

Identificación de Colágeno I y III con Picrosirius Red/ Polarización en el Estroma de Tumores Salivales

Identification of Type I and III Collagen by Picrosirius Red/Polarization of Tumoral Salivary Stroma

Maria Elena Samar; Rodolfo Esteban Ávila; Onell Gabriela Asis; Ismael Fonseca & Alberto Corball

SAMAR, M. E.; ÁVILA, R. E.; ASIS, O. G.; FONSECA, I. & CORBALL, A. Identificación de colágeno I y III con picrosirius red/polarización en el estroma de tumores salivales. *Int. J. Odontostomat.*, 6(1):59-64, 2012.

RESUMEN: El estroma juega un rol importante en los procesos tumorales de invasión y metástasis. Las fibras de colágeno tipo I son el principal componente estructural del estroma en distintos tumores. Sin embargo, hay muy pocos estudios en los tumores de glándulas salivales. Basándonos en estos antecedentes el objetivo de la presente comunicación fue estudiar las características del colágeno con Picrosirius red/polarización en tumores benignos y malignos de glándulas salivales para evaluar su posible rol en los mecanismos de progresión tumoral. Cortes histológicos de adenoma pleomórfico, carcinoma adenoide quístico y carcinoma epitelial mioepitelial se colorearon con H/E y Picrosirius red y se examinaron con microscopio de polarización. La birrefringencia del colágeno con Picrosirius/polarización resultó diferente en el estroma de los tumores malignos (carcinoma adenoide quístico y carcinoma epitelial mioepitelial), con predominio de colágeno I, en comparación con el tumor benigno (adenoma pleomórfico), con predominio de colágeno III. El diferente perfil de coloración en las fibras colágenas producidas en el estroma de los tumores analizados podría relacionarse con diferentes mecanismos de expansión tumoral, los que fueron poco estudiados en los tumores de glándulas salivales. Más estudios son necesarios para obtener resultados más concluyentes que contribuyan al diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

PALABRAS CLAVE: glándulas salivales, tumores, colágeno, picrosirius, polarización, birrefringencia.

INTRODUCCIÓN

Vistas al microscopio óptico, las fibras de colágeno presentan acidofilia con H/E; se colorean de azul con la técnica tricrómica de Masson y de verde con la técnica tricrómica de Mallory (Samar *et al.*, 2004). Pero estos métodos tintoriales no diferencian los distintos tipos de colágeno. Por el contrario, la tinción con Picrosirius red y su posterior análisis con microscopía de polarización nos posibilita demostrar selectivamente diferentes tipos de colágeno (Aparna & Charu, 2010; Coleman, 2011).

Junqueira *et al.* (1978, 1979) y Montes & Junqueira (1991) relatan en sus trabajos de referencia que el estudio de la biopatología del colágeno tuvo un significativo avance con las técnicas de inmunohistoquímica y Picrosirius red-polarización.

Con Picrosirius red/polarización, las fibras de colágeno I y III muestran birrefringencia debido a que sus unidades submicroscópicas se orientan en dirección al eje de la fibra (López-Mínguez *et al.*, 2006).

Por otro lado, el adenoma pleomórfico, el carcinoma epitelial mioepitelial y el carcinoma adenoide quístico son tumores de las glándulas salivales formados por células epiteliales ductales y mioepiteliales acompañadas de producción de estroma (colágeno, proteoglicanos, glucoproteínas, etc) por parte de estas últimas células (Ávila *et al.*, 2008; Ellis & Auclair, 2008; Samar *et al.*, 2009; Samar *et al.*, 2010a, b).

Actualmente, hay un creciente interés en relación a los componentes del estroma y su papel en la

amplificación o inhibición de la proliferación celular (De Weber & Mareel, 2003; Kakkad *et al.*, 2010).

El estroma juega un rol importante en los procesos tumorales de invasión y metástasis. Las fibras de colágeno Tipo I son el principal componente estructural del estroma en distintos tumores, como los que se desarrollan en mama y próstata (Kakkad *et al.*).

