

205  
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO CON LAMININA  
Y PROTEINA S-100 EN ADENOMAS PLEOMORFOS

TESIS PROFESIONAL  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
CIRUJANO DENTISTA  
P R E S E N T A :  
URIEL RODRIGO LOPEZ BECERRIL

*10 100 Santa Ponce Bravo*

DIRECTOR DE TESIS: DRA. SANTA PONCE BRAVO

ASESORES: MTRA. SANDRA OROZCO SUAREZ

DR. EMILIO CASTELLANOS JUAREZ

MEXICO, D. F.

1998.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

267613



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A la memoria de:*

*Dr. Jorge Luis Calderón Mendieta*

*Por su desinteresado apoyo en los momentos más difíciles en mi trayectoria escolar.*

*David M. Téllez Barajas*

*Porque más que un amigo fuiste un hermano*

*A la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México*

*Por haberme abierto las puertas del conocimiento.*

*Al Laboratorio de Patología Experimental*

*de la División de Estudios de Posgrado e Investigación.*

*Al Laboratorio de Patología Experimental*

*del Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional, Siglo XXI.*

*Al Laboratorio de Neurociencias*

*del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional, Siglo XXI.*

*A mis muy queridos padres*

*Constantino López Nava y Rufina Becerril Plata.*

*Por su valioso e invaluable apoyo y por sus consejos  
pero principalmente por su amor, cariño y confianza.*

*A mis hermanas*

*Eloisa y Lilitiana.*

*Que desde su muy particular forma de ser contribuyeron con su apoyo y cariño.*

*A mis maestros*

*Dr. David Moreno Ortiz*

*Dr. David Moreno Maldonado*

*Dr. Constantino Ledesma Montes*

*Gracias por sus valiosas enseñanzas.*

*A mis asesores*

*Dr. Emilio Castellanos Juárez*

*Gracias por su buena disposición para asesorar el presente trabajo.*

*Mtra. Sandra Orozco Suárez*

*Por ser una excelente maestra y amiga.*

*A los técnicos*

*Guille, Teo y Victor*

*Por su invaluable colaboración para llevar a cabo el presente trabajo*

*A la Familia Téllez Barajas*

*Por considerarme como un miembro más de su familia*

*A mi abuelita, tios y primos*

*Porque su apoyo siempre ha estado presente*

*A mis queridos amigos*

*Alejandra, Blanca, Carmen, Guille, Irma, Manuel, Martha, Paola, Teo*

*y muy en especial a Sergio*

*A todos ellos por enseñarme el valor de la amistad*

*A la Dra. Santa Ponce Brauo*

*Por su gran ayuda, por compartir sus conocimientos y  
por ser la mejor maestra que cualquier alumno puede desear.*

# ÍNDICE

	PAGINA
<b>A. Sumario</b>	3
<b>B. Glándulas salivales normales</b>	4
Características histológicas	5
<b>C. Tumores de las glándulas salivales</b>	10
Clasificación de los tumores de glándulas salivales	11
Características histopatológicas	13
Adenoma pleomorfo	13
<b>D. Laminina</b>	16
<b>E. Proteína S-100</b>	19
<b>F. Anticuerpos monoclonales</b>	20
Producción	22
Aplicaciones	23
<b>G. Anticuerpos policlonales</b>	25
<b>H. Cromógenos</b>	26
<b>I. Planteamiento del problema, Justificación, Hipótesis,</b>	
<b>Objetivo general y Objetivos específicos.</b>	28
<b>J. Materiales y Métodos</b>	30
<b>K. Resultados</b>	38
<b>L. Discusión</b>	60
<b>M. Conclusiones</b>	62
<b>N. Bibliografía</b>	63

## Índice de Figuras

Figura 1. Inmunoreacción de las glándulas salivales normales con Laminina y Proteína S-100.

Figura 2. Adenoma pleomorfo teñido con H y E e inmunoreacción con Laminina del epitelio, células epiteliales y estructuras vasculares.

Figura 3. Zona de aspecto hialino en un adenoma pleomorfo teñido con H y E y la inmunoreacción con Proteína S-100 que presentan células de aspecto condromixoide.

## Índice de Tablas

Tabla 1. Estructuras ductiformes en Adenoma Pleomorfo: Reacción de sus componentes con Laminina.

Tabla 2. Identificación y cuantificación con Proteína S-100 de los diversos tipos de células mioepiteliales en el Adenoma Pleomorfo.

Tabla 3. Relación de la inmunoreacción de Adenoma Pleomorfo a Proteína S-100 y Laminina con edad y sexo.

## Sumario

Las glándulas salivales juegan un papel muy importante en la salud bucal de cada individuo. Específicamente mantienen lubricada la mucosa oral por medio de la saliva, permitiendo así una buena digestión y autoclisis de la boca.

La manifestación de diversas lesiones, tumorales o reactivas de las glándulas salivales trae consigo alteraciones locales y en algunas circunstancias, alteraciones sistémicas.

Las neoplasias benignas o malignas de las glándulas salivales presentan hasta la fecha, una gran controversia respecto a su histogénesis. El desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas ha ayudado a observar y determinar con más precisión estructuras celulares y antígenos en secciones de tejido glandular normal y tumoral. Dependiendo del antígeno de interés, estas técnicas se pueden utilizar para marcar líneas celulares en tejidos normales y neoplásicos fijados en formalina y embebidos en parafina. Esto ha resultado en métodos experimentales con gran valor en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de tumores. A pesar de ésto muy poco esfuerzo se ha dirigido ha utilizar éstas técnicas en relación con tumores de glándulas salivales.

La presencia de Laminina y proteína S-100 en las glándulas salivales puede servir como marcador en el comportamiento de las glándulas salivales normales y anormales.

## GLÁNDULAS SALIVALES NORMALES

La principal función de las glándulas salivales es humedecer las membranas mucosas superiores del tracto aereodigestivo por medio de la saliva. La saliva es una solución de proteínas, glucoproteínas, glúcidos y electrólitos que contiene células epiteliales planas descamadas y leucocitos. El pH varía entre 6 y 7.4. La saliva contiene la enzima ptialina (una alfa amilasa), que convierte el almidón y el glucógeno en maltosa. Se encuentran inmunoglobulinas principalmente IgAs, que sirve de protección contra la fijación microbiana y la invasión de la mucosa (Cormack, 1987; Geneser, 1989; Martinez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989).

En los seres humanos existen tres pares de glándulas salivales mayores; la glándula parótida, que se localiza por detrás de la rama ascendente de la mandíbula, por debajo del conducto auditivo externo, por delante de la apófisis mastoides y estiloides y de los músculos que ahí se insertan. La glándula submandibular se localiza en la porción lateral de la región suprahioidea y ocupa la depresión entre la cara interna de la mandíbula por un lado y los músculos suprahioideos, la cara lateral de la base de la lengua y de la faringe por otro. La glándula sublingual se localiza en el piso de la boca, por debajo de la mucosa del surco alveololingual. Éstas están conectadas simétricamente a la cavidad bucal, donde vacían su secreción sólo bajo estímulos específicos. Además se encuentran glándulas salivales menores las cuales se distribuyen en toda la cavidad bucal y se reparten en cuatro grupos principales que son glándulas palatinas, glándulas labiales, glándulas yugales y glándulas linguales. Las glándulas palatinas están situadas en la bóveda palatina. Las glándulas labiales ocupan la cara posterior de los labios. Las glándulas yugales están anexas a la mucosa de las mejillas. Las glándulas que se encuentran cerca de la desembocadura del conducto de Stenon se denominan glándulas molares. Las glándulas linguales se dividen en varios subgrupos; unos están anexas a las papilas caliciformes y otros a las papilas foliadas; otras llamadas glándulas de Weber, ocupan la parte posterior de los bordes laterales de la lengua; por último las conocidas con los nombres de glándulas de Blandin o de Nühn están situadas en la cara inferior de la lengua, cerca de la punta. Todas estas glándulas menores producen una secreción rica en mucopolisacáridos y la excepción son las

glándulas serosas de Von Ebner. (Geneser, 1989; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Rouviere, 1994; Ten Cate, 1989).

Se ha reportado tejido glandular atípico en encía (coristoma de glándula salival gingival). (Genco, 1993).

#### CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS.

Las glándulas salivales son glándulas exocrinas tubulo acinares caracterizadas por la presencia de numerosas unidades secretorias. Estas unidades secretorias consisten de acinos donde se produce la secreción y un sistema ductal que acarrea la secreción de la cavidad oral y regula la concentración de agua y electrolitos. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

Hay tres tipos de unidades secretorias salivales; las unidades serosas, las cuales contienen amilasa, peroxidasas salivales (Geneser, 1989; Mansson-Rahemtulla et. al., 1988; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989), lisozima, lactoferrina, antiquimiotripsina, antitripsina (Lassiter et. al., 1987; Pollock et. al., 1987; Aroni et. al., 1988); las unidades mucosas, que secretan sialomucinas; y las unidades mixtas formadas, por células serosas y mucosas. De acuerdo a la cantidad de estos tipos de unidades secretoras las glándulas pueden clasificarse en tres categorías: serosas (glándula parótida y glándula de Von Ebner) , mucosas (glándulas del paladar, de los bordes laterales y base de la lengua) y glándulas mixtas [glándula submandibular con predominio seroso; glándula sublingual, predominantemente mucosa y las glándulas salivales menores de labios, mucosa bucal y apicales de la lengua (Geneser, 1989; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989)].

#### ACINOS

Los acinos serosos consisten de grupos de células epiteliales en forma piramidal (con su punta dirigida hacia el lumen central) rodeadas por una membrana basal. Las células epiteliales tienen un núcleo basal y un citoplasma denso con gránulos de zimógeno basófilo (PAS positivos). La enzima primaria en los gránulos de zimógeno es la amilasa o ptialina y existen otras enzimas antibacterianas no específicas como son la lisozima y lactoferrina (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989).

Los acinos mucosos son más grandes que los de tipo seroso y tienen un patrón irregular. La célula mucosa esta bien adaptada para la producción, almacenaje y

secreción de material proteico. La célula mucosa es de forma piramidal con un núcleo aplanado localizado hacia su base, un citoplasma abundante ocupado por vacuolas mucosas, que contienen sialomucinas ácidas y neutras en diferentes concentraciones. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989)

Los acinos mixtos se encuentran normalmente en la glándula submaxilar. Esas estructuras se caracterizan por la concentración de células mucosas cerca del conducto intercalado y están rodeados por células serosas en una formación de media luna. Las células serosas son más o menos visibles considerando la cantidad de secreción acumulada en las células mucosas. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

### CÉLULAS MIOEPITELIALES

Las células mioepiteliales se encuentran entre las células epiteliales y la lamina basal del acino y de los conductos intercalados y probablemente existan en la unión de los conductos estriados e intercalados. Usualmente hay una célula mioepitelial por porción secretoria aunque dos o tres células por porción secretoria no es raro encontrarlas. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989). Las células son aplanadas y tienen un proceso citoplasmático largo, que se extiende sobre la superficie epitelial. La característica sobresaliente de estas células es la presencia de filamentos citoplásmicos sobre la porción basal. La mayoría de estos consiste en miofilamentos de actina, tropomiosina y miosina que tienen una disposición en un patrón similar al del músculo liso. Haces de tonofilamentos intermedios que están unidos a las uniones celulares, particularmente en desmosomas estos filamentos están constituidos por citoqueratina. La presencia de vimentina es inconstante y los filamentos de desmina están ausentes en el mioepitelio normal. El citoplasma muestra una fuerte actividad de ATPasa y de fosfatasa alcalina. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989)

Generalmente se acepta que la célula mioepitelial es contráctil. La oxitocina induce la contracción de las células mioepiteliales como en las verdaderas células musculares. Esta función permite que la saliva sea expulsada por el incremento de la presión sobre la unidad secretoria. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989).

La célula mioepitelial actúa en el soporte de las células secretoras, ya que previenen una sobredistención por acumulación de los productos secretorios dentro del citoplasma (Ten Cate, 1989) y participa en la elaboración de lamina basal. La última función es

importante en algunas alteraciones hiperplásicas y neoplásicas, ya que las células mioepiteliales producen **fibronectina**, **laminina** y **colagena tipo III**. Todas estas proteínas constituyen la lamina basal.

A pesar del origen endo o ectodérmico, las células mioepiteliales comparten una estructura y función epitelial y mesenquimática. Las células mioepiteliales alteradas pueden manifestar (en la proliferación neoplásica) una o ambas características. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

Los principales tipos morfológicos de las células mioepiteliales alteradas que se encuentran son:

1. Célula estrellada o con aspecto mixoide, que es una característica típica observada en áreas condromixoides del Adenoma pleomorfo.
2. Células en forma de huso o célula muscular, que pueden ser identificadas en el Adenoma pleomorfo y en algunos Mioepiteliomas.
3. Células hialinas o plasmocitoides, las cuales pueden ser descritas en Adenomas pleomorfos y pueden estar presentes en Mioepiteliomas. Estas células contienen abundantes filamentos citoplásmicos que le dan un aspecto hialino eosinófilo.
4. Células claras o epiteliales que se observan en varios tumores de glándulas salivales, en la superficie externa de conductos o estructuras semejantes a conductos. También es un tipo característico en el Carcinoma epitelial-mioepitelial (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

Las células con características mesenquimáticas secretan mucinas como ácidos glucosaminoglucanos (ácido hialurónico, heparan sulfato, condroitin-4 sulfato, y condroitin 6-sulfato), constituyentes de la membrana basal, y elastina. En suma para los filamentos contráctiles (actina y miosina), la vimentina es fuertemente positiva. La proteína S-100, la cual es un marcador común para el mioepitelio, aumenta su positividad en células mixoides, condroides y estrelladas, particularmente si están asociadas con un estroma mixoide. Por otro lado, la diferenciación epitelial puede manifestarse como células claras o escamosas y la consecuente presencia de filamentos de vimentina y queratina en la misma célula.

## SISTEMA DE CONDUCTOS

El sistema de conductos transporta la saliva desde la cavidad oral y modifica su concentración de agua y electrolitos. El sistema de conductos de las glándulas salivales comprende una variedad de redes de conductos los cuales se caracterizan por miembros progresivamente menores. Esta red incluye tres clases de conductos: conductos intercalados, conductos estriados y conductos terminales o excretores. El sistema no es un simple conductor, sino que participa activamente en la producción y modulación de la saliva. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989)

Los dos primeros segmentos, los conductos intercalares y los estriados son intralobulares. Y son conocidos como conductos secretorios debido a su actividad metabólica. Los otros segmentos que son interlobulares se llaman conductos excretores. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

Los conductos intercalados están en contacto directo con el acino, son de diámetro pequeño y están delineados por una capa simple de células epiteliales cuboidales cortas con un núcleo central y poco citoplasma conteniendo retículo endoplásmico rugoso localizado basalmente y escaso aparato de Golgi localizado apicalmente y eránulos secretorios que se encuentran ocasionalmente en las células cercanas a la porción secretoria.

Las células cuboidales de los conductos intercalares tienen pocas microvellosidades hacia el lumen del conducto y en sus bordes laterales presentan interdigitaciones con cada una de las otras células y son conectadas por complejos de unión situados apicalmente y uniones desmosómicas. Además de que se encuentran cubiertos de una capa irregular de células mioepiteliales. Las células mioepiteliales se encuentran entre la membrana basal y las células ductales. Las células epiteliales muestran una transformación progresiva hacia la luz del conducto y las células secretorias, teniendo una fuerte actividad citoplásmica de lactoferrina y lisozima. La longitud de los conductos intercalados es variable en las tres glándulas salivales mayores. En la parótida son relativamente largos. En contraste son cortos en la submandibular y difícilmente visibles en la sublingual. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989).

