

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

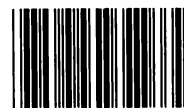
TESIS

EXPRESION DEL ANTIGENO HUMAN MILK FAT GLOBULE
[GLOBULO DE GRASA DE LA LECHE HUMANA (HMFG)]
COMO MARCADOR DEL COMPORTAMIENTO DE LAS
GLANDULAS SALIVALES NORMALES Y TUMORALES.

**PONCE
BRAVO
SANTA
1993**

POR

TESIS



K(1) UNAM



Facultad de Odontología
Div. de Est. de Posgrado e Investigación
Biblioteca "Barnet M. Levy"

DRA. SANTA PONCE BRAVO

1993



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.

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

[illegible]

EXPRESION DEL ANTIGENO HUMAN MILK FAT GLOBULE [GLOBULO DE GRASA DE LA LECHE HUMANA (HMFG)] COMO MARCADOR DEL COMPORTAMIENTO DE LAS GLANDULAS SALIVALES NORMALES Y TUMORALES.

Aprobado por:

C.D. M.O. LUIS A. GAITAN CEPEDA

C.D. M.O. ELBA ROSA LEYVA HUERTA

C.D. M. Sc. ADALBERTO MOSQUEDA TAYLOR

C.D. M. Sc. D.O. JAVIER PORTILLA ROBERTSON

Director de la tesis. ELISA MARIA DURBAN Ph. D.

o

EXPRESION DEL ANTIGENO HUMAN MILK FAT GLOBULE [GLOBULO DE
GRASA DE LA LECHE HUMANA (HMFG)] COMO MARCADOR DEL COMPORTAMIENTO
DE LAS GLANDULAS SALIVALES NORMALES Y TUMORALES.

POR

Dra. SANTA PONCE BRAVO

TESIS

Presentado como requisito para obtener el Grado de
DOCTOR EN ODONTOLOGIA
(PATOLOGIA BUCAL)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

1993

RECONOCIMIENTOS

Dra. Elisa María Durban, Assistant Professor of The University of Texas Health Science Center Dental Branch at Houston, reciba mi más sincero y cariñoso reconocimiento, por sus enseñanzas y conocimientos, que provocaron un cambio en mi forma de pensar y en mi formación profesional en el rea de la Investigación.

Dr. Javier Portilla Robertson, Director de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, muchas gracias por haberme brindado su apoyo y confianza, para que fuera posible la realización de esta tesis.

Dra. Elba Rosa Leyva Huerta, muchas gracias por su ayuda.

Dr. Luis Gaitán Cepeda, Jefe de la Division de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México y a su grupo de colaboradores, por su apoyo muchas gracias.

A la División de Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, a la Universidad Autónoma Metropolitana Plantel Xochimilco, México D. F. y al M. D. Anderson Hospital Cancer Center at Houston, por habernos facilitado los bloques de parafina con las glándulas salivales normales y tumorales que sirvieron para la elaboración de la presente tesis doctoral, ya que sin ellos, dicho trabajo de investigación no hubiera sido posible.

Dra. Rhonda Jacob y Dr. Manuel Luna, patólogo del Hospital M.D. Anderson Cancer Center, muchas gracias por habernos facilitado dichos tejidos.

A mi querida Facultad de Odontología y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme abierto las puertas del conocimiento.

Pero principalmente a aquellos que me dieron la vida, a mis muy queridos padres Juan Ponce Zárate y Ofelia Bravo Esquivel de Ponce. Por su valioso e invaluable apoyo, por sus consejos y conocimientos de la vida, a los que les debo esto y mucho más, pero principalmente por su amor, cariño y confianza, muchas gracias de todo corazón.

A mis queridos hermanos Grisell, Juan, Abigail y Porfirio Adán Ponce Bravo, que desde su muy particular forma de ser contribuyeron con su apoyo y cariño.

Muy especialmente a una mujer, que estuvo llena de fortaleza, dedicación y con una gran visión de la vida, ejemplo para mi Familia y para mí, mi querida abuelita Porfiria Esquivel Enciso.

Para todos mis amigos, familiares y personas vinculadas conmigo en mi vida profesional y personal, muchas gracias.

Esta tesis fue apoyada por el National Institutes of Health (NIH) grant DE 07766 y por la Facultad de Odontología, U.N.A.M.