Sin embargo, hay muy pocos estudios sobre el estroma y colágenos en los tumores de glándulas salivales, que corresponden a menos del 2% de todas las neoplasias humanas (Samar *et al.*, 2009). En relación al colágeno presente en estos tumores y estudiado con Picosirius, hemos encontrado en las bases consultadas (PUBMED, SCOPUS, LILACS) sólo un trabajo, realizado por Allon *et al.* (2006). Estos autores estudiaron las diferencias estromales del colágeno en un grupo de tumores salivales con similar histopatogénesis y diferente comportamiento biológico para evaluar su posible aplicación como herramienta diagnóstica.

Basándonos en estos antecedentes el objetivo de la presente comunicación fue estudiar las características del colágeno con Picosirius red/polarización en los tumores benignos y malignos mencionados anteriormente, para evaluar su posible rol en los mecanismos de progresión tumoral.

MATERIAL Y MÉTODO

Se analizaron los siguientes tumores epiteliales benignos y malignos de glándulas salivales humanas con diferenciación mioepitelial (Tabla I). Los casos, pertenecientes al archivo de la Fundación para la Educación, Investigación y Prevención en Cabeza y Cuello (FUNDACYC), Córdoba, Argentina, fueron reevaluados confirmándose los diagnósticos.

Los adenomas pleomórficos se clasificaron en celular y mixoide según Ellis & Auclair. Los casos de carcinoma adenoide quístico se clasificaron en Grados I, II o III siguiendo los criterios histopatológicos establecidos por Seifert & Sobin (1991).

Cortes histológicos de 5 µm de espesor de biopsias incluidas en parafina se colorearon con H/E como protocolo de rutina y con la tinción histoquímica modificada de Picosirius red (Sirius red F3B o Rojo directo 80, Aldrich) (Samar *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2007; Aparna & Charu).

Los cortes coloreados con Picosirius se examinaron con microscopio de polarización NIKON ECLIPSE LV 100POL. La observación de las fibras colágenas con este método permite diferenciar colágeno Tipo I (birrefringencia naranja amarillenta a naranja y rojo) y Tipo III (birrefringencia verde o verdoso amarillenta).

RESULTADOS

A- Hematoxilina/Eosina

Adenoma pleomórfico: en cortes histológicos de este tumor benigno observamos una apariencia histológica polimorfa, con células ductales y mioepiteliales ordenadas en nidos sólidos, conductos y láminas, coexistiendo con áreas estromales hialinizadas, condroides y mixoides. Las zonas mixoides se caracterizaban por presentar una abundante acumulación de glucosaminoglucanos en tanto que las características de las zonas condroides eran las de un tejido cartilaginoso hialino atípico. Sobre la base de su apariencia histológica clasificamos los casos analizados en tipo celular (n=2) y mixoide (n=3) en relación al predominio del componente epitelial o de los elementos mixoides o mucocondroides (Fig. 1A y B).

Carcinoma adenoide quístico: los casos de este tumor maligno presentaron células epiteliales y mioepiteliales ordenadas en estructuras cribiformes, ductales y sólidas en proporción variable. El componente cribiforme estaba constituido por espacios semejantes a estructuras quísticas, rodeados por células tumorales que se continuaban con el estroma neoplásico (Fig 2A). En el componente tubular predominaban las estructuras epiteliales tumorales de aspecto ductal (Fig 2B). Cordones densamente celula-

Tabla I. Tipos de tumores epiteliales benignos y malignos de glándulas salivales humanas con diferenciación mioepitelial analizados y su localización respectiva.

Tumor	Localización
Adenoma pleomórfico (n=5)	Parótida (n=2), submaxilar (n=2), mejilla (n=1)
Carcinoma adenoide quístico (n=5)	Paladar (n=3), encía (n=1), parótida (n=1)
Carcinoma adenoide quístico (n=5)	Parótida (n=1)