Los conductos estriados en la glándula submandibular son más largos que los de las otras glándulas. Estos conductos están cubiertos por células columnares simples que

tienen un núcleo central y un citoplasma eosinófilo (Ten Cate, 1989). La principal característica de estas células son las prominentes estriaciones paralelas que se encuentran en la porción basal de la célula, estas estriaciones son causadas por invaginaciones de la membrana, dentro de las cuales se encuentran mitocondrias verticalmente orientadas. Esta estructura comprende una superficie especializada sobre el epitelio que se encarga del transporte de agua y electrolitos. Varias enzimas como la ATPasa, succinildeshidrogenasa y la anhidrasa carbónica están presentes en el citoplasma de los conductos estriados, estas enzimas proveen a los conductos de un sistema energético y metabólico listo para concentrar algunos de los elementos presentes en la saliva. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989)

Los conductos estriados están conectados a los ductos interlobulares localizados en el tejido conjuntivo septal. Estos conductos están cubiertos por un epitelio columnar pseudoestratificado con escasas células de Goblet. (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989). Conforme el conducto esta más próximo a la cavidad oral, el epitelio cambia gradualmente a un epitelio estratificado que se une con el epitelio estratificado de la cavidad oral por medio del orificio del conducto. El conducto excretor principal modifica la saliva final por la alteración en la concentración de electrolitos y tal vez por la adición de un componente mucoide (Ten Cate, 1989).

La principal función de los conductos estriados es el transporte de saliva, y además pueden jugar un rol importante en la regeneración por medio de células indiferenciadas pluripotenciales (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

## TUMORES DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES

Los tumores de glándulas salivales son poco comunes y forman menos del 3% de las neoplasias de cabeza y cuello (Evenson y Cawson, 1985). La incidencia anual mundial es de 1 a 6.5 casos por cada 100,000 personas (Neville et. al. 1995) El sitio más común para los tumores de glándulas salivales es la glándula parótida que tiene un porcentaje del 64 al 80% afortunadamente solo del 15 al 32% son tumores malignos. De un 8 a un 11% de los tumores de glándulas salivales ocurren en la glándula submandibular, pero de estos del 37 al 50% son tumores malignos. Los tumores en glándula sublingual son muy raros y no son más del 1% de todos los tumores de glándulas salivales. Aunque del 70 al 90% de estos tumores son malignos. (Regezi y Sciubba, 1991; Neville et. al, 1995)

Los tumores de glándulas salivales menores abarcan del 9 al 23% de todos los tumores y por lo tanto este grupo de glándulas es el segundo más común para la aparición de tumores de glándulas salivales. Desafortunadamente el 50% de estos tumores son malignos. Más del 50% de las glándulas salivales menores se localizan en las glándulas del paladar, el 50% restante se encuentra en labios (15%), mejillas (12%), lengua (5%), piso de la boca (5%), y otras regiones (Seifert et. al., 1986; Neville et. al. 1995). El Adenoma pleomorfo es la neoplasia más común de las glándulas salivales (Evenson y Cawson, 1985; Eversole, 1991; Regezi y Sciuba, 1991; Neville et. al, 1995).

Los tumores benignos generalmente son redondos, bien delimitados, de crecimiento lento, indoloros, móviles y no interfieren con las funciones de las estructuras adyacentes y pueden estar presentes por varios años (Blitzer, 1986).

Los tumores malignos se presentan como una masa (60-85% de los casos), pueden estar asociados con parálisis facial (15%), se presentan con dolor, por compresión o invasión de terminaciones nerviosas (10%). Se dividen en: bajo y alto grado de malignidad. Los tumores de bajo grado de malignidad son: el Carcinoma mucoepidermoide, Carcinoma de células acinares, Oncocitoma maligno, los cuales tienen un mejor pronóstico. El Carcinoma adenoideo quístico tiene un pronóstico reservado por la invasión temprana de terminaciones nerviosas. Por último entre los de alto grado de malignidad están: el Carcinoma mucoepidermoide, Carcinoma de células escamosas, Adenocarcinoma y tumores indiferenciados, todos estos de crecimiento rápido (Blitzer, 1986).

## CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE GLÁNDULAS SALIVALES

Existen diferentes clasificaciones basadas en el tipo de glándula, características histológicas, características clínicas, edad, sexo y la posible histogénesis del tipo de neoplasia. Eversole propuso una clasificación y posteriormente la Organización Mundial de la Salud (OMS) sugirió otra; a partir de ésta se han desarrollado otras clasificaciones. Work y Batsakis presentaron una clasificación de glándulas salivales neoplásicas y no neoplásicas y posteriormente Batsakis desarrolló otra. En 1987 se reunieron expertos que elaboraron la siguiente clasificación histológica internacional de tumores de glándulas salivales de la OMS, que es la actual y viene a substituir a la antigua clasificación de dicha organización (Seifert y Sobin, 1992; Simpson, 1994).

### TIPOS HISTOLÓGICOS DE LOS TUMORES DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES

#### 1. Adenomas

1.1 Adenoma pleomorfo

1.2 Mioepitelioma (Adenoma mioepitelial)

1.3 Adenoma de células basales

1.4 Tumor de Warthin (Adenolinfoma)

1.5 Oncocitoma (Adenoma oncocítico)

1.6 Adenoma canalicular

1.7 Adenoma sebáceo

1.8 Papiloma ductal

1.8.1 Papiloma ductal invertido

1.8.2 Papiloma intraductal

1.8.3 Sialoadenoma papilífero

1.9 Cistadenoma

1.9.1 Cistadenoma papilar

1.9.2 Cistadenoma mucinoso

#### 2. Carcinomas

2.1 Carcinoma de células acinicas

2.2 Carcinoma mucoepidermoide

2.3 Carcinoma adenoideo quístico

- 2.4 Adenocarcinoma polimorfo de bajo grado (Adenocarcinoma del conducto terminal)
- 2.5 Carcinoma epitelial-mioepitelial
- 2.6 Adenocarcinoma de células basales
- 2.7 Carcinoma sebáceo
- 2.8 Cistadenocarcinoma papilar
- 2.9 Adenocarcinoma mucinoso
- 2.10 Carcinoma oncocítico
- 2.11 Carcinoma del conducto salival
- 2.12 Adenocarcinoma
- 2.13 Miepitelioma maligno (Carcinoma mioepitelial)
- 2.14 Carcinoma en Adenoma pleomorfo
- 2.15 Carcinoma de células escamosas
- 2.16 Carcinoma de células pequeñas
- 2.17 Carcinoma indiferenciado
- 2.18 Otros Carcinomas
- 3. Tumores no epiteliales
- 4. Linfomas malignos
- 5. Tumores secundarios
- 6. Tumores no clasificados
- 7. Lesiones pseudotumorales
  - 7.1 Sialoadenosis
  - 7.2 Oncocitosis
  - 7.3 Sialometaplasia necrozante (infartación de la glándula salival)
  - 7.4 Lesión linfoepitelial benigna
  - 7.5 Quistes de las glándulas salivales
  - 7.6 Sialoadenitis esclerosante crónica de la glándula submandibular (Tumor de Kütner)
  - 7.7 Hiperplasia linfoide quística en SIDA

## CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DE LOS ADENOMA PLEOMORFO DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES.

### ADENOMA PLEOMORFO

El Adenoma pleomorfo es la neoplasia epitelial benigna más común de las glándulas salivales humanas (Eversole, 1991; Regezi y Sciuba, 1991 ; Neville et. al., 1995)

Los términos Adenoma pleomorfo y tumor mixto intentan describir las características histológicas inusuales de este tumor pero ninguno de estos términos es adecuado por completo (Neville et. al, 1995). No obstante el término de Adenoma pleomorfo indica la diversidad histológica del tumor, al mismo tiempo que indica su origen epitelial. (Seifert et. al., 1986).

La histogenesis de los tumores de glándulas salivales se basa en dos tipos de células como posibles progenitoras. Se sugiere que la célula del conducto intercalador da origen al Adenoma papilar, Carcinoma adenoideo quístico y algunos Adenocarcinomas como el de Células acinares. El otro tipo de célula es la célula de reserva del conducto excretor como posible precursora de Papilomas intraductales, Adenoma pleomorfo, Carcinoma epidermoide y Carcinoma mucoepidermoide (Eversole, 1971). Se cree que la célula del conducto intercalador origina al Adenoma pleomorfo y otros tipos de neoplasias (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

El tipo de células precursoras del Adenoma pleomorfo y su localización no ha sido claramente establecido. Algunos autores proponen a la célula de reserva del conducto intercalador como la célula progenitora de ésta neoplasia (Batsakis, 1980; Regezi, y Sciuba, 1989). Otros autores han considerado a la célula mioepitelial como célula precursora y sugieren que la célula indeterminada puede estar en estado indiferenciado. En las áreas mixoides de la neoplasia, las células presentan variaciones en sus características epiteliales y estromales. Esto sugiere que existe una célula que tiene la capacidad para diferenciarse en célula acinar, célula de conducto y célula mioepitelial (Dardick et. al., 1982, 1993; Kahn et. al., 1985; Sato et. al., 1987)

Seifert y cols. propusieron una clasificación histológica del Adenoma pleomorfo:

Tipo 1: Es el tumor cuyo estroma constituye del 30 al 50% del total de la masa tumoral. El epitelio forma estructuras trabeculares, tubulares o quísticas constituídas de células

epiteliales en diferentes grados de diferenciación. Estas incluyen epitelio del conducto, células mioepiteliales, células epidermoides y otras formas de células. El estroma muestra principalmente una diferenciación mucosa y contiene gran cantidad de mucopolisacáridos ácidos. El tejido normalmente está delimitado por una cápsula incompleta de tejido conjuntivo y tejido glandular salival. Cerca del 30% de todos los Adenomas pleomorfos son del tipo 1.

Tipo 2: Es un Adenoma pleomorfo rico en estroma. A este tipo pertenecen el 55% de los Adenomas pleomorfos. El estroma es mucoide y constituye aproximadamente el 80% de la masa tumoral; en muy raras ocasiones se observa la formación de un patrón condroide, o un estroma mixto condroide-mucoide. Un patrón óseo puede ser observado en ocasiones. El estroma puede mostrar cambios degenerativos con formas hialino-fibrosas sobre todo en tumores de larga evolución o bien después de radioterapia. La diferenciación epitelial es variada como en el tipo 1.

Tipo 3: Este tipo de Adenomas pleomorfos es rico en células pero pobre en estroma; el cual sólo constituye el 20% de la masa tumoral. Las diversidades y arreglos del estroma lo hacen muy similar al tipo 2. Aproximadamente el 9% de todos los tumores pertenecen a este grupo.

Tipo 4: Se trata de un Adenoma rico en células y pobre en estroma, como el tipo 3, pero con la diferencia que el componente epitelial en algunas zonas son uniformemente diferenciados, simulando un Adenoma monomórfico. Una característica importante para el diagnóstico diferencial con los Adenomas monomórficos es el componente mucoide del estroma, el cual no se presenta en los Adenomas monomórficos. De todos los Adenomas pleomorfos aproximadamente el 6.5% pertenecen al tipo 4. La edad de incidencia del tipo 4 es la séptima década de la vida, la cual es una década más en comparación con los tipos 1 al 3.

Casi el 50% de los Carcinomas ex Adenoma pleomorfo provienen de los tipos 3 y 4, lo cual justifica la recomendación de que todos los Adenomas pobres en estroma particularmente en pacientes de edad avanzada tengan seguimiento prolongado por el posible desarrollo de un Carcinoma. Las recurrencias son más comunes en el tipo 2, el cual es rico en estroma. (Seifert et. al. 1986)

La OMS ha decidido no subclasificar a los Adenomas pleomorfos. Debido a que en un mismo Adenoma pueden encontrarse los 4 tipos en un mismo tumor lo que impide que sean subclasificados correctamente.

## LAMININA

Los análisis bioquímicos y ultraestructurales han dado como resultado un modelo fundamental de la membrana basal. La membrana basal se divide en dos componentes basados en su origen celular. La *lámina basal* bordea el epitelio del cual se deriva, mientras que la lamina reticular se origina y se une al tejido conjuntivo subyacente. La lamina basal puede dividirse en *lamina densa* y *lamina lúcida* las cuales se encuentran directamente subyacentes a la capa de células epiteliales. La membrana basal en algunos órganos como el riñón consiste de una lamina densa emparedada entre la lamina lúcida interna y la lamina lúcida externa. (Campbell y Terranova, 1988)

Se han identificado algunos componentes moleculares de la membrana basal. Estas incluyen colágeno tipo IV, el cual es el principal componente de la membrana basal; la laminina, la cual provee un mecanismo de unión de las células epiteliales a la colágena tipo IV, proteoglicano heparan sulfato, el cual provee de una barrera para limitar el paso de moléculas y nidogen (entactina) cuyas funciones no han sido determinadas. Aquí nos enfocaremos a la laminina.

**La laminina** es la glucoproteína más abundante que se encuentra en la membrana basal, la cual tiene múltiples funciones en los tejidos eucarióticos. Se piensa que tienen gran importancia en la proliferación celular, adherir las células epiteliales a la membrana basal y la migración de células normales y neoplásicas. Se piensa que la laminina es uno de los factores responsables para la adherencia de células tumorales metastásicas a la membrana basal. (Campbell y Terranova, 1988)

### ESTRUCTURA MOLECULAR Y ORGANIZACIÓN

**La laminina** es una glucoproteína de alto peso molecular, que consiste en 2 cadenas de polipéptidos en una proporción de 1:2 (Timpl et. al., 1979). La cadena A, también llamada GPI o subunidad-beta esta representada solo por una molécula y tiene un peso molecular de aproximadamente de 440 kilodaltones (kD). La cadena B (GP2 o subunidad alfa) se presenta como 2 o 3 subunidades en clara asociación a la cadena A (Rao et. al., 1982; Kurkinen et. al., 1983). La cadena B ha mostrado que consiste de 2 polipéptidos, llamados B1 y B2 de peso molecular similar (Campbell y Terranova, 1988). Un cuarto componente, derivado de la placenta y visualizado como una banda de 230-

240 kD sobre un gel de electroforesis de sodio dodecil sulfato poliacrimida (SDS PAGE), ha sido llamada cadena M. La cadena M no se ha encontrado en todas las membranas basales (Campbell y Terranova, 1988).

Se sabe que la laminina es sintetizada por las células epiteliales y endoteliales, así como por células musculares y algunos tipos de fibroblastos y tal vez por una matriz extracelular detectable. (Campbell y Terranova, 1988).

Se han identificado algunos receptores para la laminina. Una proteína integral de membrana muestra una alta afinidad para unirse a la laminina. Esta proteína ha sido identificada sobre líneas celulares de Carcinoma, sarcoma y normales. Este receptor cuando se purifica de las células de Carcinoma de mama muestra al menos dos sitios antigénicos; solamente uno de ellos se une a la laminina. Un estudio más reciente sugiere que una glucoproteína de 120 kD denominada cranina, la cual puede comportarse como un componente integral de la membrana, es la proteína predominante que se une a la laminina dentro de las membranas plasmáticas. (Campbell y Terranova, 1988). Un tercer complejo de glucoproteínas de membrana, denominado *antígeno de unión del substrato celular (CSAT Ag)* parece tener propiedades de receptor para la laminina y la fibronectina (Horwitz et al., 1985; Knudsen et. al., 1985). La identificación de múltiples receptores para la molécula de la laminina sugiere varias funciones de la glucoproteína, como por ejemplo:

- Estructura de la membrana basal
- Migración celular en el desarrollo
- Adhesión celular y polaridad
- Invasión y metástasis
- Enfermedades autoinmunes
- Interacciones hormonales
- Adhesión bacteriana
- Efectos anti-bacterianos y anti-tumorales
- Cicatrización

La laminina se ha observado inmunohistoquímicamente en el Carcinoma mucoepidermoide en tumores de glándulas salivales determinada por diversos anticuerpos, entre los que se encuentran MAM-3 y MAM-6 que pertenecen a un grupo

de antígenos de la membrana epitelial (EMA) de la membrana del glóbulo de la grasa de la leche humana (Taylor-Papadimitrou et. al., 1981; Hilkens et. al.,1984). los antígenos EMA, MAM-3 y MAM-6 han sido examinados en la saliva humana (Gusterson, et. al., 1982; Caselitz et. al., 1986) y lesiones obstructivas de las glándulas salivales (Tatemoto et. al., 1987).

