecnología 05/H575 período 2018-2021. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina

e-mail: samarcongreso@gmail.com

Resumen

Introducción: Diversos autores analizaron el estroma y su papel en la estimulación o inhibición de la progresión tumoral en diferentes tipos de cánceres. Observaron que el colágeno Tipo I reduce la adhesión celular y aumenta la proliferación en algunos cánceres.

Objetivo: Mostrar nuestra experiencia en el estudio del estroma del carcinoma epitelial/mioepitelial (CEP) de parótida con H/E Y (yellow) y Picrosirius red observado con microscopios fotónico, confocal de barrido y de polarización para determinar el tipo de colágeno y sus implicancias tumorales.

Material y métodos: Cortes histológicos de CEP de parótida se colorearon con H/E Y y con la tinción de Picrosirius red y analizaron con microscopios fotónico, confocal y de polarización.

Resultados y discusión: En cortes coloreados con H/E Y se observó un estroma con colágeno eosinofílico. Con microscopio confocal el colágeno presentó intensa fluorescencia roja. Con polarización el estroma tenía birrefringencia naranja y rojiza debida a colágeno Tipo I.

Conclusiones: La combinación de los tres microscopios permite identificar colágeno I y III en tumores salivales benignos y malignos.

En el CEP predomina el colágeno I, propio de las neoplasias malignas.

Si bien su grado de malignidad es bajo, se debe controlar a los pacientes por recurrencias y metástasis.

Introducción

El carcinoma epitelial/mioepitelial de glándulas salivales es un raro tumor epitelial maligno bifásico de bajo grado. Su estructura histológica muestra formaciones ductales revestidas por una doble capa de células, una interna de epitelocitos y una externa de mioepitelocitos. La variante doble claro se caracteriza por la presencia de mioepitelocitos claros lumbinales y adlumbinales. Estas estructuras ductales están delimitadas por un estroma de tejido conectivo denso (1).

En el terreno de la tumorigénesis, diferentes autores analizaron el estroma y su papel en la estimulación o inhibición de la progresión tumoral en diferentes tipos de cánceres como los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (34-35). Cambios en la composición y estructura de las proteínas de la matriz extracelular y receptores de la superficie celular se asocian con adhesión disfuncional y comportamiento invasivo de las células tumorales (37). Koenig et al (38) demostraron que el colágeno Tipo I reduce la adhesión celular y aumenta la proliferación tumoral en el cáncer pancreático. Similares resultados fueron reportados por Araujo et al (39) en el carcinoma-ex adenoma pleomórfico de glándulas salivales.

Sin embargo, el estroma ha sido escasamente investigado en la patología tumoral de las glándulas salivales humanas.

En trabajos previos nosotros examinamos con microscopía de polarización cortes histológicos de tumores salivales benignos y malignos coloreados con Picrosirius red,

lo que nos permitió demostrar las diferencias en la producción de colágeno Tipo I y III entre los diferentes tumores. La birrefringencia del colágeno resultó diferente en el estroma de los tumores malignos, con predominio de colágeno I, en comparación con el estroma de los benignos, con predominio de colágeno III (42-44).

Por otro lado, basándonos en la propiedad autofluorescente de la Eosina Y (yellow), que permite identificar con el microscopio laser confocal estructuras eosinofílicas que a veces son poco visibles al microscopio fotónico, analizamos con microscopía fotónica y laser confocal de barrido el estroma de este tumor para demostrar el valor de la fluorescencia emitida por la Eosina Y (yellow) en su descripción estructural. (6, *)

Objetivos

El objetivo del presente trabajo fue mostrar nuestra experiencia en el estudio del estroma de dos casos de carcinoma epitelial/mioepitelial de glándulas salivales con las tinciones de H/E Y (yellow) y Picrosirius red en cortes histológicos observados con microscopios fotónico, laser confocal de barrido y de polarización para determinar la presencia y tipo de colágeno y sus implicancias tumorales.