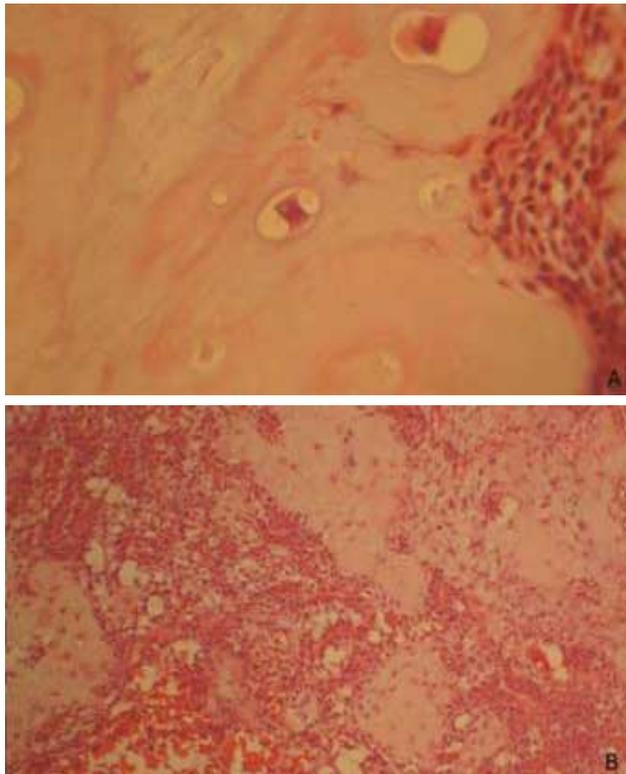


Fig. 1. Adenoma pleomórfico. A. Adenoma pleomórfico tipo mixoide. H/E. 400x. B. Adenoma pleomórfico tipo celular. H/E. 200x.

res de tamaño variable constituían el componente sólido (Fig 2C). Tres casos correspondieron a carcinoma adenoide quístico grado II y 2 a grado III, según la clasificación de Seifert & Sobert.

Carcinoma epitelial mioepitelial: en el caso estudiado se observaron formaciones ductales, algunas con apariencia quística, delimitadas por una doble capa celular, epitelial interna y mioepitelial externa (Fig. 3).

B- Picrosirius red:

a- Sin polarización: el estroma de todos los tumores analizados se coloreó de una tonalidad rojiza, no pudiéndose diferenciar colágeno I y III (Figs. 4A, 5A y 6A).

b- Con polarización: Adenoma pleomórfico: en el estroma se demostró la presencia de abundantes fibras colágenas Tipo III con un rango verde-amarillo verdoso, y escaso colágeno I naranja rojizo dentro de las áreas condromixoides y en la matriz vecina al componente celular. Las fibras colágenas Tipo III se agrupaban en haces entrelazados (Fig. 4B).