INDICE

PAGINA

I. INTRODUCCION

A. SUMARIO	6
B. GLANDULAS SALIVALES NORMALES	7
1. Características histológicas	7
2. Sistema inmunológico	19
3. Secreciones salivales	21
a) Mucinas	22
b) Funciones de las mucinas	23
C. TUMORES DE GLANDULAS SALIVALES	25
1. Tumorigénesis de las glándulas salivales	26
2. Clasificación de los tumores de las glándulas salivales	29
3. Características histopatológicas	31
a) Tumores benignos	32
1) Adenoma pleomorfo (tumor mixto)	32
2) Adenoma oxifílico (Oncocitoma)	35
b) Tumores malignos	36
1) Carcinoma mucoepidermoide	36
2) Carcinoma adenoideo quístico	38
3) Carcinoma epidermoide	40
D. MILK FAT GLOBULE MEMBRANE (MEMBRANA DEL GLOBULO DE GRASA DE LA LECHE)	
1. Origen de la membrana	41
2. Composición de la membrana	43
3. Relación con las glándulas salivales	44
E. ANTICUERPOS MONOCLONALES	46
1. Producción	48
2. Aplicaciones	53
F. HIPOTESIS Y OBJETIVOS ESPECIFICOS	55

II. MATERIALES Y METODOS	56
III. RESULTADOS	68
IV. DISCUSION	108
V. SUMMARY	112
VI. CONCLUSIONES	114
VII. BIBLIOGRAFIA	115

INDICE DE TABLAS

- 1.- REACCION DE LA GLANDULA SUBMANDIBULAR CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA HMFG: HMFG1, HMFG2, LBL1-LBL6.
- 2.- RESPUESTA DE LA GLANDULA PAROTIDA CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA HMFG: HMFG1, HMFG2, LBL1-LBL6.
- 3.- INMUNOREACCION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA HMFG EN LAS GLANDULAS SALIVALES LABIALES (4 muestras).
- 4.-REACCION CON LOS ANTICUERPOS CONTRA HMFG EN GLANDULAS SUBMANDIBULARES CON ALTERACIONES PRE-NEOPLASICAS.
- 5.- ESTRUCTURAS DUCTIFORMES: REACCION DE SUS COMPONENTES CON LOS ANTICUERPOS HMFG1-HMFG2, LBL1-LBL2.
- 6.- ESTRUCTURAS DUCTIFORMES: REACCION DE SUS COMPONENTES CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES LBL3-LBL6.
- 7.- METAPLASIA ESCAMOSA: INMUNOREACCION CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES HMFG1-HMFG2, LBL1-LBL2.
- 8.- METAPLASIA ESCAMOSA: INMUNOREACCION CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES LBL3-LBL6.
- 9.- INMUNOREACCION DE LAS CELULAS FUSIFORMES DE LOS ADENOMAS PLEOMORFOS CON LOS ANTICUERPOS CONTRA HMFG.
- 10.- ANALISIS DEL NUMERO DE TUMORES QUE REACCIONARON CON LOS ANTICUERPOS CONTRA HMFG.
- 11.- CARCINOMA MUCOEPIDERMIOIDE: REACCION CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA HMFG, HMFG1-HMFG2, LBL1-LBL2.
- 12.- CARCINOMA MUCOEPIDERMIOIDE: REACCION CON LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA HMFG, LBL3-LBL6.

INDICE DE FIGURAS

FIG. 1.- Inmunoreacción de las glándulas submandibulares normales con los anticuerpos monoclonales para HMFG: (a) se puede observar que HMFG1 reacciona (3+) en los conductos [intercalares (CI) y estriados (CE)] y secreción, (b) HMFG2 reacciona con las mismas estructuras con diferente intensidad (ductos 2+ y secreción 3+), (c) con LBL2 se observó reacción (2+) sobre los acinos mucosos (AM) y (d) LBL3 reaccionó (2-3+) principalmente en los acinos serosos (AS).

FIG. 2.- Inmunoreactividad de las glándulas salivales labiales con los anticuerpos monoclonales contra HMFG. En estas glándulas la reacción mostró variaciones de lo observado con las glándulas submandibulares; (a) HMFG2 reaccionó (+ - 1+) con los ácinos serosos (AS), mucosos (AM) y con los conductos (C), (b) LBL1 reaccionó en las células acinares mucosas (1+), (c) al igual que LBL3 sobre las células acinares mucosas (2-3+) mientras (d) LBL4 muestra una reacción (2+) con aspecto granular sobre los acinos serosos.