Materiales y métodos

Cortes histológicos de 5 μm de espesor de dos casos de carcinoma epitelial/mioepitelial de glándula parótida, uno de ellos variante doble claro, incluidos en parafinas se colorearon con H/E Y (yellow) como protocolo de rutina y con la tinción modificada de Picrosirius red. Las imágenes de las preparaciones histológicas coloreadas con H/E Y (yellow) fueron obtenidas por medio de un microscopio óptico de campo claro o fotónico y un microscopio laser confocal. Este microscopio combina partes de un microscopio óptico, al que se adapta un equipo fluorescente, con un sistema de barrido en el que se utiliza un rayo láser. Por medio de una computadora se registran los datos y se obtiene así una "sección óptica" muy delgada, que aparece como una imagen bidimensional en un monitor de alta resolución. Este microscopio detecta compuestos autofluorescentes o inmunomarcados. En la presente investigación se utilizó el microscopio confocal espectral FV1000 (Olympus, Japan) perteneciente al Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), configurado para la adquisición de la fluorescencia naranja/roja de la Eosina obtenida entre los 555 a los 655 nm. La eosina fue excitada a 543 nm

empleando el laser gaseoso de He-Ne. Las imágenes de 1024x1024 pixeles fueron obtenidas con las lentes objetivo de 20 y 60X PLAPON con una resolución del pixel representando unos 100nm de la muestra y una velocidad de barrido de 10µs/pixel. El mismo laser fue utilizado para adquirir la imagen de transmisión del mismo campo de la imagen de fluorescencia.

Los cortes histológicos coloreados con Picrosirius red se observaron con el microscopio de polarización NIKON ECLIPSE LV 100POL de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, para diferenciar colágeno Tipo I (birrefringencia naranja amarillento o naranja y rojo) del colágeno Tipo III (birrefringencia verde o amarillo verdoso) en el estroma neoplásico (Coleman).

Resultados y discusión

Microscopia fotónica:

Caso 1: El tumor mostró un patrón multinodular con nidos tumorales constituidos por estructuras tubulares delimitadas por células acidófilas lumbinales cuboideas y células claras adlumbinales (Figura 1).

Caso 2: Se identificó una variante doble claro com mioepiteliocitos claros lumbinales y adlumbinales.

En cortes coloreados con H/E Y (yellow) se observó en los dos casos un estroma con predominio de colágeno de apetencia tintorial eosinofílica.

Microscopia laser confocal: A diferencia de las imágenes observadas con el microscopio fotónico, con H/E Y (yellow) se identificaron estructuras con una intensa fluorescencia roja, correspondientes al componente colágeno de la matriz extracelular (Figura 2).

Microscopia de polarización: la matriz extracelular mostró birrefringencia naranja y rojiza indicativa de la presencia de colágeno Tipo I (Figura 3).

Con técnicas de rutina como H/E, tricrómico de Masson o tricrómico de Mallory entre otros no se puede demostrar selectivamente los distintos tipos de colágeno (Aparma y Charu 2010, Coleman 2011).

Las preparaciones histológicas de este trabajo, coloreadas con H/E Y (yellow), se estudiaron con microscopio óptico fotónico y microscopio laser confocal. En las imágenes histológicas observadas en el microscopio fotónico pueden aparecer por debajo y por arriba del plano del foco, estructuras desenfocadas cuyos contornos interfieren con la imagen obtenida. El microscopio confocal nos permite eliminar a

través de uno de sus diafragmas la luz que proviene de los planos superior e inferior, aumentando la claridad y definición de la imagen, con una resolución 30% superior a la del microscopio común.

Además, el estudio de la biopatología del colágeno logró un avance significativo con las técnicas de Picrosiriu red, como informan Junqueira et al (1978, 1979). Con Picrosirius red/polarización, el colágeno Tipo I y III muestra birrefringencia debido a que sus unidades submicroscópicas se orientan en dirección al eje de la fibra.

Conclusiones

La combinación de la microscopía fotónica, confocal y de polarización permiten identificar con precisión el colágeno Tipo I y III en el estroma de los tumores salivales benignos y malignos.

El tumor maligno analizado en este trabajo presenta un estroma con predominio de colágeno Tipo I, propio de las neoplasias malignas.

Si bien se considera que el carcinoma epitelial/mioepitelial es un tumor de bajo grado de malignidad se debe realizar el seguimiento de los pacientes ya que se informaron casos de recurrencias y metástasis.

Bibliografía

1. Samar ME, Ávila RE, Fernández JE. Glosario de Histología y Embriología Oral clínicamente Orientado. Adaptado a la nueva terminología internacional. 4ª Ed. Córdoba: Samar Ediciones; 2020.
2. Astekar M, Metgud R, Sharma A, Soni A. Hidden keys in stroma: unlocking the tumor progression. J Oral Maxillofac Pathol. 2013; 17: 82-88.
3. Ito FA, Jacks J, Vargas JA, Lopes MA. Histopathological findings of pleomorphic adenoma of salivary glands. Med Oral Pathol Oral Cir Bucal. 2009; 14: E57-61.
4. Koenig A, Mueller C, Hasel C. Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. Cancer Res. 2006; 66: 4662-4671.
5. Araujo VC, Demasi AP, Furuse C, Altemani A, Alves VA, Freitas LL, Araujo NS. Collagen type I may influence the expression of E-cadherin and beta-catenin in carcinoma ex pleomorphic adenoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2009; 17: 312-318.

