

Mioepitelioma de parótida: estudio histológico, histoquímico e inmunohistoquímico

Rodolfo Esteban Ávila, María Elena Samar, Ismael Fonseca, Ricardo Ferraris

Programa de incentivos a docentes-investigadores. Secretaría de Políticas Universitarias. Ministerio de Educación de la Nación. República Argentina. Cátedra II de Biología Celular, Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Pabellón de Biología Celular s/n. Ciudad Universitaria. (5000) Córdoba. República Argentina.
avilainfo@gmail.com

Resumen

Los tumores de glándulas salivares constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias con gran diversidad histomorfológica. El mioepitelioma es una neoplasia muy rara que corresponde a menos del 1% de todos los tumores de estos órganos. Compuesto totalmente por células mioepiteliales, fue considerado como un subtipo de adenoma pleomorfo hasta 1991, fecha en que la Organización Mundial de la Salud lo clasificó como una entidad independiente. El objetivo de esta comunicación es presentar un caso de mioepitelioma de parótida en una mujer de 60 años y analizar sus características histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas para contribuir a su diagnóstico diferencial, ya que debido a su baja frecuencia y la multiplicidad de su histopatología, este tumor ofrece dificultades para su diagnóstico y clasificación. En el caso presentado predominan las células epitelioides y células claras en pequeña cantidad, con un patrón histológico sólido donde se disponen áreas reticulares rodeados por abundante estroma mucoso, de manera esporádica. El estudio inmunohistoquímico demostró una fuerte marcación del citoplasma de las células mioepiteliales tumorales frente a CK17, vimentina y actina específica muscular. En cuanto a S100, se observó una reacción positiva moderada a fuerte en el citoplasma de las células tumorales y una intensa marcación a nivel de los núcleos. A partir de estos resultados y el diagnóstico diferencial con otros tumores concluimos que las técnicas estructurales, histoquímicas e inmunohistoquímicas constituyen herramientas útiles que permiten diferenciar el mioepitelioma de otros tumores benignos y malignos de glándulas salivares.

INTRODUCCIÓN

En las glándulas salivares se identifican dos linajes celulares, uno epitelial luminal y otro mioepitelial, adluminal (Bilal et al., 2003, *J Histochem Cytochem* 5: 133-139). Los acinos, unidades secretoras de las glándulas salivares, están constituidos por diferentes tipos celulares luminales que, según la glándula, predominan unos u otros. Estas células son serosas, mucosas y oncocitos. Las células mioepiteliales o en cesta de Boll se localizan entre la membrana basal del acino y las membranas plasmáticas de las células secretoras luminales a las cuales revisten. También se localizan en los conductos intercalares. (revisado en Samar et al., 2008, *Histología y Embriología Clínicamente Orientadas* 2º ed., Ed SeisC, Córdoba, Argentina).

Las células mioepiteliales fueron observadas por Hardy y Kramer (1998, *SADJ* 53: 371-375) mediante inmunomarcación para actina también en la porción proximal de los conductos estriados de la glándula submaxilar. Son células epiteliales con funciones contráctiles que contribuyen a expulsar la secreción de las células serosas y mucosas hacia los conductos. Su citoplasma contiene dos proteínas contráctiles, la actina y la miosina. (Redmann, 1994, *Microsc Res Tech* 27: 25-45; Samar et al., 2008, *Patología -Rev Latinoamer Mx-* 46: 276-283). Con forma estrellada y largas prolongaciones, estas células se extienden alrededor de las células secretoras a manera de canastillo, siendo difíciles de identificar en cortes histológicos coloreados con técnicas de rutina. Con microscopía óptica se ponen de manifiesto sólo aplicando métodos inmunohistoquímicos o fluorescentes. (Samar et al., 2008, *Histología y Embriología Clínicamente Orientadas*, 2º ed., Ed SeisC, Córdoba, Argentina; Samar et al., 2008, *Patología -Rev Latinoamer Mx-* 46: 276-283). Ogawa (2003, *Prog Histochem Cytochem* 38: 343-426) clasificó a los marcadores de estas células en tres tipos. En el tipo 1 incluyó a proteínas marcadoras de músculo liso tales como α -SMA y calponina básica, que se expresan en las células mioepiteliales y la vasculatura mesenquimática. El 2º tipo se expresa en las células ductales y mioepiteliales y corresponde a citoqueratinas 14, 5 y 17, $\alpha 1 \beta 1$ integrina y metalotioneína. Vimentina corresponde al grupo 3 y se expresa en las células mioepiteliales, mesenquimáticas y algunas ductales. Este autor señaló además que las células mioepiteliales presentes en los tumores de las glándulas salivares se pueden identificar con métodos inmunohistoquímicos para α -SMA.