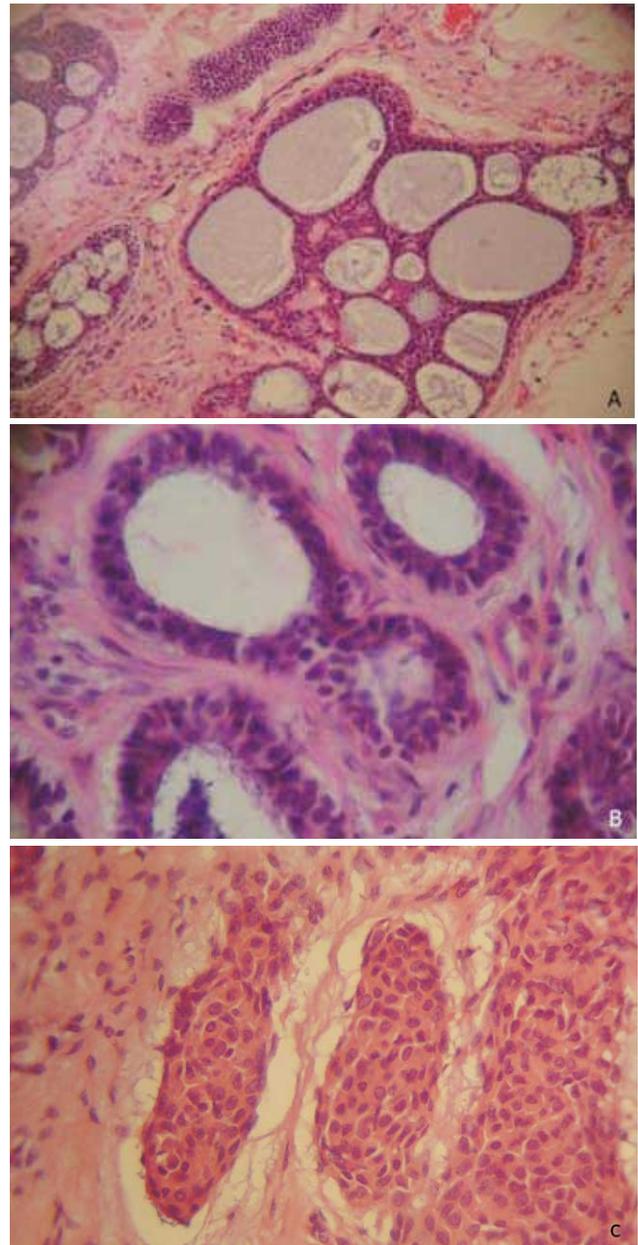


Fig. 2. Carcinoma adenoide quístico. A. Componente quístico. H/E. 400x. B. Componente tubular. H/E. 400x. C. Componente sólido. H/E. 400x.

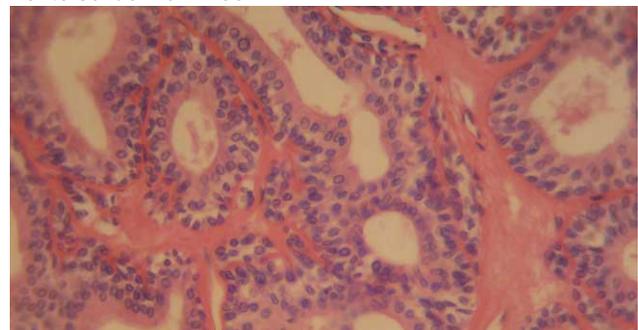


Fig. 3. Carcinoma epitelial mioepitelial. H/E. 400x.

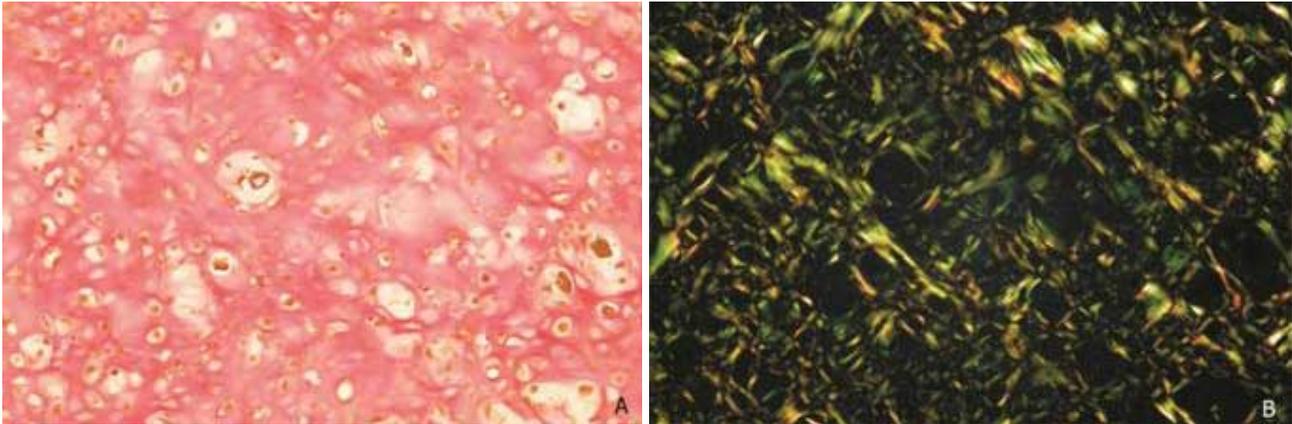


Fig. 4. Adenoma pleomórfico tipo mixoide. A. Tejido mixocondroide. Picrosirius red/sin polarización. 400x. B. Tejido mixocondroide. Picrosirius red/polarización. 400x.

Carcinoma adenoide quístico: en los componentes sólido, tubular y cribiforme había un franco predominio de colágeno Tipo I, con birrefringencia naranja y rojiza. Las fibras se distribuían en haces arremolinados (Fig. 5B).

Carcinoma epitelial mioepitelial: la matriz extracelular mostró birrefringencia naranja y rojiza debido a la presencia de colágeno Tipo I, con escasas áreas de birrefringencia verde-amarillo verdoso (colágeno III) (Fig. 6B).