## PROTEÍNA S-100

La proteína S-100 es una proteína soluble distribuida en varios tejidos, fue aislada por primera vez del cerebro de bovinos por Moore (Hara et al., 1983; Crocker et al., 1985; Nakazato et al., 1985). La proteína S-100 es termolabil y ácida; con un peso molecular de 20 kD . Muestra una marcada conservación de su secuencia de aminoácidos aunque existe una ligera variación en la estructura primaria entre diferentes especies (Jensen, 1985).

Isobe caracterizó bioquímicamente las dos subunidades conocidas de la proteína S-100, la cadena  $\beta$  (1978) y la cadena  $\alpha$  (1981) y ha demostrado que las cadenas  $\beta$  de S-100a y S-100b son idénticas (1981). Las cadenas  $\beta$  y  $\alpha$ , de sus 93 y 91 aminoácidos, 58% son homólogos y aparentemente con características funcionales similares (True, 1990).

Aunque se desconocen las funciones de la proteína S-100 en vivo se han sugerido algunas funciones como por ejemplo que es una proteína moderadora de la unión de calcio, lo cual puede influir en varias características de crecimiento de las células. Se cree que la proteína S-100 es un regulador de crecimiento (True, 1990).

También se han propuesto las siguientes funciones de la proteína S-100 (True, 1990):

1. Incrementar la permeabilidad de la membrana a los cationes bajo condiciones fisiológicas. La subunidad alfa puede estar involucrada en la regulación de electrolitos.
2. Estimula la actividad de la polimerasa RNA nucleolar.
3. Ser proteína mensajera de los ácidos grasos en adipocitos.

## ANTICUERPOS MONOCLONALES

El sistema inmune protege a todos los vertebrados de infecciones por microorganismos o parásitos que provocan una respuesta. Al igual que sustancias no infecciosas como proteínas y polisacáridos pueden inducir una respuesta inmune. Toda sustancia (viva o muerta) que induce una respuesta es denominada **antígeno** (anticuerpo generador). Los linfocitos son las células responsables de la especificidad inmune. Son producidos en la médula ósea y en los ganglios linfáticos y se especializan en los órganos linfoides [timo, ganglios linfáticos, bazo y apéndice (Alberts et al., 1989)].

El sistema inmune puede diferenciar entre antígenos de estructuras similares. Por lo que puede generar dos tipos de respuesta inmunológica: (1) respuesta de anticuerpos o respuesta humoral, a cargo de los linfocitos B (son producidos en la médula ósea del adulto o en el hígado fetal). Esta respuesta involucra la producción de **anticuerpos**, los cuales son proteínas denominadas **inmunoglobulinas (Igs)** que pueden encontrarse en el torrente sanguíneo o permanecer en otros fluidos corporales; (2) respuesta inmune mediada por células, producida por los linfocitos T (se desarrollan en el timo). Esta respuesta involucra la producción de células especializadas, las cuales reaccionan con antígenos extraños en la superficie de otras células huésped (Alberts et al., 1989).

Los linfocitos T y B morfológicamente son imposibles de diferenciar. Sólo pueden ser distinguidos posterior a un estímulo por antígenos. El linfocito B se transforma en célula plasmática y secreta anticuerpos conteniendo abundante retículo endoplásmico rugoso. En contraste, el linfocito T contiene muy poco retículo endoplásmico rugoso (Alberts et al., 1989).

Existen cinco clases de Igs y a su vez se han subclasificado por las características de su estructura básica siendo las siguientes: IgG (IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4), IgM, Iga (IgA1, IgA2 e IgA secretoria), IgD e IgE. La estructura básica de la Ig consiste de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas de polipéptidos iguales, unidas por puentes de disulfuro (Roitt et al., 1993).

El sistema inmune puede responder a diferentes millones de antígenos extraños con una alta especificidad. Esto puede ser explicado por la teoría de la selección de colonias en las cuales un antígeno activa solamente colonias específicas de células T o B. El

sistema inmune está constituido por millones de diferentes colonias de linfocitos. El término "colonia" (clonal) deriva de la selección de una colonia de acuerdo con el postulado que dice que el sistema inmune está formado de millones de diferentes familias o "colonias" (clones) de células cada una de las cuales consiste de linfocitos T o B que desciende de una misma célula progenitora (Alberts et al., 1989).

Muchos antígenos estimulan varias colonias diferentes de linfocitos. Muchas macromoléculas, incluyendo todas las proteínas y varios polisacáridos, pueden servir como antígenos. Estas partes de un antígeno están combinadas con el sitio estructural antigénico en una molécula de anticuerpo o en un linfocito receptor y son llamados **determinantes antigénicos** (o epitopes). Las moléculas con un sitio estructural antigénico específico que no puede inducir una respuesta inmune se llaman **haptenos**. Los haptenos son pequeñas moléculas orgánicas (Alberts et al., 1989).

Los anticuerpos defienden al organismo contra infecciones, desactivando las toxinas bacterianas y virus en colaboración con el sistema del complemento y varios tipos de células blancas destruyendo a los microorganismos y/o parásitos invasores. Los anticuerpos son producidos en millones de formas diferentes, cada una de las cuales tiene una secuencia de aminoácidos diferentes y un sitio estructural diferente para un antígeno (Alberts et al., 1989).

Los anticuerpos existen de muchas formas en un individuo no inmunizado, algunas formas constituyen menos de una parte en un millón de moléculas de Ig en la sangre. Las células del Mieloma múltiple secretan grandes cantidades de anticuerpos sencillos dentro de la sangre del paciente. Estos cuerpos son homogéneos o monoclonales. El cáncer es el resultado del crecimiento descontrolado de una línea celular. En el Mieloma múltiple, la célula individual es una célula plasmática que secreta anticuerpos. El anticuerpo se acumula en la sangre denominándose Proteína Mieloma; posteriormente pasa a la orina en donde es excretada. Esta proteína urinaria fué llamada proteína de Bence Jones (Alberts et al., 1989).

El estudio del Mieloma múltiple ha permitido el desarrollo de anticuerpos sencillos producidos por las células B, por unión de esta célula activada con un antígeno específico con una célula de Mieloma que no secreta anticuerpos. Esto resulta en la formación de hibridomas y así en la formación de anticuerpos monoclonales, los cuales son posibles de immortalizar (Alberts et al., 1989).

## PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

La técnica para producir anticuerpos monoclonales fue desarrollada por Köhler y Milstein (1975). Estos investigadores obtuvieron híbridos entre una colonia celular de plasmacitoma que producen anticuerpos específicos y Mielomas en respuesta a un antígeno determinado. Estos anticuerpos específicos producidos por un hibridoma se han denominado anticuerpos monoclonales (Kennett, 1979).

La producción de híbridos preliminares para la elaboración de anticuerpos en contra de un antígeno seleccionado es de suma importancia para la diferenciación entre los anticuerpos que reaccionan con el antígeno deseado y con los que reaccionan con otros antígenos a los cuales el ratón fue expuesto. Los hibridomas proporcionan una abundante cantidad de anticuerpos que pueden ser producidos sin la absorción de anticuerpos no deseados (Kennett, 1979).

Los anticuerpos monoclonales se pueden desarrollar dependiendo de las necesidades (Winter y Milstein, 1991). Las células plasmáticas normales expresan un anticuerpo resultando en el fenómeno de la exclusión alélica. En contraste cuando dos células de Mieloma se unen, se produce un híbrido, capaz de expresar co-dominantemente el gen de los anticuerpos de ambos padres (Köhler y Milstein, 1975). La técnica para producir anticuerpos monoclonales se usa basándose en el resultado de que cuando se fusiona con una célula de Mieloma y una célula esplénica de ratón inmunizado se produce un hibridoma (Köhler y Milstein, 1975).

La célula de Mieloma que se usa no secreta anticuerpos, así que los únicos anticuerpos producidos son esos que se han cultivado en la célula normal. Cada cadena de inmunoglobulina resulta de la expresión integrada de uno o varios genes que codifican una región variable (V) y una región constante (C) respectivamente. Cada célula expresa solamente uno de los dos posibles alelos (exclusión alélica). Cuando las células productoras de anticuerpos se unen, los productos de las líneas de ambos padres son expresados (Köhler y Milstein, 1975).

Esta técnica tiene varias ventajas (Köhler, 1986):

1. Especificidad, cada híbrido produce solamente un anticuerpo.
2. La producción ilimitada de anticuerpos. Los híbridos son células tumorales inmortales, que pueden ser congeladas, secretan de 10 a 50 mg de anticuerpos por

milímetro de medio de cultivo, e inyectados en ratones producen de 1 a 10 mg de anticuerpos por milímetro de fluido corporal.

3. Los antígenos impuros pueden generar con este método anticuerpos puros. Los anticuerpos monoclonales caracterizan solamente un antígeno de los muchos que pueden ser inyectados dentro del ratón.
4. Todas las especificidades pueden ser rescatadas, si una respuesta inmune puede darse en el ratón, los hibridomas específicos pueden ser derivados también.
5. Los hibridomas específicos pueden ser enriquecidos. Las células B son raras en la población celular del bazo de un ratón inmunizado. Por lo que es posible enriquecerlo con células B específicas.
6. Secreción con altos títulos de anticuerpos, al igual que puede provocarse una gran producción de células B.
7. Los anticuerpos pueden ser manejados. En las líneas celulares de hibridomas pueden provocarse mutaciones para la producción de anticuerpos no fundamentados en la naturaleza.
8. Este es un método general, que puede ser aplicado para el rescate de las funciones de los linfocitos T. Las líneas de hibridomas T secretan diferentes linfoquinas.

#### APLICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales pueden ser elaborados en contra de varios antígenos de superficie de células humanas (Reth et al., 1981) incluyendo antígenos en la diferenciación de los leucocitos (Kennett, 1979; Trucco et al., 1978), antígenos asociados a tumores (Kennett y Gilbert, 1979), para la especificidad de grupos sanguíneos (Kennett, 1979) y para los antígenos de histocompatibilidad humana (Parham y Bodmer, 1978).

Los anticuerpos monoclonales son utilizados en gran diversidad de trabajos:

1. Determinación de antígenos: Para la elaboración de clasificaciones más sencillas de bacterias, virus, parásitos y células. Por ésta técnica en los linfocitos T humanos se han detectado once antígenos de superficie. También han sido tipificados antígenos de histocompatibilidad y antígenos tumorales en la superficie celular.
2. Para purificación: De factores hormonales. Como enriquecimiento de interferón, purificación de membrana celular, como enriquecimiento del antígeno Ia de rata.

3. Para detectar y cuantificar: Combinaciones en bruto, como la gonadotropina coriónica humana en pruebas de embarazo.
4. Para mapear: Caracterización de epitopes, varios determinantes en la cadena u de ratón.
5. Para modificar: Infectividad como en el esporozoito del Plasmodium berghei. En la toxicidad de sobredosis con Digoxin. En funciones como del Ly2 supresor de los linfocitos T destructores y en la inmunogenicidad del factor Rhesus.
6. Para selección: Seleccionado idiotipos. En la supresión y realce de la respuesta inmune anti-NP (NP= 4-hidroxi-3 nitrofenilacetil)
7. Para localización: En órganos, como en el sistema nervioso de la sanguijuela. En cuerpos humanos, imágenes de tumores.

## ANTICUERPOS POLICLONALES

La inmunización exitosa en animales produce una variedad de anticuerpos con diferentes especificidades y afinidades de unión. Teóricamente el suero policlonal maximiza el número de anticuerpos que se unen a una molécula que tienen una pequeña repetición de epitopes. Los anticuerpos moléculo-específicos de diferente subclases pueden unirse a la molécula deseada. El antisuero policlonal se obtiene más rápido y fácilmente que los anticuerpos monoclonales (True, 1990).

Una desventaja significativa es la naturaleza heterogénea de anticuerpos policlones. Porque el suero es una mezcla de anticuerpos hacia varios epitopes del antígeno y para algunas moléculas (True, 1990).

## CROMÓGENOS

Las partes constituyentes de la célula y material intercelular son usualmente transparentes, y no existen diferencias apreciables en el índice de refracción por lo que son indistinguibles unos de otros. Existen tres clases de tinciones biológicas. La primera son las tinciones que utilizan desde uno o hasta tres colorantes para diferenciar el núcleo del citoplasma de las células y permite la diferenciación entre los diferentes tipos de tejido. La segunda categoría involucra el uso de tinciones especiales para demostrar la presencia de cierto tejido o sustancia. La tercera clasificación incluye métodos por impregnación de metales pesados. (Sheehan y Hrapchak, 1980).

Los colorantes pueden clasificarse además en: colorantes naturales y colorantes artificiales; dentro de estos últimos se clasifican los cromógenos utilizados en inmunohistoquímica. (Sheehan y Hrapchak, 1980).

Muchas combinaciones de cromógeno y parámetros de incubación han sido descritos para experimentos histoquímicos con Peroxidasa de rábano. La mayoría se basan en la benzidina mientras que otros emplean sustancias alternativas como 4-cloro-1-naftol (Warr, 1975), p-fenilenediamina y pirocatecol (Hanker et al., 1977) o ácido homovanílico y rodamina B. Los derivados de la benzidina que han sido utilizados para la histoquímica de Peroxidasa de rábano incluye tetracloruro de diaminobenzidina (Graham y Karnovsky, 1966; LaVail y LaVail, 1974; Adams, 1977; Streit y Reubi, 1977; Malmgren y Olsson, 1978; Itoh et al., 1979); dehidrocloruro de benzidina (Lynch et al., 1973; Mesulam, 1976; DeOlmos y Heimer, 1977) o-dianisidina (Dimetoxybenzidina) (DeOlmos, 1977); tetramethiybenzidina (Hardy y Heimer, 1977; Mesulam y Rosene, 1977; DeOlmos et al., 1978; Mesulam, 1978) y o-tolidina (dimetilbenzidina) (Somogyi et al., 1979). La mayoría de los procedimientos de diaminobenzidina producen una reacción de color café aunque el procedimiento de la o-diansidina produce un precipitado de color verde y otros métodos basados en derivados de la benzidina producen un precipitado de color azul.. (Mesulam, 1982)

Norgrem y Lehman (1990) propusieron el azul de indofeno en combinación con la DAB. El cual produce unos gránulos verdes o azules claros que son fácilmente distinguibles

del color café de la DAB. La desventaja de este método es que la reacción se pierde rápidamente por lo que las laminillas deberán ser observadas y fotografiadas inmediatamente después de ser montadas (Cuello, 1993).

Para seleccionar el cromógeno se deberán de tomar en consideración los siguientes factores (True, 1990):

1. Color: El color deberá contrastar con otros colores. Por ejemplo un cromógeno no café podría ser utilizado para contrastar con melanina y un segundo cromógeno de diferente color deber ser seleccionado para la inmunohistoquímica doble.
2. Solubilidad ante los deshidratantes y medios de montaje: Solo DAB forma precipitados, los otros cromogénos son solubles en solventes orgánicos.
3. Sensibilidad
4. Compatibilidad para microscopía electrónica

#### SUBSTRATOS PARA PEROXIDASA

CROMÓGENO	COLOR
Diaminobenzidina	Café
3-Amino-9-ethylcarbazole	Rojo
4-Cloro-1-Naftol	Azul
Alfa-naftol pironina	Rosa
Benzidina	Azul
p-fenilenediamina y pirocatecol	Negro
Tetrametilbenzidina	Azul
o-Dianisidina	Verde
Azul de indofeno	Azul/Verde claro

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los Adenomas Pleomorfos presentan clínicamente un comportamiento biológico muy variado, esto tiene una relación con las características histológicas y con los productos metabólicos de estas neoplasias, como puede ser la producción de membrana basal que es determinada por varios anticuerpos entre los que se encuentra la laminina, dado que la membrana basal juega un rol importante en el comportamiento biológico de las neoplasias la detección de laminina en los Adenomas Pleomorfos pudiera ser un factor predictor para establecer el comportamiento biológico de estos tumores.