Por otro lado, los tumores de glándulas salivares constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias con gran diversidad histomorfológica. El mioepitelioma es una forma muy rara de tumor de glándulas salivares, que corresponde a menos del 1% de todos los tumores de estos órganos (Acikalun et al., 2005, *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* 14: 127-130; Bakshi et al., 2007, *J Laryngol Otol* 121: e13; Testa et al., 2005, *Acta Oto Laryngol* 125: 664-666), localizado más frecuentemente en parótida (40%) y paladar duro (21%) (Astarci et al., 2009, *Oral Maxillofac Surg* 13: 45-48). Menos frecuentemente, este tumor se desarrolla en pulmón y mama (Gaio et al., 2009, *Auris Nasus Larynx* 36: 496-500). Compuesto totalmente por células mioepiteliales, fue considerado como un subtipo de adenoma pleomorfo hasta 1991, fecha en que la Organización Mundial de la Salud lo clasificó como una entidad independiente (Seifert y Sobin, 1991, *Histological typing of salivary gland tumours. World Health Organization International Histological Classification of Tumours*, 2º edición Berlín, Alemania, Springer-Verlag).

El objetivo de esta comunicación es presentar un caso de mioepitelioma de glándula parótida en una mujer de 60 años y analizar sus características histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímicas para contribuir a su diagnóstico diferencial, ya que como mencionan Dardick et al. (1995, *Ultrastruct Pathol* 19: 335-345), debido a su baja frecuencia y la multiplicidad de su histopatología, este tumor ofrece dificultades para su diagnóstico y clasificación.

MATERIAL Y METODOS

Material: Formación tumoral de parótida izquierda en mujer de 60 años, de varios meses de evolución, macroscópicamente formada por una masa ovoide de 5x3x2 cm, con superficie ligeramente lobulada. La superficie de corte era multinodular, color blanco amarillento con focos de hemorragia.

Metodología: Los cortes histológicos seriados del material incluido en parafina se colorearon con H/E, tricrómicos de Masson y Dane (para identificar queratina y mucinas), PAS para identificar glucoproteínas, Azul de toluidina a pH 3,8 para

sustancias basófilas y metacromáticas alcohol-resistentes, Azul alciano a pH 2,5, 1,0 y 0,5 para carboximucinas (glucosaminoglucanos –GAG- ácidos no sulfatados) y sulfomucinas (glucosaminoglucanos ácidos sulfatados) de origen epitelial y conectivo (Samar et al., 2004, *Técnicas Histológica*. Ed SeisC, Córdoba, Argentina).

La técnica de Azul alciano a pH constante (en buffer acetato a pH 5.8) y con variación de la concentración electrolítica se utilizó para diferenciar los distintos glucosaminoglucanos. Para la variación de la concentración electrolítica se usó cloruro de magnesio que se agrega en una proporción determinada cada 100 ml de solución de Azul alciano (**Tabla 1**) (Nessi et al., 2000, *Técnicas de Investigación y Diagnóstico en Biología y Medicina*, Buenos Aires, Argentina Ed UBA, 69-76).

Tabla 1: Variación de la molaridad con el agregado de cloruro de magnesio

Cloruro de magnesio (g)	Molaridad (M)	Resultado
1.20	0.06	GAG ácidos sulfatados y carboxilados
6.10	0.3	GAG fuertemente y débilmente sulfatados
10.15	0.5	GAG fuertemente sulfatados
14.20	0.7	GAG altamente sulfatados del tejido conectivo
18.30	0.9	Queratansulfato

Las lesiones fueron analizadas con técnicas inmunohistoquímicas (revisado en Samar et al., 2004, *Técnicas Histológicas*, Ed SeisC, Córdoba Argentina), usando los siguientes anticuerpos: α -actina de músculo liso (α -SMA), vimentina, CK 17 y S-100, indicativos de diferenciación mioepitelial. α -SMA colorea específicamente la isoforma α de la proteína actina de músculo liso presente en las células mioepiteliales tanto de los tumores de mama como de las glándulas salivares. (Zarbo et al., 2000, *Arch Pathol Lab Med* 124: 401-405). La tinción inmunohistoquímica se realizó sobre cortes del material incluido en parafina, con el kit LSAB+D (Dako Lab).