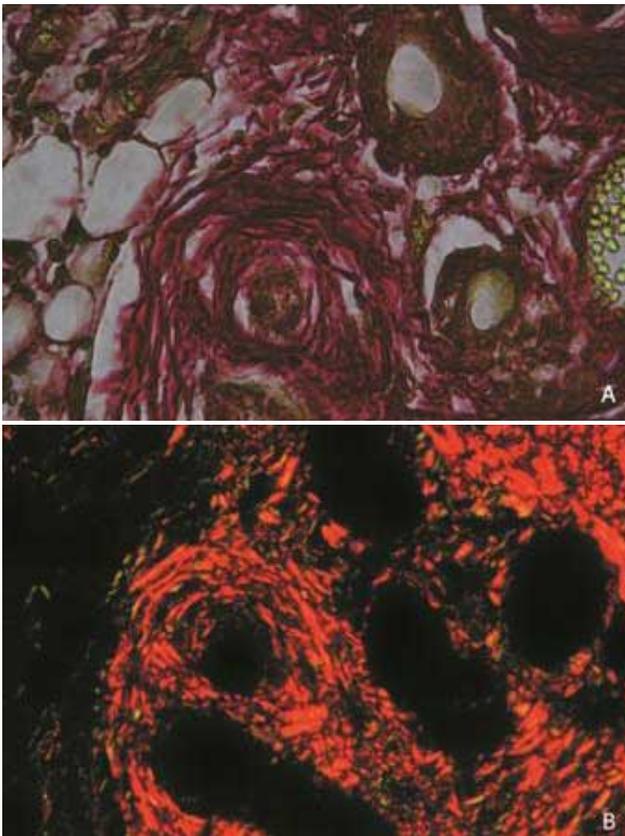


Fig. 5. Carcinoma adenoide quístico. A. Picrosirius red/sin polarización. 400x. B. Picrosirius red/con polarización. 400x.

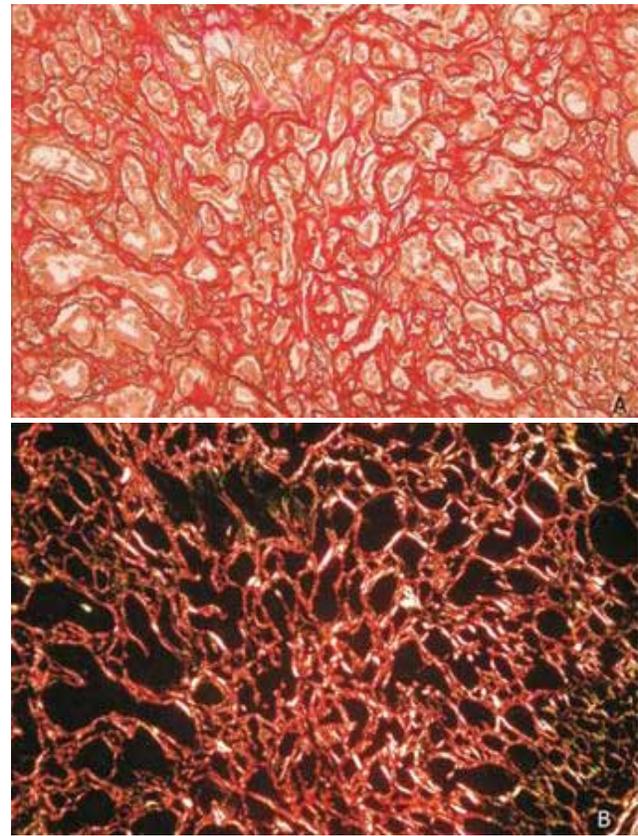


Fig. 6. Carcinoma epitelial/mioepitelial. A. Picrosirius red/sin polarización. 400x. B. Picrosirius red/con polarización. 400x.

DISCUSIÓN

Si comparamos la cantidad de estroma observamos que difiere de un tipo de tumor salival a otro e incluso dentro de un mismo tipo de tumor de acuerdo a su subtipo histológico, por ejemplo el adenoma pleomórfico en sus variedades celular y mixoide (De Weber & Mareel).