## JUSTIFICACIÓN

Por lo anteriormente expuesto es importante y necesario establecer mecanismos que permitan determinar desde el momento de la toma de la biopsia o enucleación de la neoplasia establecer el grado de diferenciación celular en base a sus productos metabólicos como es el caso de la laminina, como un factor predictor.

## HIPOTESIS

Las hipótesis a probarse en este trabajo son:

H1: Los tumores de glándulas salivales que presentan mayor cantidad de material mixo-condroide muestran una menor reacción con el MoAb **laminina**.

H2: Aquellos tumores de glándulas salivales con mayor cantidad de estructuras ductiformes mostraran mayor respuesta a **laminina**.

Hn: Los adenomas pleomorfos con mayor o menor cantidad de material mixocondroide y estructuras ductiformes mostrarán la misma inmunoreacción con **laminina**.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar y cuantificar la respuesta inmunohistoquímica con el MoAb **laminina** en las neoplasias de glándulas salivales. Así como cuantificar células mioepiteliales con proteína **S-100**.

## OBJETIVOS ESPÉCIFICOS

1. Correlacionar la respuesta inmunohistoquímica de **laminina** y proteína **S-100** con las características microscópicas de los Adenoma pleomorfo.
2. Comparar la respuesta inmunohistoquímica a **laminina** y proteína **S-100** en Adenoma pleomorfo.

3. Cuantificar células mioepiteliales en los Adenomas pleomorfos de glándulas salivales.
4. Comparar, edad, sexo y tamaño del tumor con la respuesta inmunohistoquímica.

## MATERIALES Y METODOS

Se revisaron los archivos del Laboratorio de Patología Experimental de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, U.N.A.M. en busca de Adenomas pleomorfos, los casos que se seleccionaron fueron aquellos entre 1975 a la fecha y se encontraron 26 casos de Adenomas pleomorfos. Todas las muestras fueron fijadas en formalina y embebidas en parafina y se cortaron en secciones de  $4\mu$  en el Laboratorio de Patología Experimental de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, U.N.A.M. y en Laboratorio de Patología Experimental del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se colocaron dos secciones por portaobjetos. Todas aquellas secciones en las cuales se desprendió el tejido del portaobjetos fueron desechadas para evitar los resultados falsos positivos. Una vez obtenidas las laminilla se procedió a la observación de las mismas en el microscopio de luz. Para la cuantificación de células mioepiteliales con Proteína S-100 en Adenoma Pleomorfo nos valimos de un ocular cuadrulado y un contador manual. La cuantificación se hizo observando con el objetivo de 40x y con el citado ocular en cinco campos elegidos al azar y sólo se contaron las células mioepiteliales que se encontraron dentro del cuadrulado del ocular y se clasificaron de acuerdo a su tipo morfológico y se obtuvo el porcentaje de cada tipo morfológico de las células mioepiteliales. En todos aquellos casos en los cuales existió más de una laminilla se contaron las células de todas las laminillas del caso y se obtuvo un promedio.

En el caso de la laminina se observó la intensidad de la reacción y en la porción del tumor en que se localizó dicha reacción y se buscó la relación entre edad, sexo e intensidad de la reacción.

### PROCEDIMIENTO

**Técnica de inmunohistoquímica.** Se utilizaron los métodos de Avidina-Biotina con el anticuerpo policlonal S-100 y el método de Estreptavidina-Biotina para el anticuerpo monoclonal Laminina. Una vez obtenidas las secciones (las laminillas fueron tratadas

con Poly-L-Lisina), se procedió a desparafinar (xilol, dos cambios), se deshidrataron (alcohol de 100%, dos cambios; alcohol de 96%, dos cambios) y rehidrataron con agua corriente. Después de esto se colocaron en los vasos de Coplin conteniendo tripsina al 0.1% a 37° C durante 5 minutos. Se enjuagaron con agua bidestilada. En el caso de los tejidos que se tiñeron con laminina se realizó un tratamiento con el buffer de citratos este consistió en sumergir las laminillas en este buffer y meterlas al horno de microondas durante 3 minutos a 600 W; una vez transcurridos los 3 minutos se sacaron del horno y se dejaron a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Después de esto se colocaron las secciones dentro de las cámaras húmedas, las cuales tenían en el fondo gasa humedecida con agua bidestilada, lo cuál permitió mantener un ambiente húmedo, evitando así la desecación del tejido, a los tejidos tratados con S-100 se les inhibió la peroxidasa en este momento con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante cinco minutos, después de esto se enjuagaron con PBS-Triton se drenaron las secciones y se les colocó el suero normal durante 30 minutos. Posteriormente se drenó el exceso de suero y sin enjuagar se le agregaron los anticuerpos primarios (S-100 y Laminina) y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente.

Al día siguiente las secciones se lavaron con PBS-Triton y se aplicaron los anticuerpos secundarios y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después las secciones se lavaron con PBS-Triton. (En el caso de laminina hasta este paso fue cuando se inhibió la peroxidasa endógena durante 5 minutos, posteriormente se enjuagaron con PBS Tritón). Después se aplicó el complejo ABC (S-100) y la Estreptavidina (Laminina) durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron con PBS-Triton y se les añadió su respectivo sustrato de DAB, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Las secciones se lavaron con agua bidestilada y se contrastaron con Hematoxilina de Harris.

## MATERIAL

### EQUIPO

Balanza

Tina de flotación

Histokinette

Micrótomo y cuchillas

Afilador de cuchillas

Plancha

Potenciometro

Microscopio (Carl Zeiss)

Ocular cuadriculado

Contador manual

Fotomicroscopio (Carl Zeiss Photolab)

Refrigerador

Horno de microondas

Parrilla

Termometro

Batería y tinción con Hematoxilina y Eosina

Canastillas para tinción

Camaras húmedas

Jeringa de 25  $\mu$ l (Hamilton)

Pinzas

## **CRISTALERIA**

Portaobjetos con pantalla

Cubreobjetos

Frasco de Coplin

Vaso de precipitado de 500 ml

Vaso de precipitado de 600 ml

Matraz Erlenmeyer de 1000 ml

Matraz Erlenmeyer de 500 ml

Matraz Erlenmeyer de 100 ml

Probeta de 500 ml

Probeta de 100 ml

Probeta de 50 ml

Pipeta de 10 ml

Pipeta de 1 ml

Cajas de cristal

Canastillas de cristal

## **OTROS ACCESORIOS**

Botella de plástico de 100 ml

Botella de plástico de 50 ml

Recipientes de plástico

## REACTIVOS

Tripsina  
Hematoxilina de Harris  
Eosina  
Acido cítrico  
Citrato de sodio  
Carbonato de Litio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ )  
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )  
Cloruro de Potasio ( $\text{KCl}$ )  
Fosfato de sodio monobásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ )  
Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  
Poly-L-Lisina (SIGMA, Chemical Co.)  
Alcohol de 96°  
Alcohol absoluto  
Xilol  
Acido clorhídrico ( $\text{HCl}$ )  
Hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )  
Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )  
Triton X-100 (SIGMA, Chemical Co.)  
Tetracloruro de diaminobenzidina [diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)]  
Agua bidestilada  
Agua desionizada

## ANTICUERPOS

Los anticuerpos se mantienen en refrigeración a 4°C  
Laminina (DAKO Corporation)  
Proteína S-100 (DAKO Corporation)  
Vectastain ABC kit (Rabbit IgG) (Vector Laboratories inc. USA)  
DAKO LSAB + Kit, Peroxidase K0679 (DAKO Corporation)

## **PREPARACIÓN DE SOLUCIONES**

### **TRIPSINA AL 0.1%**

Para preparar 50 ml

Se pesan 5 mg de tripsina y se disuelven en 50 ml de agua bidestilada.

**PERÓXIDO DE HIDRÓGENO AL 3%** (Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena)

Para preparar 100 ml. A 97 ml de agua bidestilada se le agregan 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADA [PHOSPHATE BUFFER SALINE (PBS)]**

Preparación de 1 litro de PBS

1) Pesar:

7.75 g. NaCl

0.20g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O

1.50g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2) Disolver: Los reactivos se colocan en un matraz y se disuelven en 1000 ml de agua bidestilada.

3) Medir pH: Se mide el pH el cuál debe ser entre 7.2 y 7.6.

Si el pH es menor de 7.2-7.6 se usa el ion NaOH (Hidróxido de sodio)

Si el pH es mayor de 7.2-7.6 se agrega Hcl (ácido clorhídrico).

### **BUFFER DE CITRATOS**

Preparar las siguientes soluciones:

A) Solución de ácido cítrico (Esta se prepara disolviendo 21.01g de ácido cítrico en 1000 ml)

B) Solución de citrato de sodio (Se disuelven 29.41 g de citrato de sodio en 1000 ml)

La solución de trabajo se prepara con 9 ml de la solución A + 41 ml de la solución B, y aforar a 500 ml.

### PBS -TRITON

Para prepara un litro de PBS-Triton

A un litro de PBS se le agrega 1 ml de Triton X-100.

### SUERO NORMAL

Agregar 3 gotas (150  $\mu$ l) del suero stock (bote amarillo del paquete de Vectastain ABC) a 10 ml de buffer. De preferencia el suero normal debera ser preparado de la misma especie del que es preparado el anticuerpo biotinilado secundario.

### ANTICUERPOS PRIMARIOS

El anticuerpo S-100 se usó en una dilución de 1:80.

El anticuerpo laminina se usó en una dilución de 1:30

### ANTICUERPO BIOTINILADO

Agregar 3 gotas del suero stock (bote amarillo del paquete de Vectastain ABC) a 10 ml de buffer y después agregar 1 gota del anticuerpo stock biotinilado (Bote azul).

### REACTIVO ABC

Se agregan 2 gotas del reactivo A a 5 ml de buffer y después se agregan 2 gotas del reactivo B se mezcla perfectamente y no deberá ser utilizada la mezcla antes de 30 minutos.

### PREPARACIÓN DEL SUBSTRATO DAB

Esta es la preparación del substrato DAB cuando se utilizó el anticuerpo S-100.

10 ml de PBS

5  $\mu$ g de DAB

30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Esta solución deberá ser filtrada antes de ser utilizada.

Cuando se utilizó el anticuerpo laminina se hizo lo siguiente

Por cada ml del buffer (bote número 5) del LSAB + Kit se agrega 1 gota del substrato DAB (bote número 6) del mismo Kit..

# RESULTADOS

## GLÁNDULAS SALIVALES NORMALES

Las glándulas salivales normales reaccionaron de manera positiva al MoAb laminina sobre las membranas basales que delineaban los ductos y los acinos mucosos. También se observó positividad en vasos sanguíneos.

S-100 fue ligeramente positiva en células que delineaban los conductos y en fibras nerviosas.

## **ADENOMA PLEOMORFO**

### **Caso FO7177 A-F**

Lesión localizada en glándula parótida.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** La muestra observada corresponde a una neoplasia benigna originada en epitelio glandular, está compuesta por células epiteliales de diversas formas como: poliedricas (con aspecto epidermoide), fusiformes huso, redondas, de núcleo grande intensamente teñido y citoplasma eosinófilo, organizadas en láminas, cordones y nidos o islas grandes y pequeñas, sólidos o con estructuras ductales que contienen coágulos eosinófilos en el interior. Entre las islas de células se encuentran bandas de tejido conectivo con aspecto hialino. También se observaron algunas células estrelladas en forma aislada en zonas de aspecto hialino, mixoide, condroide y mucoide correspondiendo al estroma metaplásico que compone a la lesión. Se observaron algunas zonas de necrosis.

**Tinción inmunohistoquímica.** Se observó una reacción de moderada a fuerte (2-3+) con MoAb laminina en estructuras ductales y se observó una reacción heterogénea en la porción epitelial de la muestra.

La proteína S-100 reaccionó de forma fuerte (3+) en las células que delimitaban a las estructuras ductales, así como en células mioepiteliales de aspecto condromixoide en áreas mixoidales. Una reacción moderada (2+) se observó en células fusiformes y plasmocitoides en zonas hialinizadas. De las 1215 células examinadas el 19.75% (240 células) reaccionó positivamente a la proteína S-100.

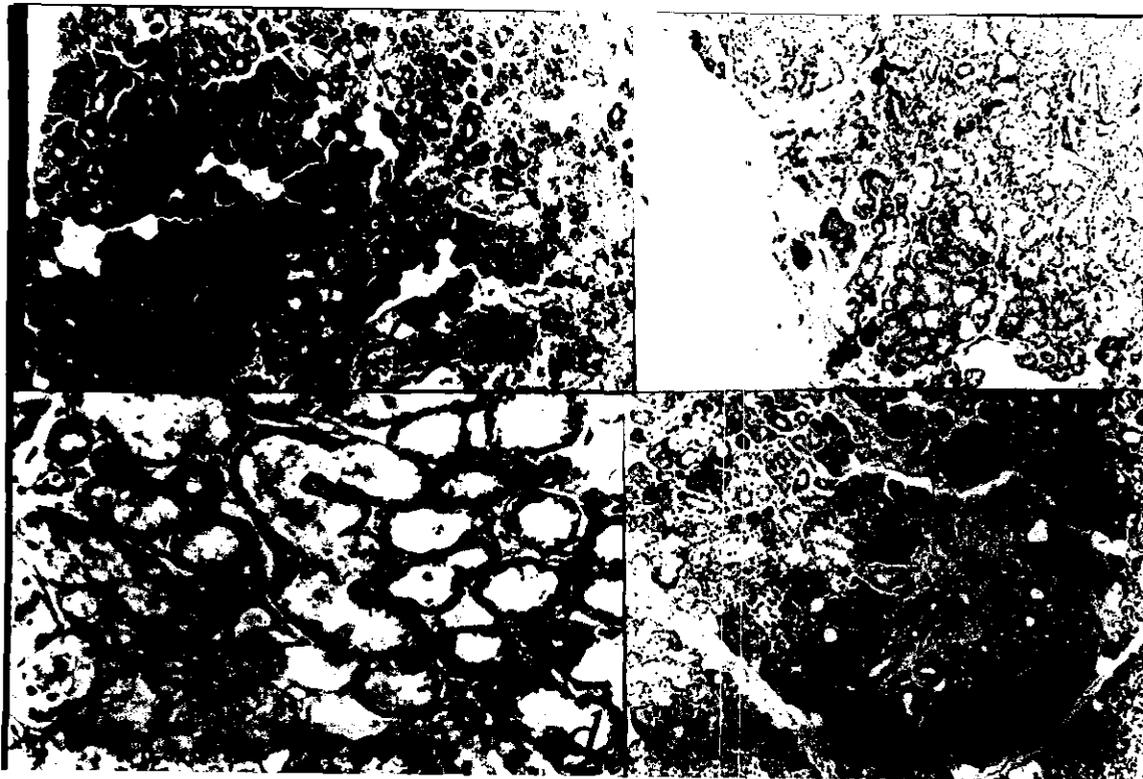
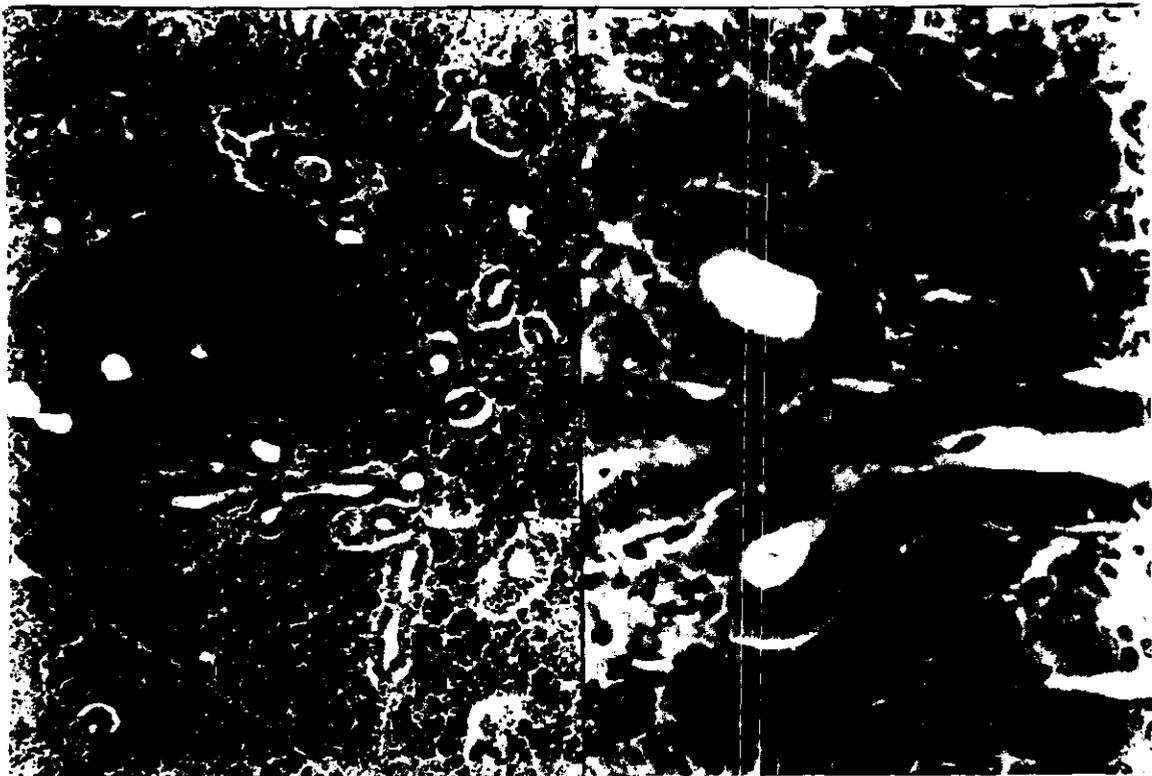


Fig. 1. Inmunoreacción de las glándulas salivales normales con el anticuerpo monoclonal Laminina y Proteína S-100: (a y b) Se observa que la Laminina reacciona (3+) en los conductos estriados e intercalares, (c y d) Se observa reacción (3-4+) en conductos y acinos mucosos y (e y f) La Proteína S-100 reacciona (1+) sobre las células que delineaban los conductos.