RESULTADOS

En los cortes histológicos coloreados con H/E y Masson se observó una neoformación tumoral con patrón predominante de crecimiento sólido, separada del parénquima parotídeo normal por una cápsula fibrosa de importante espesor. El tejido tumoral estaba subdividido en lóbulos formados por células epitelioides y escasas células claras. Las células epitelioides eran grandes, de forma ovoide o poligonal, con apetencia tintorial eosinófila y bordes celulares nítidos. Sus núcleos eran excéntricos con cromatina laxa. Estas células se disponían en nidos sólidos delimitados por una delicada trama de tejido conectivo fibroso cuyas fibras colágenas se coloreaban de azul con tricrómico de Masson (**Fig. 1A**). En algunas zonas el tejido conectivo presentaba un importante componente estromal hialino y mucomixoide (**Figs. 1B y 1C**), con metacromasia ocasional. Estas extensas áreas hialinas y mucoides rodeaban a las células epitelioides. Las áreas hialinas eran fuertemente eosinófilas, de aspecto homogéneo (**Fig. 1D**); se coloreaban de rojo brillante con Masson y celeste con Dane.

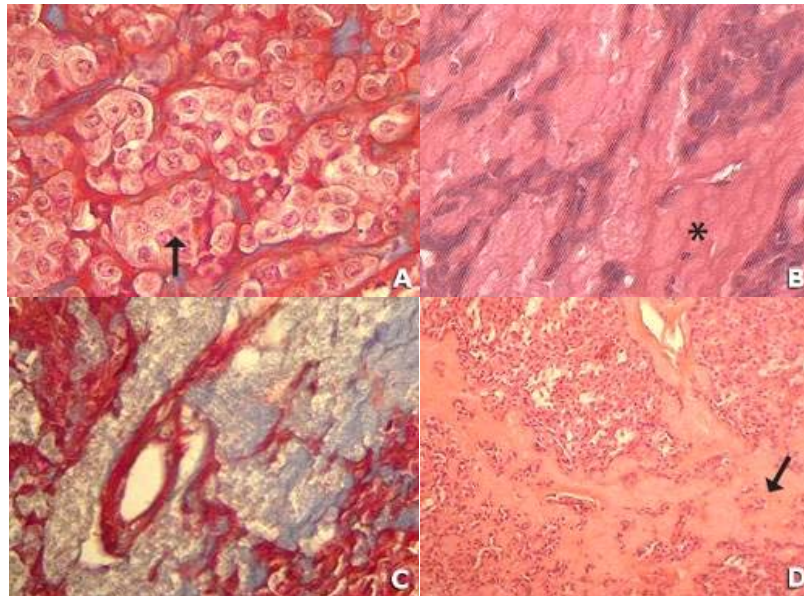


Figura 1. (A) Se observan los nidos de células tumorales rodeados por una delicada trama de fibras colágenas puestas de manifiesto con la coloración tricrómica de Masson (flecha). 40x. (B) Se señala el componente mucomixoide (asterisco). Coloración H/E. 40x. (C) En la imagen se muestra un área mucoide coloreada con tricrómico de Masson. 40x. (D) Áreas tumorales hialinas eosinófilas, de aspecto homogéneo (flecha). Coloración H/E. 20x.

Con Azul de toluidina, tanto la trama "conectiva" como las áreas hialinizadas y la sustancia mixoide presentaron zonas celestes, azules y metacromáticas, con predominio de áreas basófilas ortocromáticas, las que además eran PAS positivas (Figs. 2A y 2B). Las células claras se disponían en muy escasa cantidad entre los nidos de células epiteliales, asociadas ocasionalmente a espacios microquísticos.