6. Avila RE, Reyes VC, Samar ME. Histological collagen study of normal and tumoral stroma of human salivary glands. International Proceedings. Medimond. Monduzzi Editore International Proceedings Division. Bologna (Italia). 2012; 81-86.
7. Samar ME, Avila RE, Asis OG, Fonseca I, Corball A. Identification of type I and III collagen by picrosirius red/polarization of tumoral salivary stroma. Int J Odontostomatol. 2012; 6: 59-64.
8. Avila RE, Samar ME, Gorodner A, Reyes V. Microscopia de polarización y tumores de glándulas salivales humanas. Oral. 2014; 49: 1155-1158.
9. Sánchez González J, Trejo Bahena NI, Vázquez Moctezul I, Martínez Martínez CM, Ortega Rangel JA. Fluorescencia de la eosina captada por microscopía confocal en cortes histológicos de piel. Actas Dermatol. 2008; 7: 41-47.
10. Gomez Rosso MA, Samar ME, Ávila RE, Fernández JE. Estudio de la fluorescencia selectiva del estroma del adenoma pleomórfico salival con microscopio laser confocal en preparaciones coloreadas con Hematoxilina/ Eosina Y (yellow). Rev Fac Odont. 2019; 29(3): 13-17.
11. Coleman R. Picrosirius red staining revisited. Acta Histochem. 2011; 113:231-233.
12. Aparma V, Charu S. Evaluation of collagen indifferent grades of oral squamous cell carcinoma by using the Picrosirius red stain- a histochemical study. J Clin Diag Res. 2010; 4: 3444-3449.
13. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. Arch Histol Jpn. 1978; 41(3): 264-74.
14. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Pricosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem J. 1979; 11(4): 447-55.

Cumplimientos de estándares éticos: Este trabajo es parte del proyecto “La matriz extracelular y el componente mioepitelial de los tumores epiteliales de glándulas salivales humanas: estudio estructural, histoquímico e inmunohistoquímico” aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina (Registro 188/14). Subsidio

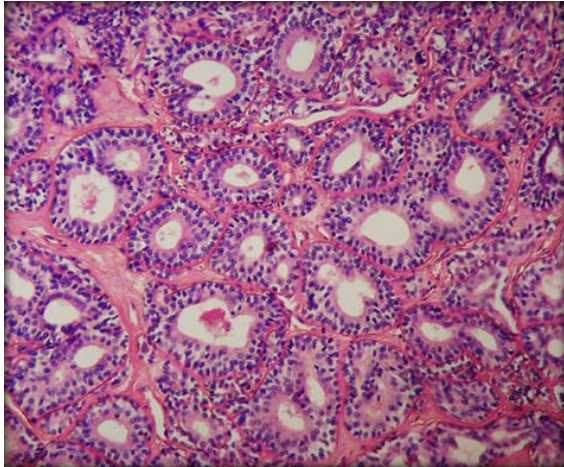


Figura 1: Carcinoma epitelial/mioepitelial de glándula parótida. Microscopia de campo claro o fotónica. Se observa el colágeno eosinofílico entre las estructuras ductales Tinción H/E Y (yellow). 100x.