#### Caso FO6383

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** Se revisó espécimen con características de una neoplasia derivada de tejido glandular, altamente celular con estroma metaplásico. La mayor parte de la neoplasia está formada por células redondas de citoplasma claro, vacuolado y núcleo central picnótico, en forma aislada o en grupos, intercalados con células fusiformes y poligonales de núcleo intensamente basófilo, con poco citoplasma eosinófilo, con aspecto epidermoide. Las células se agruparon en cordones, nidos sólidos grandes y pequeños, no presentó estructuras ductiformes bien definidas, entre éstas agrupaciones se encuentra material hialinizado. El estroma estaba compuesto por tejido conectivo laxo con zonas hialinas, mucoides y mixoides. Esta neoplasia mostró variedad de células claras.

**Tinción inmunohistoquímica.** Con laminina se observó una reacción de fuerte a muy fuerte (3-4+) en células de tipo fusiforme. Una reacción de moderada a fuerte (2-3+) se observó en estructuras vasculares y fue escasa en estructuras ductales.

Con proteína S-100 se observó una reacción leve ya que sólo el 5.52% (28 células) de las 507 células examinadas fueron positivas a S-100. de estas el 42.85% (12 células) fueron del tipo plasmocitoide, el 35.71% (10 células) fueron del tipo condromixoide y el 21.42% (6 células) fueron del tipo fusiforme.

#### Caso FO14385

Paciente masculino de 19 años de edad con lesión localizada en la unión del paladar duro y blando.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El tejido examinado correspondió a una neoplasia benigna de epitelio glandular, altamente celular, con células poliédricas, fusiformes, redondas y de tamaño variable, con núcleo intensamente basófilo, escaso citoplasma eosinófilo. También se observaron algunas células de citoplasma claro, vacuolado, tipo mucosecretor en forma aislada o en grupos (variedad de células claras) junto con las células epiteliales que forman nidos o islas compactas o con pequeñas estructuras ductiformes no muy bien definidas. Con poco estroma laxo, zonas hialinas y mixoides con células estrelladas.

**Tinción inmunohistoquímica.** Con el MoAb laminina se presentó una reacción fuerte (3+) en las escasas estructuras vasculares que se presentaron en la muestra.

Con S-100 se observó una reacción fuerte (3+) y el 63% (617 células) de las 973 células examinadas fueron positivas. De estas el 65% fueron del tipo plasmocitoide, el 25% del tipo fusiforme y el 10% del tipo condromixoide.

#### **Caso FO5887.**

Paciente masculino de 30 años de edad con lesión localizada en el labio superior.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** Se observó una neoplasia benigna de epitelio glandular, muy celular. Compuesto por células epiteliales con forma poliédrica, cuboidal, columnar y algunas fusiformes, agrupadas en cordones, láminas y nidos o islas con estructuras ductiformes y túbulo-ductales, con coágulos eosinófilos. También fueron observadas formaciones de micro y macroquistes, metaplasia escamosa con formación de perlas de queratina. El estroma de tejido conectivo laxo, contiene haces gruesos de colágena, algunos hialinizados. Cubriendo a la neoplasia se observó una cápsula fibrosa.

**Tinción inmunohistoquímica.** Con el anticuerpo anti-laminina esta neoplasia fue negativa.

Con S-100 se observó muy leve (+) y solo el 3.04% (18 células) de las 591 células examinadas fueron positivas. El 100% de estas células fueron fusiformes.

#### **Caso FO6287**

Paciente masculino de 14 años de edad con lesión localizada en la región geniana izquierda.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.**

El espécimen examinado correspondió a una neoplasia benigna de tejido glandular, formada por células epiteliales de forma poliédrica, cuboidal, columnar, fusiforme y estrellada, arregladas en nidos, láminas y cordones, formando estructuras ductiformes algunas con coágulo eosinófilo con arreglo mixoide y condroide. Se observó un fragmento de cápsula infiltrada por células neoplásicas.

**Tinción inmunohistoquímica.** Se observó una reacción moderada (2+) al MoAb laminina en conductos estriados e intercalados así como en algunos nidos de células.

Con S-100 reaccionó de forma moderada a fuerte (2-3+) principalmente en células que delimitaban o formaban ductos estas constituyeron el 44.64% (50 células) de las células examinadas, las células plasmocitoides positivas constituyeron el 35.71% (40 células) , las células fusiformes positivas fueron el 13.39% (15 células) y el 6.25% fueron del tipo condromixoide (7 células). El 44.44% (112 células) de las 252 células examinadas fueron positivas a S-100.

#### **Caso FO20687 A-B**

Paciente femenino de 48 años de edad con lesión localizada en paladar del lado derecho.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** Se observó una neoplasia de epitelio glandular, moderadamente celular, constituida por cordones, láminas y nidos celulares compactos o con formaciones ductiformes y estructuras tubulo-ductales, conteniendo coágulos eosinófilos. Las células son de forma poligonal cúbica, fusiforme de núcleos grandes hipercromáticos, con escaso citoplasma eosinófilo y algunas células con forma estrellada entre el estroma de tejido conectivo laxo, hialino, firoso y mucoide. También se observaron células adiposas e infiltrado inflamatorio crónico. La neoplasia se encontró rodeada por una cápsula fibrosa.

**Tinción inmunohistoquímica.** Se observó una reacción difusa de moderada a fuerte (2-3+) en nidos y cordones de células. Se observó una reacción de muy leve a leve (+1+) en conducto con el MoAb laminina..

Con S-100 se encontró una reacción de moderada a fuerte (2-3+) en células que se encontraban rodeando estructuras ductales. Se observaron nidos de células que fueron positivos. El 27.20% (117 células) de las 430 células examinadas fueron positivas.

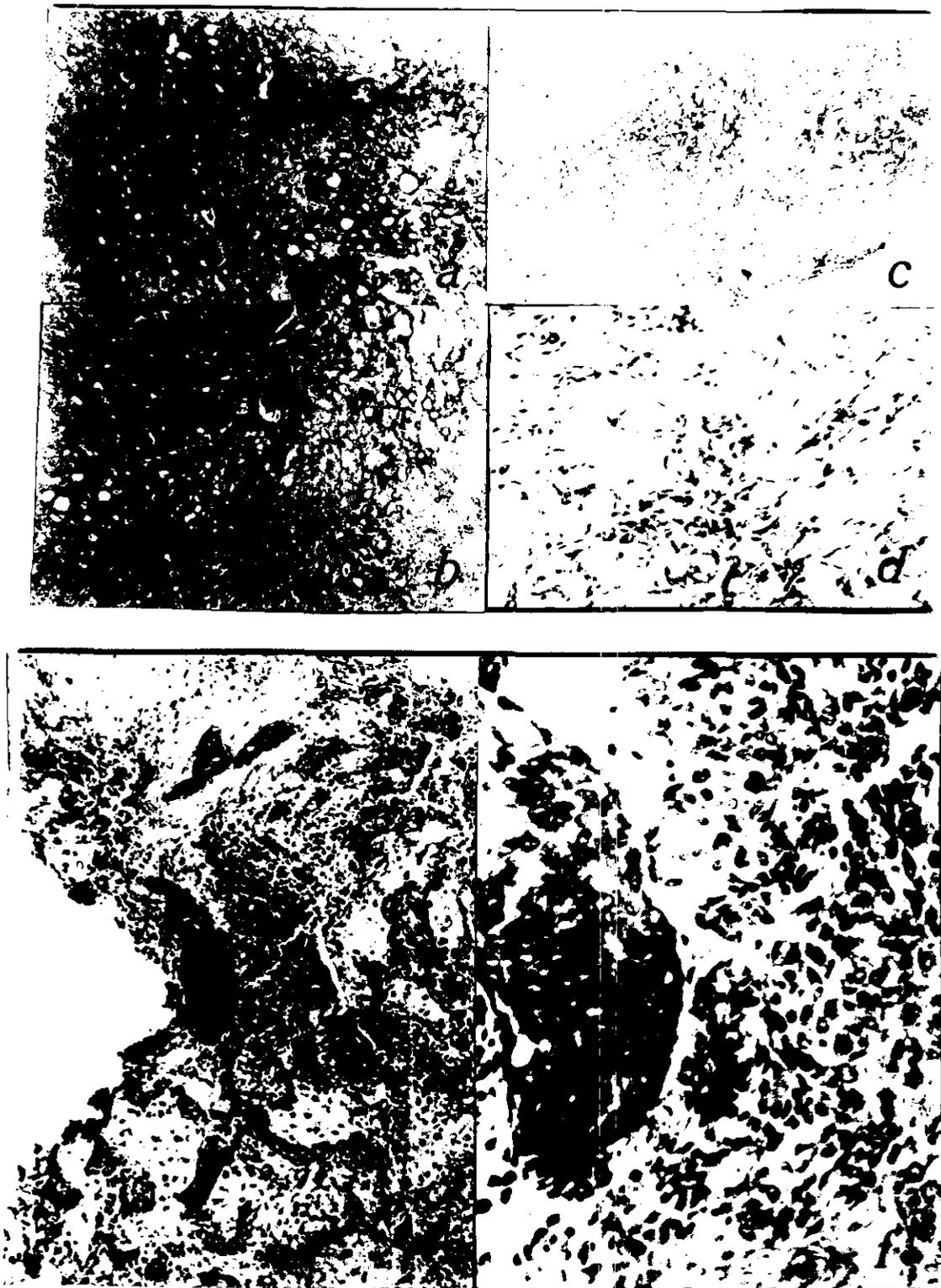


Fig. 2. (a y b) Cortes histopatológicos teñidos con H y E de un adenoma pleomorfo donde se observan numerosas estructuras ductales, vasculares y zonas de aspecto hialino; (c y d) Se observa una reacción (3+) de las estructuras ductales y vasculares con Laminina en la misma neoplasia y (e y f) Se observa una reacción (3-4+) con Laminina en porciones de epitelio, estructuras vasculares y células epiteliales en adenoma pleomorfo.

#### **Caso FO25287**

Paciente femenino de 47 años de edad con lesión localizada en la mucosa bucal izquierda.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** La revisión microscópica permitió observar una neoplasia de epitelio glandular, compuesta principalmente por tejido metaplásico de aspecto condroide y mixoide, con células condroides, estrelladas, fusiformes y redondas en forma aislada y en pequeños grupos, ocupando la parte central de la neoplasia. La zona celular está compuesta por células epiteliales poligonales, fusiformes de núcleos hipercromáticos y escaso citoplasma, formando laminas, cordones y nidos compactos o con estructuras ductiformes. En la periferia de la neoplasia se encontraron islas celulares conteniendo en el centro material condroide o mucoide. El estroma de tejido conectivo laxo se encontró hialinizado en la mayor parte. La neoplasia se encontró cubierta por una cápsula fibrosa infiltrada en algunas áreas por células neoplásicas.

**Tinción inmunohistoquímica.** Esta neoplasia fue negativa con laminina.

Con S-100 se vió una reacción de moderada a fuerte. El 21.53% (70 células) de las 325 células examinadas fueron positivas. De éstas el 15% (11 células) fueron del tipo condromixoide, el 47.14% (33 células) fueron del tipo plasmocitoide y el 37.44% (26 células) fueron del tipo fusiforme

#### **Caso FO31487.**

Paciente femenino de 18 años de edad con lesión localizada en zona de paladar duro.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** Se observó la presencia de una neoplasia benigna de tejido glandular, altamente celular, algunas células con forma plasmocitoide, fusiforme, estrellada, poliédrica, de núcleo central grande e hipercromático y citoplasma eosinófilo. Otras células observadas, muestran aspecto basaloide con núcleo polarizado e hipercromático acomodadas en empalizada. Las otras células formaron cordones y nidos compactos o con estructura ductales que contenían secreción eosinófila. También se observaron zonas con edema. Mostró escaso estroma de tejido conectivo laxo, con zonas hialinas, mixoides, mucoides y zonas de hemorragia.

**Tinción inmunohistoquímica.** Con el MoAb laminina se observó una reacción muy fuerte (4+) en estructuras vasculares y una reacción moderada (2+) en las estructuras ductales.

Con S-100 se observó una reacción fuerte (3+) sobre células. De las 887 células examinadas 162 células (18.26%) fueron positivas. 35 células (21.6%) fueron del tipo condromixoide, 119 células (73.45%) fueron plasmocitoides, 4 células (2.46%) del tipo fusiforme e igual porcentaje de células de tipo epitelial fue observado.

#### **Caso FO13588**

Paciente masculino de 28 años de edad con lesión en la glándula parótida del lado izquierdo

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El estudio microscópico reveló la presencia de una lesión neoplásica benigna originada en tejido glandular, poco celular, compuesta principalmente por un estroma metaplásico, con características condroides, mixoides y mucoides. Entre este tejido metaplásico se encontraron células epiteliales de forma (fusiformes, poliédricas) y tamaño variable, acomodadas en bandas, nidos grandes y pequeños. Se observó un tipo de célula de aspecto ductal con citoplasma ligeramente basófilo y núcleo central formando estructuras ductiformes con y sin lúmen. Algunas células aisladas con forma estrellada y condroide se localizaron entre el tejido metaplásico. La neoplasia se encontró dividida en lóbulos por bandas gruesas de fibras de colágena gruesas, algunas hialinizadas, con infiltrado inflamatorio crónico. La neoplasia se encontró parcialmente cubierta por una cápsula fibrosa.

**Tinción inmunohistoquímica.** Se observó una reacción de moderada a fuerte (2-3+) con el MoAb laminina en las escasas estructuras vasculares que se encontraron en las áreas mixoides de la neoplasia.

Con S-100 se observó una fuerte reacción y el 213 células (40.72%) de las 523 células examinadas fueron positivas. Las células condromixoides conformaron el 71.36% (152 células), las células fusiformes constituyeron el 20.65% (44 células) y el 7.98% (17 células) fueron células fusiformes.