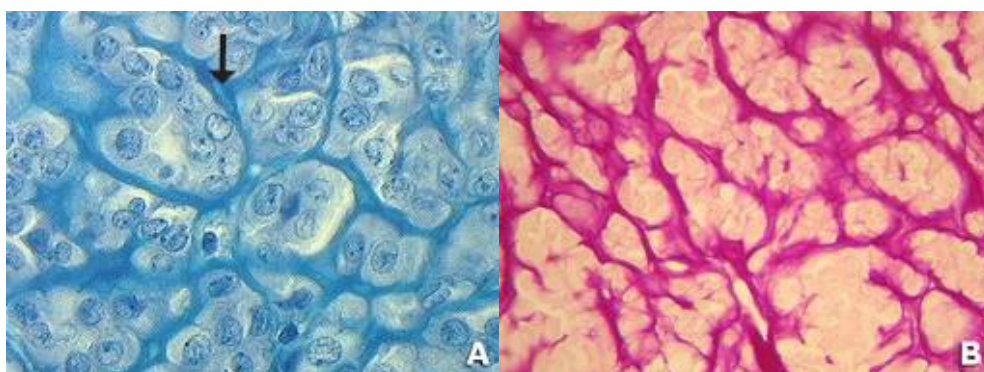


Figura 2. (A) Nidos tumorales rodeados por áreas con apetencia tintorial ortocromática (flecha). Coloración Azul de toluidina pH 3.8. (B) Áreas hialinizadas fuertemente PAS positivas circunscriben los nidos de células tumorales. Coloración PAS. 40x.

Era notable la proliferación vascular con membranas basales engrosadas, intensamente PAS positivas (Fig. 3A). También se observaron focos de calcificación distrófica, extensas áreas hemorrágicas y vasos congestivos y dilatados (Fig. 3B).

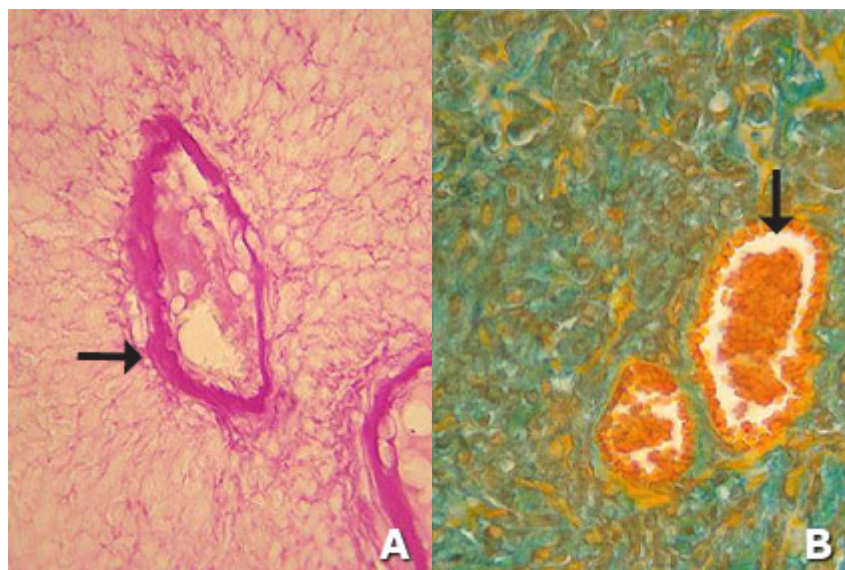


Figura 3. (A) Se señalan vasos sanguíneos con membranas basales engrosadas (flecha). Coloración PAS. 40x. **(B)** Una característica del tumor fue la presencia de vasos sanguíneos congestivos y dilatados como se observa en la imagen (flecha). Coloración tricrómica de Dane. 40x.

Se identificaron áreas que se correspondía a la variante reticular, constituidas por delgados cordones celulares interconectados, con citoplasmas acidófilos y comprimidos y núcleos ligeramente vesiculosos rodeados por una abundante matriz mucoide, relativamente acelular, fuertemente PAS positiva, moderadamente metacromática, alcianófila a pH 2.5 y 1.0 y negativa a pH 0.5 (Figs. 4A y 4B).