Por otra parte, en el perfil de colores del colágeno observado con Picosirius/polarización, el patrón resultó diferente en el estroma de los tumores malignos (carcinoma adenoide quístico y carcinoma epitelial mioepitelial) en comparación con el tumor benigno (adenoma pleomórfico). Tanto en el carcinoma adenoide quístico como en el carcinoma epitelial mioepitelial fue evidente el predominio de la birrefringencia naranja y rojiza (colágeno Tipo I) sobre la verde y verdoso amarillenta (colágeno Tipo III).

Koenig *et al.* (2006) demostraron que el colágeno Tipo I reduce la adhesión celular y aumenta la proliferación tumoral en el cáncer pancreático.

Similares resultados fueron reportados por Araújo *et al.* (2009) en el carcinoma ex - adenoma pleomórfico de glándulas salivales, Li *et al.* (2010) en el carcinoma gástrico y Cheng & Leung (2011) en cáncer de próstata y ovario.

Sin embargo, Allon *et al.* describieron resultados diferentes a los nuestros, con una alta prevalen-

cia de birrefringencia verde-amarilla en el carcinoma adenoide quístico y el adenocarcinoma polimorfo de bajo grado y amarillo-naranja en el adenoma pleomórfico. Estos autores sugieren que las fibras colágenas estaban laxamente empaquetadas en los tumores salivales más agresivos, compuestas probablemente por colágeno III, intermedio o colágeno patológico, lo que facilitaría la invasión a tejidos adyacentes y el desarrollo de metástasis.

Por el contrario, nuestros resultados preliminares acuerdan con investigadores que asocian la presencia de colágeno Tipo I con el comportamiento invasor de las células epiteliales tumorales ya que en los tumores malignos estudiados demostramos con Picosirius red /polarización una birrefringencia más alta, característica del colágeno Tipo I.

El diferente perfil de coloración en las fibras colágenas producidas en el estroma de los tumores benignos y malignos analizados podría estar relacionado con diferentes mecanismos de expansión tumoral, los que fueron poco estudiados en los tumores de glándulas salivales.

Más estudios de casos y su control clínico y epidemiológico son necesarios para obtener resultados más concluyentes que contribuyan al diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

SAMAR, M. E.; ÁVILA, R. E.; ASIS, O. G.; FONSECA, I. & CORBALL, A. Identification of type I and III collagen by picosirius red/polarization of tumoral salivary stroma. *Int. J. Odontostomat.*, 6(1):59-64, 2012.

ABSTRACT: The stroma plays an important role in tumoral invasion and metastasis. Type I collagen is the main structural component of the stroma in several tumors. However, there are few studies on salivary gland tumors. Based on this background the objective of the present communication was to study collagen characteristics with picosirius red/polarization on malignant and benign tumors of salivary glands to evaluate its possible role in the tumoral progression mechanism. Histological sections of pleomorphic adenoma, adenoid cystic carcinoma and epithelial/myoepithelial carcinoma were stained with H/E and picosirius red and were studied with polarization microscope. Collagen birefringence with Picosirius/polarization was different in the malignant tumor stroma (adenoid cystic carcinoma and epithelial-myoeplithelial carcinoma), with predominance of type I collagen, compared with a benign tumor (pleomorphic adenoma), with predominance of type III collagen. The different staining profile in collagen fibers produced in the benign and malignant stroma tumors analyzed could be related with different tumoral expansion mechanism, which were scarce studied on the salivary glands tumors. More studies are needed to obtain more conclusive results to contribute to diagnosis, prognosis and treatment.

KEY WORDS: salivary glands, tumors, collagen, picosirius, polarization, birefringence.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allon, I.; Vered, M.; Buchner A. & Dayan, D. Stromal differences in salivary glands tumors of a common histopathogenesis but with different biological behavior. *Acta Histochem.*, 108(4):259-64, 2006.

Aparna, V. & Charu, S. Evaluation of collagen in different grades of oral squamous cell carcinoma by using the Picosirius red stain – a histochemical study. *J. Clin. Diag. Res.*, 4(6):3444-9, 2010.