#### **Caso FO4690**

Paciente de sexo femenino de 39 años de edad con lesión localizada en glándula submandibular izquierda.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** Se observó la presencia de una neoplasia benigna formada por gran cantidad de tejido de aspecto mixoide, condroide, abundantes islas de epitelio, formando cordones, láminas o nidos dispersos por toda la neoplasia, en ocasiones formaban estructuras ductiformes.

**Tinción inmunohistoquímica.** Con laminina se observó una reacción positiva de moderada a fuerte (2-3+) en estructuras vasculares y ductales así como en los nidos de células epiteliales. En áreas mixoides se observó una reacción moderada (2+) en las células condromixoides y fusiformes.

Con S-100 el 67.27% (479 células) de las 712 células fueron positivas aunque con una intensidad moderada. El 35.69% (171 células) fueron células condromixoides, 33.19% (159 células) pertenecieron al tipo plasmocitoide, el 20.25% (97 células) fueron fusiformes y el 10.85% (52 células) pertenecieron al tipo epitelial.

#### **Caso FO9290**

Paciente de sexo femenino de 49 años de edad con lesión localizada en glándula parótida derecha.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** Se observó la presencia de una neoplasia benigna de origen epitelial glandular formada por abundantes islas de grupos pequeños, nidos cordones, estructuras compactas de diferente forma y tamaño, además de estructuras ductiformes de diferente calibre, algunas con crecimientos papilares intraluminales, inmersas en un estroma de tejido que en ocasiones fue basófilo de aspecto condroide, mixoide o mucinoso, en otras áreas principalmente en los grupos celulares grandes fue eosinófilo acelular que las rodeaba por completo o pareció tener aspecto osteoide, también se identificó la cápsula de tejido conjuntivo, libre de células neoplásicas y tejido glandular parotídeo.

**Tinción inmunohistoquímica.** Esta neoplasia fue negativa con laminina.

Se observó una reacción de leve a fuerte (1-3+) con S-100. De las 914 células examinadas el 30.63% (280 células) fueron positivas. El 27.14% (76 células) fueron condromixoides,

el 58.21% (163 células) fueron células plasmocitoides, el 12.5% (35 células) fueron células fusiformes y el 2.14% (6 células) fueron células del tipo epitelial.

#### **Caso FO17490**

Paciente masculino de 32 años de edad.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina** Se observó la presencia de una neoplasia de epitelio glandular, formada por densas láminas de células poliédricas de citoplasma eosinófilo y núcleo oval, las células tienden a la formación de estructuras ductiformes de tamaño variable, algunas de apariencia quística y ocupadas por material de aspecto mucoso. En algunas áreas se observó degeneración mixoide abundante. El estroma es de tejido fibroso, el cual muestra signos de hialinización. La lesión estaba rodeada por una cápsula de tejido fibroso laxo en la que se aprecian discretas islas de epitelio neoplásico.

**Tinción inmunohistoquímica.** Con el MoAb laminina se observó una leve reacción en estructuras vasculares.

No se observó reacción a S-100.

#### **FO29690**

Paciente de sexo femenino de 20 años de edad con lesión localizada en glándula submandibular.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen representó una neoplasia benigna bien encapsulada, formada por células epiteliales que se arreglan en masas sólidas, conductos, hileras, nidos, cordones algunas se encuentran aisladas y toman una forma estrellada, existió gran cantidad de material extracelular de aspecto mixoide, condroide, osteoide y hialino. Se observó tejido glandular predominantemente de secreción serosa, con algunos acinis mucosos, ligera sialoadenitis, sialodoquitis y sialectasia.

**Tinción inmunohistoquímica.** Con laminina se observó una reacción de moderada (2+) a fuerte (3+) en estructuras vasculares, también se observó reacción en células fusiformes, plasmocitoides y condromixoides en la área mixoidal del tumor.

Con S-100 se observó una reacción de moderada (2+) a fuerte (3+). De las 410 células examinadas el 38.29% (157 células) fueron positivas a S-100. El 71.33% (112 células)

fueron plasmocitoides, el 17.19% (27 células) fueron fusiformes, el 10.82% (17 células) pertenecieron a condromixoides y el 0.63% (1 célula) del tipo epitelial.

#### **Caso FO13191**

Paciente femenino de 28 años de edad con lesión localizada en glándula submandibular derecha.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** Se observó la presencia de una neoplasia formada por células epiteliales, agrupadas, en grupos con aspecto plasmocitoide, láminas, ductos, algunos con coágulo eosinófilo, áreas de aspecto mixoide y condroide. Se observó una cápsula de tejido conjuntivo fibroso laxo, con abundante infiltrado neoplásico y tejido glandular de secreción mixta con infiltración grasa.

**Tinción inmunohistoquímica.** Las estructuras ductales y vasculares mostraron una reacción fuerte con el MoAb laminina, estas estructuras se encontraron en áreas mixoides.

Con S-100 se observó una reacción de moderada a fuerte. De las 761 células examinadas el 31.01% (236 células) fueron positivas. De estas el 38.55% (91 células) fueron condromixoides, el 34.32% (81 células) fueron plasmocitoides, el 25% (59 células) fueron fusiformes y el 2.11% (5 células) fueron epiteliales.

#### **Caso FO19692**

Paciente femenino de 72 años de edad.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen examinado estaba formado por una neoplasia benigna constituida por células epiteliales que formaban numerosos conductos de calibre variado y contenían en ocasiones un coágulo eosinófilo o basófilo de aspecto homogéneo. Existieron áreas de aspecto condroide y mixoide, zonas de metaplasia escamosa áreas de aspecto fibromatoso, fibrosis, células de aspecto poligonal, fusiforme, cúbico, columnar, oval, redondeada y otras con aspecto plasmocitoide, en otras zonas se encontraban arremolinadas. La cápsula estaba formada por haces gruesos de colágena, la mayor parte de ellos hialinizados, fibroblastos, capilares, nervios, arteriolas, vénulas, islas de células neoplásicas y tejido glandular de tipo seroso.

**Tinción inmunohistoquímica.** Al anticuerpo laminina esta neoplasia presento una reacción moderada en células fusiformes y condromixoides.

Al anticuerpo S-100 las células mioepiteliales reaccionaron de forma moderada a fuerte. El 40.19% (252 células) de las 627 células examinadas fueron positivas; el 58.33% (147 células) fueron plasmocitoides, el 20.23% (51 células) fueron células fusiformes, el 14.68% (37 células) lo formaron células condromixoides y el 6.7% (17 células) fueron células del tipo epitelial.

#### **Caso FO29393**

Paciente del sexo femenino de 52 años de edad con lesión localizada en la unión de paladar duro y blando

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen examinado está compuesto principalmente de masas sólidas de células epiteliales, algunas forman estructuras tubulares llenas de un coágulo eosinófilo. Se entremezcla con tejido conectivo fibroso denso con zonas de hialinización. La lesión esta parcialmente encapsulada por una banda de tejido conjuntivo fibroso denso bien vascularizado.

**Tinción inmunohistoquímica.** Esta neoplasia presentó reacción fuerte en las estructuras vasculares, se observó reacción en los límites de espacios quísticos así como una ligera reacción heterogénea.

No se observó reacción con S-100.

#### **Caso FO01094 A-C**

Paciente femenino de 35 años.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen examinado está compuesto por abundante tejido mixoide que se entremezcla con células epiteliales, dispuestas en cordones, tiras, conductos. También se observa tejido glandular seroso y tejido conjuntivo fibroso denso bien vascularizado.

**Tinción inmunohistoquímica.** Las células condromixoides que se encontraron en áreas mixoidales mostraron una respuesta moderada (2+) a la laminina.

Con S-100 se observó una reacción no muy intensa ya que varió entre leve (1+) y moderada (2+) pero el 80.59% (108 células) de las 134 células examinadas fueron

positivas. De estas el 81.48% (88 células) fueron células condromixoides, el 12.96% (14 células) del tipo fusiforme y el 5.55% (6 células) del tipo plasmocitoide.

#### **Caso FO34294**

Paciente del sexo femenino de 49 años de edad con lesión localizada en la unión de paladar duro y blando

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen examinado está compuesto por masa sólida de células epiteliales, de aspecto monomorfo, también se formaron algunas estructuras ductiformes que se entremezclan con escaso estroma de tejido conjuntivo hialinizado. También se observó tejido glandular mucoso y epitelio de mucosa superficial de aspecto normal.

**Tinción inmunohistoquímica.** Esta neoplasia fue negativa para ambos anticuerpos.

#### **Caso FO35794 A-C**

Paciente femenino de 29 años de edad con lesión localizada en paladar blando.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen examinado está compuesto por masas sólidas de células epiteliales, que también forman estructuras ductiformes y microquísticas. Se entremezclan con tejido conjuntivo hialino y mixoide. También posee una cápsula de tejido conjuntivo fibroso denso, bien vascularizado con infiltración de células epiteliales y calcificaciones basófilas. También se observaron fragmentos de tejido glandular de tipo mucoso de aspecto normal.

**Tinción inmunohistoquímica.** Las estructuras vasculares y ductales reaccionaron de forma moderada (2+) a la laminina, también se observó una leve reacción heterogénea.

Con S-100 se observó una reacción moderada (2+) y de las 773 células examinadas el 21.73% (168 células) fueron positivas, de estas el 75.59 (127 células) fueron células plasmocitoides, el 5.35% (9 células) fueron células fusiformes, el 11.90% (20 células) fueron condromixoides y el 7.1% (12 células) fueron células del tipo epitelial.

#### **Caso FO5195**

Paciente del sexo femenino de 44 años de edad con lesión localizada en el paladar duro.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen examinado muestra células epiteliales poliédricas formando nidos , cordones ductos que se entremezclan con un estroma hialinizado. Se observó una cápsula parcial de tejido conjuntivo.

**Tinción inmunohistoquímica.** De 305 células examinadas el 7.86% (34 células) reaccionó de forma positiva con S-100. El 35.29% (12 células) fueron condromixoides, el 35.29% (12 células) fueron plasmocitoides, el 11.76% (4 células) fusiformes y el 17.64% (6 células) pertenecían al tipo epitelial

Con laminina la neoplasia fue negativa.

#### **Caso FO38195**

Paciente del sexo femenino de 51 años de edad con lesión localizada en la unión de paladar duro y blando del lado derecho.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen examinado está compuesto por masas irregularmente dispuestas de células epiteliales poliedricas, algunas formando ductos, nidos y cordones, entremezcladas con tejido de aspecto mixoide. Se observó una delgada cápsula de tejido conjuntivo fibroso denso, bien vascularizado y con infiltración epitelial.

**Tinción inmunohistoquímica.** Esta neoplasia mostró una reacción entre moderada y fuerte ante S-100 y de las 701 células examinadas el 10.55% (74 células) reaccionaron positivamente de estas el 60.81% (45 células) fueron plasmocitoides, el 29.72% (22 células) condromixoides y fusiformes el 9.45% (7 células).

Se observó una reacción de moderada (2+) a muy fuerte (4+) en estructuras ductales y en algunas células del tipo plasmocitoide y algunas fusiformes en las áreas mixoidales. En algunos se encontró reacción delimitando nidos y cordones de células epiteliales.

#### **Caso FO02396 A-B**

Paciente femenino de 39 años de edad con lesión localizada en paladar.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen examinado estuvo compuesto por una masa de células poliédricas de aspecto mioepitelial con escaso tejido conjuntivo fibroso entre ellos.

**Tinción inmunohistoquímica.** Se observó una reacción heterogénea leve (1+) y difusa en toda la muestra para laminina. Así como en las escasas estructuras vasculares y ductales.

La muestra fue negativa para S-100.

#### **Caso FO10596**

Paciente del sexo masculino de 21 años de edad con lesión localizada en región yugal derecha.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen examinado consistió en una masa formada por gran cantidad de células poligonales, fusiformes algunas, otras redondas, formando grupos compactos de diferente tamaño y forma, existieron numerosas estructuras ductiformes revestidas por células cúbicas o planas bi- o mono-estratificadas que contenían un coágulo eosinófilo y poseían estructuras papilares. Se encontraron áreas de aspecto condroide o mucóide, perlas de queratina y escaso estroma de tejido conjuntivo fibroso en ocasiones hialinizado. Se pudo identificar una delgada cápsula de tejido conjuntivo con invasión neoplásica, tejido glandular mucosecretor y nódulos linfáticos.

**Tinción inmunohistoquímica.** El 8.9% (60 células) de las 674 células examinadas reaccionó positivamente a S-100 y de estas 36.66% (22 células) fueron células plasmocitoides, el 35% (21 células) del tipo condromixóide, el 15% (9 células) epiteliales y el 13.33% (8 células) fusiformes.

La muestra fue negativa a laminina.

#### **Caso FO26396 A-C**

Paciente femenino de 23 años de edad con lesión en glándula submandibular derecha.

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** El espécimen examinado se compone de células epiteliales poliédricas, formando masas difusas y estructuras ductiformes limitadas por células cúbicas, luz con coágulo eosinófilo, estas células se entremezclan con tejido conjuntivo fibroso denso y laxo, zonas de aspecto mixóide, condroide. Esta masa esta parcialmente cubierta por una cápsula de tejido conjuntivo, bien vascularizado, con tejido adiposo y tejido glandular de aspecto normal.

**Tinción inmunohistoquímica.** Con S-100 el 19.50% (71 células) de las 364 células examinadas reaccionó positivamente con una intensidad entre moderada y fuerte. De esta células el 22.53% (16 células) fueron células condromixoides, el 57.74 (41 células) fueron células plasmocitoides, el 11.26% (8 células) del tipo fusiforme y el 8.45% (6 células) epiteliales.

Las células mioepiteliales de tipo condromixoide reaccionaron de forma moderada con laminina.

#### **Caso B84-0713**

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** Fue observada una neoplasia benigna, muy celular, originada de tejido glandular. Las células que la forman son poligonales, fusiformes, ovals y redondas, de núcleos hipercromáticos, nucléolos prominentes, con escaso citoplasma eosinófilo. Las células forman laminas, islas o nidos compactos con pocas formaciones ductales y coágulos eosinófilos. También se observaron septos de fibras de colágena algunas de las cuales están hialinizadas, el estroma es laxo, hialino y con zonas de aspecto mixoide. Junto a la neoplasia se observó tejido glandular normal.

**Tinción inmunohistoquímica.** Con S-100 reaccionaron positivamente el 14.60% de las 89 células examinadas también se observó una reacción moderada (2+) en fibras nerviosas.

Con laminina reaccionó de forma moderada en estructuras ductales.

#### **Caso B86-13**

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** Se observó una neoplasia benigna moderadamente celular, compuesta por células epiteliales de forma poligonal, fusiforme, estrellada, de núcleos grandes y nucléolos evidentes, formando nidos pequeños y grandes con estructuras ductiformes rodeados por células de aspecto cúbico (con característica de célula ductal), conteniendo coágulos eosinófilos. El estroma lo constituyó tejido conectivo laxo, con fibroblastos grandes, algunas zonas hialinizadas y mixoides.

**Tinción inmunohistoquímica.** No hubo reacción con laminina.

Con S-100 se observó fuerte reacción y de las 540 células examinadas el 14.62% (79 células) fueron positivas. De estas el 56.96% (45 células) correspondió a células plasmocitoides, el 31.64% (25 células) fusiformes y el 8.86% (7 células) condromixoides.

#### **Caso B86-84**

**Tinción con Hematoxilina y Eosina.** Se observó una neoplasia benigna de epitelio glandular compuesta por células epiteliales, adoptando patrones ductiformes, también constituida por nidos de metaplasia escamosa, la lesión se encontró semi-cubierta por una cápsula fibrosa de tejido conectivo.

**Tinción inmunohistoquímica.** Con laminina no se presentó reacción.

Con S-100 se presentó una reacción de moderada (2+) a fuerte (3+) no obstante solo el 9.50% (50 células) de las 526 células examinadas fueron positivas. de estas el 86% (43 células) pertenecieron al tipo plasmocitoide y el 14% (7 células) restante a células condromixoides.