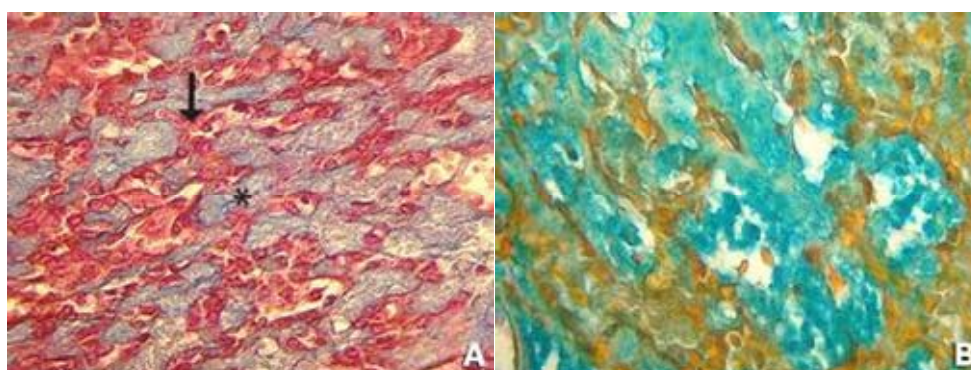


Figura 4. (A) Área tumoral con un patrón histológico reticular, con delgados cordones celulares interconectados (flecha), rodeados de matriz mucoide abundante (asterisco). Tricrómico de Masson. 40x. **(B)** Zona tumoral variante reticular con abundante matriz mucoide reactiva frente al Azul alciano de la coloración tricrómica de Dane. 40x.

En los cortes coloreados con solución de Azul alciano a diferentes concentraciones electrolíticas se demostró la ausencia de glucosaminoglucanos altamente sulfatados del tejido conectivo.

El estudio inmunohistoquímico demostró una fuerte marcación del citoplasma de las células mioepiteliales tumorales frente a CK17, vimentina y actina específica muscular. En cuanto a S100, se observó una reacción positiva moderada a fuerte en el citoplasma de las células tumorales y una intensa

marcación a nivel de los núcleos (**Figs. 5A y 5B**).

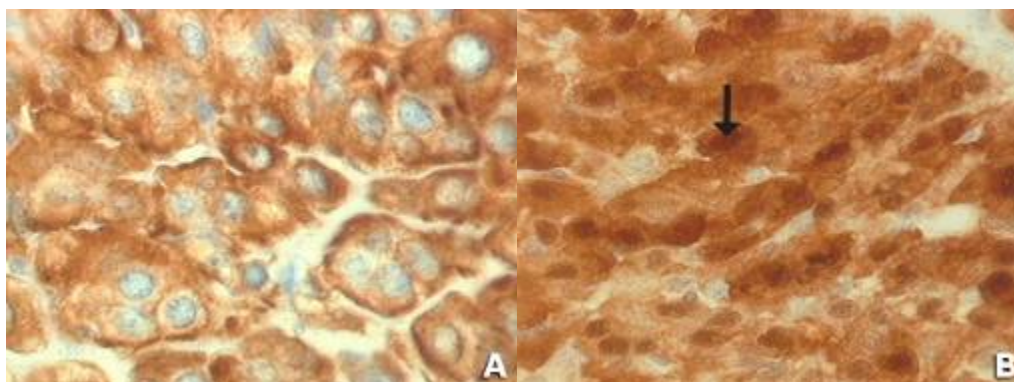


Figura 5. (A) Fuerte marcación citoplasmática en las células mioepiteliales tumorales con actina específica muscular. Inmunohistoquímica. α -actina de músculo liso (α -SMA), 40x. (B) Reacción moderada a fuerte en los citoplasmas de las células mioepiteliales, muy intensa en los núcleos (flecha). Inmunohistoquímica S100. 40x.

DISCUSIÓN

El mioepitelioma, tumor benigno de glándulas salivares, fue descrito por Sheldon en el año 1943 (García-Ortega et al., 2001, *Acta Otorrinolaringol Esp* 52: 269-272). Comprende el 1,6% de todos los tumores benignos de las glándulas salivares mayores y se caracteriza por presentar exclusivamente células de linaje mioepitelial sin formación de conductos (revisado en Ellis y Auclair, *Tumors of the salivary glands*, Series 4, 2008, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, USA, pp 123-133). Presenta un patrón histológico sólido, mucoide o reticular, con células plasmocitoides, epitelioides, fusiformes y claras, que se expresan en diferentes proporciones dentro de un mismo tumor. (revisado en Ellis y Auclair, *Tumors of the salivary glands*, Series 4, 2008, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, USA, pp 123-133; Testa et al., 2005, *Acta Oto Laryngol* 125: 664-666; Torres Gómez et al., 2004, *Rev Esp Patol* 37: 437-442).

El caso presentado en esta comunicación corresponde a un mioepitelioma originado en la glándula parótida en el que predominan las células epitelioides y células claras en pequeña cantidad, con un patrón histológico sólido en el que se disponen áreas reticulares rodeadas por abundante estroma mucoide, de manera esporádica. Este tipo reticular de mioepitelioma fue descrito por primera vez por Dardick et al. (1989, *Ultrastr Pathol* 13: 187-224). Los tumores de parótida son poco comunes y abarcan sólo el 3% de todos los tumores de cabeza y cuello, y el 0,6% de todo el organismo (Salgado García et al., 2003, *Rev ADM* 15: 72-75).