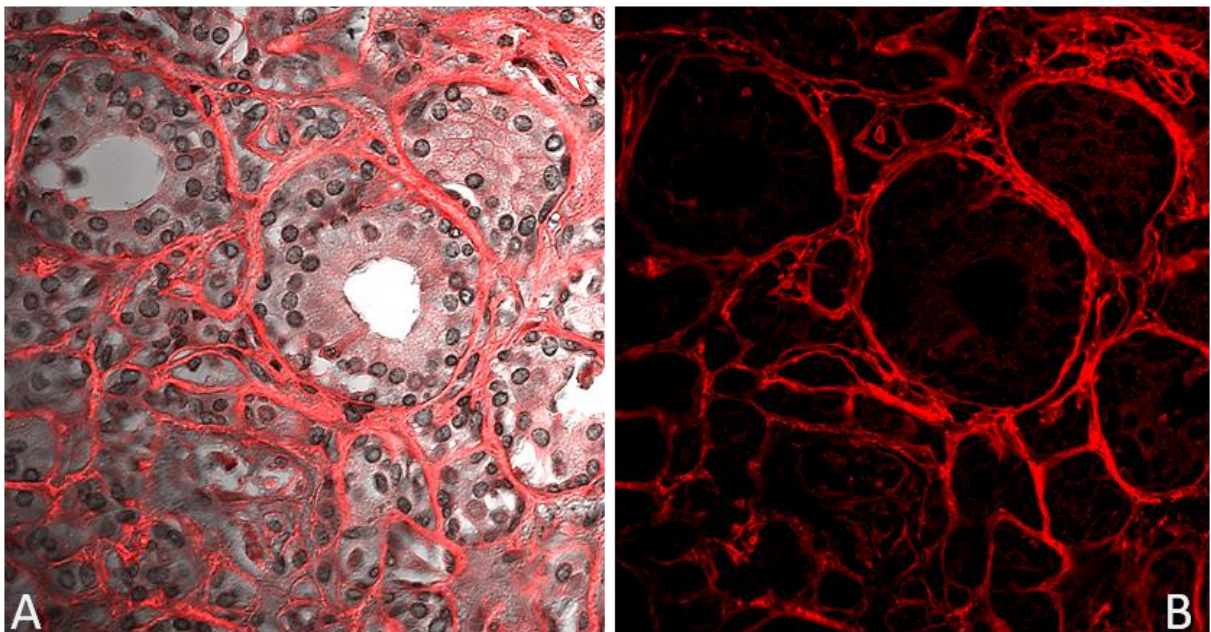


Figura 2: Carcinoma epitelial/mioepitelial de glándula parótida. Se observa el estroma colágeno con intensa fluorescencia roja. Microscopio laser de barrido confocal. Tinción H/E. Imagen A: Superposición de la imagen de transmisión y de la imagen de fluorescencia. B: Imagen de fluorescencia. Tinción H/E Y (yellow). 400x.

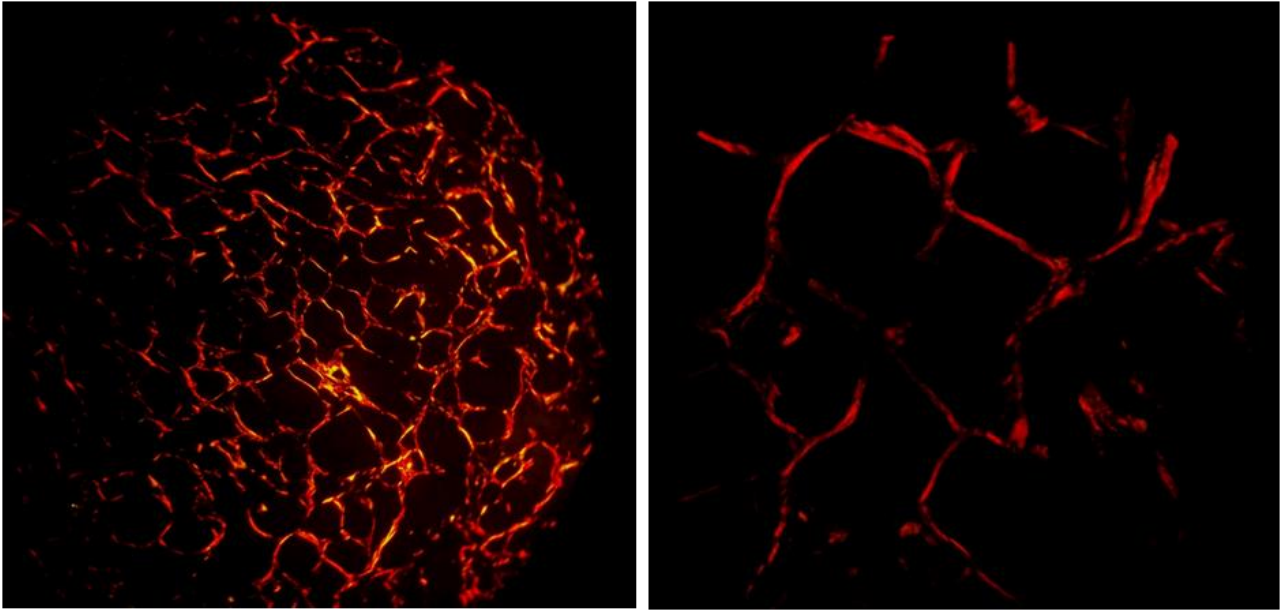


Figura 3: Carcinoma epitelial/mioepitelial de glándula parótida. Se observa el estroma colágeno de Tipo I. Microscopio de luz polarizada. Tinción Picrosirius red.