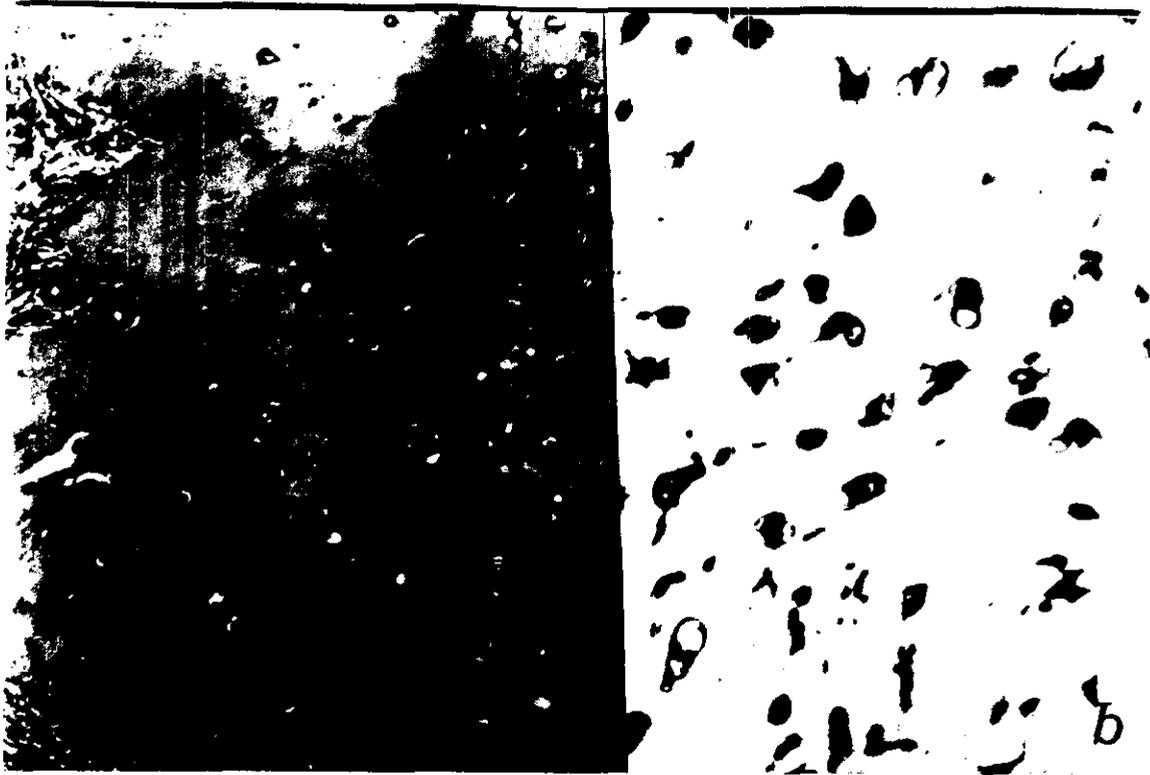


Fig. 3. (a) Zona de aspecto hialino en un adenoma pleomorfo teñida cor H y E y (b) Con proteína S-100 se observó una reacción (4+) en células de aspecto condromixoide.

Estructuras ductiformes y vasculares en Adenoma Pleomorfo: Reacción de sus componentes con Laminina

CASO No.	Inmunoreacción en estructuras ductiformes	Inmunoreacción en estructuras vasculares
FO7177	2-3+	-
FO6383	1+	2-3+
FO143-85	-	3+
FO5887	-	-
FO6287	2+	0
FO20687	+1+	0
FO25287	-	-
FO31487	2+	4+
FO13588	-	2-3+
FO4690	2-3+	2-3+
FO9290	-	-
FO17490	-	1+
FO29690	-	2-3+
FO13191	3+	3+
FO19692	-	-
FO29393	0	3+
FO1094	-	0
FO34294	-	-
FO35794	2+	2+
FO5195	-	-
FO38195	2-4+	-
FO2396	1+	1+
FO10596	-	-
FO26396	-	-

0= No tiene estructuras ductiformes o vasculares; - = negativo; 1+ = leve; 2+ = moderado; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte

B84-0713	2+	-
B86-13	-	-
B86-84	-	-

0= No tiene estructuras ductiformes o vasculares; - = negativo; 1+ = leve; 2+ = moderado; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte

Identificación y cuantificación con Proteína S-100 de los diversos tipos de células mioepiteliales en el Adenoma pleomorfo.

CASO No.	CELULAS CONTADAS	CS POSITIVAS	(%)	CS PS (%)	CS CMS (%)	CS FS (%)	CS ES (%)
FO7177	1215	19.75	35	20	10	34	
FO6383	507	5.52	42.85	35.71	21.42	0	
FO14385	973	63	65	10	25	0	
FO5887	591	3.04	0	0	100	0	
FO6287	252	44.44	35.71	6.25	13.39	44.64	
FO20687	430	27.20	0	0	0	100	
FO25287	325	21.53	47.14	15	37.44	0	
FO31487	887	18.26	73.45	21.6	2.46	2.46	
FO 13588	523	40.72	20.65	71.36	7.98	0	
FO4690	712	67.27	33.19	35.69	20.25	10.85	
FO9290	914	30.63	58.21	27.14	12.5	2.14	
FO17490	-	-	-	-	-	-	
FO29690	410	38.29	71.33	10.82	17.19	0.63	
FO13191	761	31.01	34.32	38.55	25	2.11	
FO19692	627	40.19	58.33	14.68	20.23	6.7	
FO29393	-	-	-	-	-	-	
FO1094	134	80.59	5.55	81.48	12.96	0	
FO34294	-	-	-	-	-	-	
FO35794	773	21.73	75.59	11.90	5.35	7.1	
FO5195	305	7.86	35.29	35.29	11.76	17.64	
FO38195	701	10.55	60.81	29.72	9.45	0	
FO2396	-	-	-	-	-	-	

F010596	674	8.9	36.66	35	13.33	15
FO26396	364	19.50	57.74	22.53	11.26	8.45
B86-13	540	14.62	56.96	8.86	31.64	0
B86-84	526	9.50	86	14	0	0

\* - = negativo; CS PS= Células plasmocitoides, CS CMS= Células condromixoides; CS FS= Células fusiformes; CS ES= Células epiteliales.

Relación de la inmunoreacción de Adenoma pleomorfo a Proteína S-100 y Laminina con edad y sexo.

CASO NO.	EDAD	SEXO	REACCIÓN A LAMININA	REACCIÓN A S-100
FO14385	19	MASC	3+	3+
FO5887	30	MASC	-	3+
FO6287	14	MASC	2+	2-3+
FO20687	48	FEM	1-3+	2-3+
FO25287	47	FEM	-	2-3+
FO31487	18	FEM	4+	3+
FO13588	28	MASC	2-3+	3+
FO4690	39	FEM	2-3+	2+
FO9290	49	FEM	-	1-3+
FO17490	32	MASC	1+	-
FO29690	20	FEM	2-3+	2-3+
FO13191	28	FEM	3+	2-3+
FO19692	72	FEM	2+	2-3+
FO29393	52	FEM	3+	-
FO1094	35	FEM	2+	2-3+
FO34294	49	FEM	-	-
FO35794	29	FEM	2+	2+
FO5195	44	FEM	-	2+
FO38195	51	FEM	2-3+	2-3+
FO2396	39	FEM	1+	-
FO10596	21	MASC	-	1+
FO26396	23	FEM	2+	2-3+

- = negativo; 1+ = leve; 2+ = modcrado; 3+= fuerte; 4+= muy fuerte

## DISCUSIÓN

La proteína S-100 es un marcador común para tejido nervioso y mioepitelio en este último caso aumenta su positividad en células mixoides, condroides y estrelladas, particularmente si están asociadas con un estroma mixoide. Por otro lado, la diferenciación epitelial puede manifestarse como células claras o escamosas y la consecuente presencia de filamentos de vimentina y queratina en la misma célula (Martínez Madrigal y Micheau, 1989).

El anticuerpo monoclonal Laminina se utiliza para detectar la membrana basal de los tejidos. Sakashita et al. (1980) encontraron que la Laminina se une al heparan sulfato y heparina. Toida et al. (1984) encontraron que la Laminina reaccionaba positivamente sobre estructuras vasculares pero que la mayoría de las células tumorales no se encontraban teñidas.

En general se observó que la Proteína S-100 se expresó principalmente sobre el sistema de conductos de las glándulas salivales normales así como en fibras nerviosas.

El AbMo Laminina mostró una fuerte reacción por los acinos mucosos así como por los conductos y vasos sanguíneos de las glándulas salivales normales. No se presentó reacción con los acinos serosos.

Mientras que en las glándulas salivales normales se encontró patrones de reacción similares, los tumores mostraron variaciones de respuesta, debida probablemente a la variedad en su composición histomorfológica.

Los adenomas pleomorfo muestran gran variedad de patrones histológicos lo cual es utilizado como característica de diferenciación celular en las clasificaciones (Eversole, 1971; Seifert et al., 1986). En este estudio fue posible observar que aquellos tumores con estructuras ductiformes bien definidas así como estructuras vasculares mostraron una reacción con Laminina.

Con Proteína S-100 se observaron los diferentes tipos de células mioepiteliales y a diferencia de lo ocurrido en las glándulas salivales normales donde las células que se encontraban delineando conductos eran las más frecuentes en Adenoma pleomorfo tenían un porcentaje menor si se compara con los otros tres tipos celulares encontrados en este tumor; de estas células el tipo plasmocitoide fue el más común seguido por las

de tipo condromixoide en tercer se encontraron las de tipo fusiforme y por último las del tipo epitelial. Estos resultados concuerdan con los de Martínez Madrigal y Micheau (1989) a diferencia de que ellos describieron que la célula mioepitelial del tipo condromixoide el tipo celular más frecuente en Adenoma pleomorfo.

## CONCLUSIONES

El MoAb Laminina reaccionó específicamente con el sistema de conductos de las glándulas salivales normales así como en los acinos mucosos, pero no sobre los acinos serosos.

El anticuerpo monoclonal Laminina reaccionó con estructuras vasculares, ductiformes y acinos mucosos en las neoplasias de glándulas salivales.

No se observó relación entre edad y sexo con la intensidad de la inmunoreacción de las neoplasias de glándulas al MoAb Laminina.

La Proteína S-100 reaccionó positivamente en el sistema de conductos de las glándulas salivales normales.

La Proteína S-100 mostró una inmunoreacción positiva sobre las células mioepiteliales en el Adenoma pleomorfo.

Las células mioepiteliales que reaccionaron con mayor frecuencia con Proteína S-100 fueron las células del tipo plasmocitoide.

Las células mioepiteliales que se presentaron con menor frecuencia fueron las células del tipo epitelial.

## BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Adams, J.C. (1977). Technical considerations on the use of horseradish peroxidase as neuronal marker. *Neurosci.* 2: 141-145.
- ◆ Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Second Edition. Garland Publishing.
- ◆ d'Ardene, A.J., Kirpatrick, P., Wells, C.A. and Davies, J.D. (1986). Laminin and fibronectin in adenoid cystic Carcinoma. *J Clin Pathol* 39:138-144.
- ◆ Aroni, K., Liossi, A., Fotiou, G., Agapitos, E. and Litsios, B (1988). An immunohistochemical study of normal human neonate and adult parotid gland tissue. Detection of lysozyme, lactoferrin,  $\alpha$ 1-antichymotripsin,  $\alpha$ 1-antitrypsin and carcinoembryonic antigen. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart. 292-296.
- ◆ Auclair, P., Goode, R. and Ellis, G. (1992). Mucoepidermoid Carcinoma of intraoral salivary glands. April 15, 69 (8):2021-2030.
- ◆ Batsakis, J.G. (1980). Salivary gland neoplasia: An outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med.* 49 (3), 229-232.
- ◆ Birembaut, P., Caron, Y., Adnet, J-J. and Foidart, J. (1985). Usefulness of basement membrane markers in tumoural pathology. *J Pathol* 145: 283-296.
- ◆ Blitzer, A. (1986). Inflammatory and obstructive disorders of salivary glands. *J Dent Res.* 66 (Spec Iss), 675-679.
- ◆ Burkhardt, A. (1985). Advanced methods in the evaluation of premalignant lesions and Carcinomas of the oral mucosa. *J Oral Pathol* 14: 751-778.
- ◆ Campbell, J.H., Terranova, V. P (1988). Laminin: Molecular organization and biological function. *J. Oral Pathol.* 17: 309-323.
- ◆ Caselitz, J., Schulze, I., Seifert, G. (1986) Adenoid cystic Carcinoma of the salivary glands and immunohistochemical study. *J. Oral Pathol.* 15: 308-318.
- ◆ Charonis, A., Tsilibary, E., Yurchenco, P. and Furthmayr, H. (1985). *J Cell Biol* 100 (June): 1848-1853.

- ◆ Charonis, A., Tsilibary, E., Saku, T. and Furthmayr, H. (1986). Inhibition of laminin self-assembly and interaction with type IV collagen by antibodies to the terminal domain of the long arm. *J Cell Biol* 103 (November) 1689-1697.
- ◆ Cheng, L., Binder, S., Fu, Y.S. and Lewin, Klaus. (1988). Demonstration of estrogen receptors by monoclonal antibody in formalin-fixed breast tumors. *Lab Invest* 58 (3): 346-353.
- ◆ Cohen, J., Burne, J.F., Winter, J. and Bartlett, P. (1986). Retinal ganglion to lamina with maturation. *Nature* 322 (31): 465-466.
- ◆ Cormack. (1987) *Histología de Ham*. Editorial Harla, México.
- ◆ Crocker, J., Jenkins, R., Campbell, J., Fuggle, W. J., Shah, V. (1985). Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in salivary gland neoplasms. *J Pathol* 146: 115-121.
- ◆ Cuello, A. C. Editor. (1993). *Immunohistochemistry II*. Jhon Wisley and sons. Great Britain.
- ◆ Dardick, I., van Nostrand, A.W.P. and Phillips, M. J. (1982). Histogenesis of salivary gland pleomorphic Adenoma (mixed tumor) with evaluation of the role of de myoepithelial cell. *Human Pathol.* 13 (1) Jan.
- ◆ Dardick, I., Daya, D., Hardie, J. and van Nostrand, A.W.P. (1984). Mucoepidermoid Carcinoma: Ultrastructural and histogenic aspects. *J Oral Pathol.* 13: 342-358.
- ◆ DeOlmos, J.S. (1977). An improved HRP method for the study of central nervous connections. *Exper. Brain Res.*, 29, 541-551
- ◆ DeOlmos, J. and Himer, L. (1977). Mapping of collateral projections with the HRP-method. *Neurosci. Lett.* 6, 107-114.
- ◆ DeOlmos, J., Hardy, H. and Heimer, L. (1978). The afferent connections of the main and accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP study. *J comp Neurol.* 181, 213-244.
- ◆ Engvall, E., Davis, G., Dickerson, K., Ruoslahti, E., Varon, S. and Manthorpe, M. (1986). *J Cell Biol* 103 (December): 2457-2465.
- ◆ Escribano, L.M., Gabriel, L.C., Villa, E. and Navarro, J. (1987). Endogenous peroxidase activity in human cutaneous and adenoidal mast cells. *J Histochem Cytochem* 35 (2): 213-220.