Analizando los aspectos histológicos descritos por nosotros, los mismos coinciden con la literatura consultada (revisado en Ellis y Auclair, *Tumors of the salivary glands*, Series 4, 2008, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, USA, pp 123-133). Nosotros hemos observado la presencia de mucinas extracelulares compuestas por glucoproteínas (PAS positivas), glucosaminoglucanos ácidos sulfatados alcianófilos coloreados con tricrómico de Dane y Azul alciano a pH 1.0, metacromáticos con Azul de toluidina, y glucosaminoglucanos ácidos no sulfatados alcianófilos a pH 2,5 y ortocromáticos con Azul de toluidina. La coloración negativa de las sulfomucinas con soluciones de Azul alciano a pH 0.5 y a concentración electrolítica de 0.7 M nos indica que los glucosaminoglucanos presentes en el estroma tumoral no tienen origen en componentes celulares del tejido conectivo. Estos componentes extracelulares son sintetizados y secretados por las células mioepiteliales tumorales como describen

diferentes autores (García-Ortega et al., 2001, *Acta Otorrinolaringol Esp* 52: 269-272).

El diagnóstico diferencial del mioepitelioma se plantea con el adenoma pleomórfico, del que se diferencia por la ausencia de formaciones ductales y de focos condroides o condromixoides (revisado en Ellis y Auclair, *Tumors of the salivary glands*, Series 4, 2008, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, USA, pp 123-133; Torres Gómez et al., 2004, *Rev Esp Patol* 37: 437-442). Además, la presencia de células claras nos obliga a diferenciarlo del adenocarcinoma de células claras, neoplasia compuesta de una población monomorfa de estas células, a diferencia del mioepitelioma sólido que desarrolla células claras escasas y dispersas y con inmunohistoquímica se pueden marcar sus células mioepiteliales, que no se encuentran presentes en ese tumor maligno (revisado en Ellis y Auclair, *Tumors of the salivary glands*, Series 4, 2008, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, USA, pp 123-133) La falta de crecimiento infiltrativo y de una arquitectura nodular con periferia hiper celular, mitosis y áreas de necrosis y la presencia de células con núcleos uniformes, son características histológicas que permiten diferenciar este tumor de su contraparte maligna, el carcinoma mioepitelial (Suba et al., 2003, *Int J Oral Maxillofac Surg* 32: 339-341).

Por otro lado, para la caracterización inmunohistoquímica de las células mioepiteliales tumorales seleccionamos los marcadores actina específica muscular (Tipo I), CK 17 (Tipo II) y vimentina (Tipo III), basándonos en la clasificación de Ogawa (2003, *Prog Histochem Cytochem* 38: 343-426), obteniéndose resultados positivos a nivel de los citoplasmas. Con el marcador S100 se observó la expresión de la proteína tanto en núcleos como en citoplasmas (Furuse et al, 2005, *Int J Surg Pathol* 13: 57-65). S100, representan una familia multigénica de proteínas que están involucradas en una variedad de procesos celulares, tales como regulación del ciclo celular, crecimiento y diferenciación celular y motilidad y en miocardiopatías, desórdenes inflamatorios y neurodegenerativos y cáncer muestran niveles alterados (Heizmann, et al., 2002, *Front Biosci* 7: 1358-1368; Marenholz et al., 2004, *Biochem Biophys Res Com* 322: 111-1122). Una elevada expresión de S100 A4 se asocia con progresión tumoral metastásica por lo que es un marcador molecular importante para pronóstico clínico (Heizmann et al., 2005, *Br J Cancer* 92: 1955-1958). En consecuencia, se profundizará el estudio de la expresión tumoral de subfamilias de S100 en glándulas salivares, área en la que fue escasamente investigada, para evaluar su localización diferencial y comportamiento biológico de las células mioepiteliales neoplásicas, presentes en una variedad de tumores salivares epiteliales.

A partir de estos resultados concluimos que las técnicas estructurales, histoquímicas y los marcadores inmunohistoquímicos usados son herramientas útiles que permiten diferenciar el mioepitelioma de otros tumores benignos y malignos de glándulas salivares.

Agradecimientos

Financiado por SECYT (Secretaría de Ciencia y Tecnología - Universidad Nacional de Córdoba. Argentina).