- Araújo, V. C.; Demasi, A. P.; Furuse, C.; Altemani, A.; Alves, V. A.; Freitas, L. L. & Araujo, N. S. Collagen type I may influence the expression of E-cadherin and beta-catenin in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 17(4):312-8, 2009.
- Ávila, R. E.; Samar, M. E.; Camps, D.; Fernández, R. & Fernández, J. E. Tumores de glándulas salivales menores. Estudio retrospectivo de 46 casos. *Rev. Esp. Patol.*, 41(1):23-9, 2008.
- Borges, L. F.; Gutierrez, P. S.; Marana, H. R. & Taboga, S. R. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. *Micron*, 38(6):580-3, 2007.
- Cheng, J. C. & Leung, P. C. Type I collagen down-regulates E-cadherin expression by increasing P13KCA in cancer cells. *Cancer Lett.*, 304(2):107-16, 2011.
- Coleman, R. Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochem.*, 113:231-3, 2011.
- De Weber, O. & Mareel, M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J. Pathol.*, 200(4):429-47, 2003.
- Ellis, G. L. & Auclair, P. L. *Atlas of tumor pathology: Tumors of the major salivary glands*. 4th ed. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology (AFIP), 2008.
- Junqueira, L. C.; Cossermelli, W. & Brentani, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch. Histol. Jpn.*, 41(3):264-74, 1978.
- Junqueira, L. C.; Bignolas, G. & Brentani, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, 11(4):447-55, 1979.
- Kakkad, S. M.; Solaiyappan, M.; O'Rourke, B.; Stasinopoulos, I.; Ackerstaff, E.; Raman, V.; Bhujwalla, Z. M. & Glunde, K. Hypoxic tumor microenvironments reduce collagen I fiber density. *Neoplasia*, 12(8):608-17, 2010.
- Koenig, A.; Mueller, C.; Hasel, C.; Adler, G. & Menke, A. Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.*, 66(9):4662-71, 2006.
- Li, A.; Zhou, T.; Guo, L. & Si, J. Collagen type I regulates beta-catenin tyrosine phosphorylation and nuclear translocation to promote migration and proliferation of gastric carcinoma cells. *Oncol. Rep.*, 23(5):1247-55, 2010.
- López-Mínguez, J. R.; Climent, V.; Yen-Ho, S.; González-Fernández, R.; Nogales-Asensio, J. M. & Sánchez-Quintana, D. Características estructurales de los senos de Valsalva y porción proximal de las arterias coronarias. Su relevancia durante la disección retrógrada aortocoronaria. *Rev. Esp. Cardiol.*, 59:696-702, 2006.
- Montes, G. S. & Junqueira, L.C. The use of Picrosirius red-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86(Suppl. 3):1-11, 1991.
- Samar, M. E.; Avila, R. E. & Esteban Ruiz, F. *Técnicas histológicas. Fundamentos y aplicaciones*. Córdoba. Ed. SeisC, 2004.
- Samar, M. E.; Avila, R. E.; Fonseca, I. & Ferraris, R. Sebaceous epithelial/myoepithelial carcinoma of parotid: histopathological and immunohistochemical analysis. *Int. J. Odontostomatol.*, 4(2):189-96, 2010b.
- Samar, M. E.; Avila, R. E.; Fonseca, I.; Asis, O. G.; Ferraris, R. & Lucero, R. Histochemical and immunohistochemical study of the stroma of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Rev. Arg. Morfol.*, 1:5, 2010a.
- Samar, M. E.; Ávila, R. E.; Fonseca, I.; Ferraris, R. V. & Fernández, J. *Tumores de glándulas salivales: aspectos histopatológicos y clínico-epidemiológicos*. Córdoba, Seis Ed., 2009.
- Seifer, G. & Sobin, L. H. *Histological typing of salivary gland tumours*. 2nd ed. Berlin, Springer-Verlag, 1991.

Dirección para correspondencia:

María Elena Samar

Facultad de Ciencias Médicas

Facultad de Odontología.

Fundación para la Educación Investigación y Prevención de

Cabeza y Cuello (FUNDACYC)

Catamarca 1546 (5000)

Córdoba

ARGENTINA

Email: samarcongreso@gmail.com.

Recibido : 19-11-2011

Aceptado: 27-12-2011