- ◆ Evenson, J.W. and Cawson, A. (1985) Tumours of minor (oropharyngeal) salivary glands: a demographic study of 336 cases. *J Oral Pathol.* 14, 500-509.
- ◆ Eversole, L. R. (1971) Histogenic classification of salivary gland tumors. *Arch Pathol.* 92 (December), 433-443.
- ◆ Eversole, L. R. (1991) *Patología Bucal.* Editorial Médica Panamericana, México.
- ◆ Farr, A. and Nakane, P. (1981). Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review. *J Immunol Methods* 47: 129-144.
- ◆ Foss, R.D., Ellis, G.L. and Auclair, P.L. (1996). Salivary gland cystadenocarcinomas. A clinicopathologic study of 57 cases. *Am J Surg Pathol* 20 (12): 1440-1447.
- ◆ Genco, R.J., Goldman, H.M. y Cohen, W. Editores. (1993). *Periodoncia.* Interamericana/McGraw-Hill. México.
- ◆ Geneser, F. (1989) *Histología.* Editorial Médica Panamericana, México.
- ◆ Graf, J., Iwamoto, Y., Sasaki, M., Martin, G., Kleinman, H., Robey, F. and Yamada Y. (1987). *Cell* 48 (March): 989-996.
- ◆ Graham, G.S. and Karnovsky, M.J. (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 14: 291-302.
- ◆ Guesdon, J-L., Ternynck, T. and Avrameas, S. (1979). The use of Avidin-Biotin interaction in Immunoenzymatic Techniques. *J Histochem Cytochem* 27 (8): 1131-1139.
- ◆ Gusterson, B.A., Lucas, R.B. and Ormerod M.G. (1982). Distribution of epithelial membrane antigen in benign and malignant lesions of the salivary glands. *Virchows Arch (A)* 397: 227-233.
- ◆ Hanker, J.S., Yates, P.E., Metz, C.B. and Rustioni, A. (1977) A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. *Histochem. J.* 9, 789-792
- ◆ Hara, K., Ito, M., Takeuchi, J., Iijima, S., Endo, T. and Hidaka H. (1983). Distribution of S-100b protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. *Virchows Archiv A.* 401: 237-249.

- ◆ Hardy, H. y Heimer, L. (1977). A safer and more sensitive substitute for diaminobenzidine in the light microscopic demonstration of retrograde and anterograde transport of HRP. *Neurosci. Lett.* 5, 235-240.
- ◆ Harrison, J.D. and Auger, D.W. (1989). Ultrastructural morphology of secretory granules in pleomorphic Adenoma of human parotid and submandibular salivary glands. *Archs oral Biol* 34(9): 759-761.
- ◆ Hilkens, J., Buijs, F. and Hilgers, J. (1984). Monoclonal antibodies against human milk fat globule membrane detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *Int J Cancer.* 34: 197-206.
- ◆ Hiserodt, J., Laybourn, K. and Varani, J. (1985). Expression of a laminin-like substrate on tje surface of murine natural killer (NK) lymphocytes and its role in NK recognition of tumor target cells. *J Immunol* 135 (2): 1484-1487.
- ◆ Horwitz, A., Duggan, K., Greggs, C., Decker, C. and Buck, C. (1985). The cell substrate attachment (CSAT) antigen has properties of a recptor for laminin and fibronectin. *J Cell Biol* 101 (December): 2134-2144.
- ◆ Isobe, T. and Okuyama, T. (1978) The amino acid sequence of S-100 protein (PAP-Ib protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem.* 89:379-388
- ◆ Isobe, T. (1981) Structural relation of two S-100proteins in bovine brain: subunit composition of S-100a protein. *Eur J Biochem.* 115: 469-474
- ◆ Isobe, T. and Okuyama, T. (1981) The amino acid sequence of the subunit in bovine brain S-100ao protein. *Eur J Biochem* 116: 79-86.
- ◆ Itoh, K., Konishi, A., Nomura, S., Nakamura, Y., and Sugimoto, T. (1979). Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. *Brain Res.*, 175, 341-346.
- ◆ Jensen, R. (1985) Characteriztion of human brain S-100 protein fraction: Amino acid sequence of S-100b. *J Neurochem.* 45: 700-705.
- ◆ Kahn. H.J., Baumal, R., Marks, A., Dardick, Y. and van Nostrand, P.A.W. (1985). Myoepithelial cells in salivary gland tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 109 (February), 190-195.
- ◆ Kennett, R.H. (1979). Monoclonal antibodies. Hybrid myelomas- A revolution in serology and immunogenetics. *Am Hum Genet.* 31: 539-547

- ◆ Kennett, R.H. and Gilbert, F. (1979). Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain. *Science*. 203 (March), 1120-1121.
- ◆ Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256 (August) 495-497.
- ◆ Köhler, G (1986). Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Science*. 233: 1281-1286.
- ◆ Krotoski, D., Domingo, C., Bronner-Fraser, M. (1986). Distribution of a putative cell surface receptor for fibronectin and laminin in the avian embryo. *J Cell Biol* 103 (September) 1061-1071.
- ◆ Kurkinen, M., Barlow, D.P., Jenkins, J.R. and Hogan, B.L.M. (1983). In vitro synthesis of laminin and entactin polypeptides. *J Biol Chem* 258: 6543.
- ◆ Lander, A., Fujii, D. and Reichardt, L. (1985). Purification of a factor that promotes neurite outgrowth: Isolation of laminin and associated molecules. *J Cell Biol* 101: (September) 898-913.
- ◆ LaVail, J.H. and LaVail, M.N (1974). The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chicken visual system: A light and electron microscopic study. *J comp Neurol*. 157: 303-358.
- ◆ Lassiter, M.O. (1987). Characterization of lactoferrin interaction with *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 66: 480.
- ◆ Loy, T.S., McLaughlin, R., Odom, L.F. and Dehner, L.P (1989). Mucoepidermoid Carcinoma of the parotid as a second malignant neoplasm in children. *Cancer*. 64, 2174-2177.
- ◆ Lucas, R.B. (1984). *Pathology of Tumours of the Oral Tissues*. 4th edition. Churchill Livingstone.
- ◆ Lynch, G.S., Smith, R.L., Mensah, P. and Cotman, C. (1973). Tracing the mossy fiber system with horseradish peroxidase histochemistry. *Exp Neurol*. 40: 516-524.
- ◆ Madri, J., Roll, J., Furtmayr, H. and Foidart, J-M. (1980). Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in the basement membranes of the murine kidney. *J Cell Biol* 86:682-687.

- ◆ Malmgren, L. and Olsson, Y. (1978). A sensitive method for histochemical demonstration of horseradish peroxidase in neurons following retrograde axonal transport. *Brain Res.* 148: 279-294.
- ◆ Mansson-Rahemtulla, B. (1988) Purification and characterization of human salivary peroxidase. *Biochemistry* 27:233.
- ◆ Martinez-Madrigal, F. and Micheau, C. (1989). Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol* 13 (10) 879-899
- ◆ McCluggage, G., Sloan, J., Cameron, S., Hamilton, P. and Toner, P. (1995) Basal cell Adenocarcinoma of the submandibular gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79:342-350.
- ◆ Mesulam, M-M. (1976). The blue reaction product in horseradish peroxidase neurohistochemistry: incubation parameters and visibility. *J Histochem Cytochem* 24: 1281-1284.
- ◆ Mesulam, M-M. (1978). Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* 26:106-117.
- ◆ Mesulam, M-M. Edit. (1982). *Tracing Neural Connections with Horseradish Peroxidase.* Jhon Wiley and sons, Great Britain.
- ◆ Mesulam, M-M. and Rosene, D.L. (1977). Differential sensitivity between blue and brown reaction procedures for HRP neurohistochemistry. *Neurosci. Lett.* 5: 7-14.
- ◆ Mills, S.E., Garland, T.A. and Allen, M.S. (1984). Low-grade papillary Adenocarcinoma of the palatal salivary gland origin. *Am J Surg Pathol* 8:367-374.
- ◆ Ming Hsu, S., Raine, L. and Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures 29 (4): 577-580.
- ◆ Mori, M., Murase, N., Hosaka, M. and Orito, T. (1986). Immunohistochemical expression of S-100 protein in reactive and neoplastic myoepithelial cells of variant salivary pleomorphic Adenomas. *Acta Histochem Cytochem* 19 (2): 231-240.

- ◆ Morinaga, S., Nakajima, T. and Shimosato, Y. Normal and neoplastic myoeoithelial cells in salivary glands: and immunohistochemicals study. *Hum Pathol* 18 (12): 1218-1226.
- ◆ Mostofi, R., Wood, R., Christison, W. and Talerma, A. (1992) Low-grade papillary Adenocarcinoma of minor salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73:591-595
- ◆ Murphy, J., Campbell, F. and Corio, R. (1981). Acinic cell Adenocarcinoma of the buccal mucosa: report of case. *J Oral Surg* 39 (May): 357-358.
- ◆ Murray, J. (1991). Current clinical applications of monoclonal antibodies. *The Cancer Bulletin* 43(2): 152-161.
- ◆ Nakazato, Y., Ishida, Y. and Takahashi, K. (1985). Immunohistochemical distribution of S-100 protein and glial fibrillary acid protein in normal and neoplastic salivary glands. *Virchows Arch A* 405:299-310.
- ◆ Neville, B., Damm, D., Allen, C. and Bouquot, J.E. (1995). *Oral and Maxillofacial Pathology*. W.B Saunders Company.
- ◆ Noda, Y., Horike, H. and Mori, M. (1987). Immunohistochemical identification of epithelial membrane antigen in sweat gland tumours by the use of a monoclonal antibody. *Path Res Pract* 182: 797-804.
- ◆ Norgren, R.B. and Lehman, M.N. (1990). A new chromogen for use in HRP-tract tracing and double-label immunocytochemistry. *Brain Res Bull* 25: 393-396.
- ◆ Ogawa, I., Nikai, H., Takata, T. Yasui, R. (1992). Clear-cell variant of mucoepidermoid Carcinoma: report of a case with immunohistochemical and ultrastructural observations. *J Oral Maxillofac Surg* 50:906-910
- ◆ Papanayotou, P.H., Kayavis, J.G. and Trigonidis, H.G. (1980) Intraoral acinic cell Adenocarcinoma. *J Oral Surg* 38 (October): 784-785.
- ◆ Parham, P. and Bodmer, W.F. (1978). Monoclonal antibody to a human histocompatibility aloantigen, HLA-A2. *Nature*. 276:397-398.
- ◆ Paulsson, M., Aumailley, M., Deutzmann, R, Timpl, R. Beck. K. and Engel, J. (1987). Laminin-nidogen complex: extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur J Biochem* 166, 11-19.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- ◆ Pollock, J.J. (1987). Lysozyme-protease-inorganic monovalent anion lysis of oral bacterial strains in buffers and stimulated whole saliva. *J Dent Res* 66:467.
- ◆ Rao, C.N., Margulies, I.M.K., Tralka, T.S., Terranova, V.P. Madri, J.A. and Liotta, L.A. (1982) Isolation of a subunit of laminin and its role in molecular structure and tumor cell attachment. *J Biol Chem* 257:9740.
- ◆ Regezi, J. (1993). Advances in the histologic diagnosis of maxillofacial malignancy. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. 5 (2): 237-247.
- ◆ Regezi, J. y Sciuba, J. (1991). *Patología Bucal*. Interamericana/McGraw-Hill.
- ◆ Regezi, J., Zarbo, R., Stewart, J. and Courtney, R. (1991) Polymorphous low-grade Adenocarcinoma of minor salivary gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 71: 469-475.
- ◆ Reth, M., Kelsoe, G. and Rajewsky, K. (1981). Idiotypic regulation by isologous monoclonal anti-idiotipe antibodies. *Nature*. 290,257-259.
- ◆ Roitt, I., Borstoff, J. and Male, D. (1993). *Immunology*. 3rd edition, Mosby.
- ◆ Rouvière, H. y Delmas, A. (1994). *Anatomia humana, descriptiva, topográfica y funcional*. Tomo I. Masson.
- ◆ Rukosuev, V.S. (1992). Immunofluorescent localization of collagen types I, III, IV, V, fibronectin, lamin entactin, and hepara sulphate proteoglycan in human immature placenta. *Experientia* 48: 285-287.
- ◆ Sato, M., Azuma, M., Hayashi, Y., Yoshida, H., Yanagawa, T. and Yura, Y (1987). 5-azacytidine induction of stable myoepithelial cell and acinar cells from a huma salivary intercalated duct cell clone. *Cancer Research*. 47 (15): 4453-4459.
- ◆ Seifert, G., Miehke, A., Hanbrich, J. and Chilla, R. (1986). *Diseases of the salivary glands*. De. George Thienme Verlag. Thieme Inc. Stuttgar.
- ◆ Seifert, G. and Sobin, L. (1992). The World Health Organization's Histological Classification of Salivary Gland Tumors. *Cancer July* 15; 70 (2): 379-385.
- ◆ Sheehan, D. and Hrapchak, B. (1980). *Theory and practice of Histotechnology*. 2<sup>a</sup> edition. The C.V Mosby Company.
- ◆ Shteyer, A. and Fundoianu-Dayan, D. (1986) Papillary cystic Adenocarcinoma of minor salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg* 15:361-364.

- ◆ Siar, C.H., Ng, K.H. and Loh, H.T. (1987). Mucoepidermoid Carcinoma with calcifications. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med.* 63:468-471.
- ◆ Simpson, R.H.W. (1994). Classification of tumours of the salivary glands. *Histopathol* 24: 187-191.
- ◆ Somogyi, P., Hodgson, A.J. and Smith, A.D. (1979). An approach to tracing neuron networks in the cerebral cortex and basal ganglia. Combination of Golgi staining, retrograde transport of horseradish peroxidase and anterograde degeneration of synaptic boutons in the same material. *Neurosci.* 4: 1805-1852.
- ◆ Spiro, R.H., Huvos, A.G. and Strong, E.W. (1982). Adenocarcinoma of salivary origin: clinicopathologic study of 204 patients. *Am J Surg* 144: 423-431.
- ◆ Springer, T. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346 (August): 425-434.
- ◆ Stead, R., Qizilbash, A.H., Kontozoglou, T., Daya, D. and Riddell, R. (1988). An immunohistochemical study of pleomorphic Adenomas of the salivary gland: glial fibrillary acidic protein-like immunoreactivity identifies a major myoepithelial component. *Hum Pathol* 19 (1): 32-40.
- ◆ Streit, P. and Reubi, J.C. (1977). A new and sensitive staining method for axonally transported horseradish peroxidase (HRP) in the pigeon visual system. *Brain Res.*, 126: 530-537.
- ◆ Takai, Y., Dardick, Y., Mackay, A., Burford-Mason, A. and Mori, M. (1995). Diagnostic criteria for neoplastic myoepithelial cells in pleomorphic Adenomas and myoepitheliomas: Immunocytochemical detection of muscle-specific actin, cytokeratin 14, vimentin, and glial fibrillary acidic protein. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79: 330-341.
- ◆ Tatemoto, Y., Kumasa, S., Watanabe, Y. and Mori, M. (1987). Epithelial membrane antigen as a marker of human salivary gland acinar and ductal cell function. *Acta Histochem* 82: 219-226.
- ◆ Tatemoto, Y., Kumasa, S., Watanabe, Y. and Mori, M. (1987). Immunohistochemical expression monoclonal antibody against epithelial membrane antigen in salivary gland tumors. *Acta Histochem Cytochem* 20:113-124.

- ◆ Taylor-Papadimitrou, J., Peterson, J.A. Arklie, J., Ceriani, R.L. and Bodmer, W.F. (1981). Monoclonal antibodies to epithelium-specific components of the human milk fat globule membrane: Production and reaction with cells in culture. *Int J Cancer*. 28:17-21.
- ◆ Ten Cate, A.R. (1989). *Oral histology. Development, structure and function*. The C.V. Mosby Company. 3rd edition.
- ◆ Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Tordart, J.M. and Martin, G.R. (1979). Laminin- a glycoproyein from basement membranes. *J Biol Chem*. 254: 9933.
- ◆ True, L. Edit. (1990). *Atlas of Diagnostic Immunohistopathology*. Gower Medical Publishing, New York.
- ◆ Toida, M., Takeuchi, J., Hara, K., Sobue, M., Tsukidate, K., Goto, K. and Nakashima, N. (1984). Histochemical studies of intercellular components of salivary gland tumors with special reference to glycosaminoglycan, laminin and vascular elements. *Virchows Archiv A* 403: 15-26.
- ◆ Warr, W.B. (1975). Olivocochlear and vestibular efferent neurons of the feline brain stem: their location, morphology and number determined by retrograde axonal transport and acetylcholinesterase histochemistry. *J comp Neurol* 161: 159-182.
- ◆ Winter, G. and Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature*. 149 (january). 293-299.