FIG. 3.- Cortes histopatológicos teñidos con H-E de los adenomas pleomorfos observando (a, b y c) estructuras ductiformes (ED) con coágulos eosinófilos y secreciones, células fusiformes (CF) y estrelladas, así como metaplasia escamosa (ME) y formación de perlas de queratina (PQ) (d).

FIG. 4.- Reacción de los anticuerpos contra HMFG en los adenomas pleomorfos con (a) HMFG2 (FO31485) se observa reacción (3+) en la superficie luminal de las estructuras ductiformes (ED), con (b) LBL1 (FO31487) podemos ver que reacciona (3+) con las células fusiformes (CF), (c) LBL2 (FO5887) muestra una reacción (2+) sobre la metaplasia escamosa (ME) y las perlas de queratina (PQ), en tanto que con (d) LBL4 (FO7177) se puede observar una fuerte reacción con las células epiteliales de forma poliédrica.

FIG. 5.- Reacción de un Carcinoma mucoepidermoide de bajo grado de malignidad (FO24987) con los anticuerpos contra HMFG (a) H-E, con (b) HMFG1 reaccionó principalmente sobre la secreción (S) y las células epidermoides (CE), (c) HMFG2 reaccionó (3-4+) con las células mucosecretoras (CM) y la secreción y (d) LBL6 reaccionó (2+) con la secreción. Noten que la reacción de estos tumores con los anticuerpos contra HMFG varía dependiendo del grado de malignidad (vea; resultados pag. 97-103).

FIG. 6.- Reacción de un Carcinoma adenoideo quístico. Con (a) tinción de H-E se caracteriza por un patrón ductiforme (SS753176I7), con los anticuerpos contra HMFG solamente reaccionó con (b) HMFG1 y (c) HMFG2 en forma leve (1+) sobre la superficie luminal.

I. INTRODUCCION

A. 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 esto, muy poco esfuerzo se ha dirigido a utilizar estas técnicas en relación con tumores de las glándulas salivales.

La expresión de antígenos de la membrana del glóbulo de grasa de la leche humana (HMFG) por las glándulas salivales puede servir como marcador en el comportamiento de las glándulas salivales normales y anormales, esto en forma análoga con los estudios de la glándula mamaria.

B. GLANDULAS SALIVALES NORMALES

La cavidad oral esta constantemente ocupada y humedecida por un fluído conocido como saliva o fluido oral. Este fluído está formado por saliva, fluído crevicular, leucocitos y células epiteliales descamadas (Seifert et al., 1986; Mandel, 1987; Martinez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989).

La saliva es un fluído complejo producido por las glándulas salivales. En los seres humanos existen tres pares de glándulas salivales mayores; parótida, submandibular y sublingual. La posición de numerosas glándulas salivales menores incluyen: paladar, mucosa bucal, labios, región retromolar, glándula de Von Ebner y glándulas de la base y bordes laterales de la lengua (Mason y Chisholm, 1975; Seifert et al., 1986; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989).

1.- Características histológicas

Las glándulas salivales son glándulas tubulo-acinares de secreción exocrina, caracterizadas por numerosas unidades secretorias. Estas unidades secretorias están formadas por acinos (donde se produce la secreción) y un sistema de conductos, encargados del acarreo de la secreción hacia la cavidad oral y que regula la concentración de agua y electrolitos (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Fig. 1).

Las unidades secretorias de las glándulas salivales son de tres tipos: **unidades serosas**, las cuales contienen amilasa, lactoperoxidasa (Mandel y Wotman, 1976; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989), lisozima lactoferrina, antiquimiotripsina, antitripsina (Aroni et. al., 1988); **unidades mucosas**, que secretan sialomucina y por último las **unidades mixtas**, formadas por células mucosas y serosas (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989). En general secretan enzimas como la fosfatasa alcalina, esterases

no específicas, ribonucleasas, calicreina y la enzima deshidrogenasa del ácido láctico, que fué determinada en la glándula parótida (Mandel y Wotman, 1976).

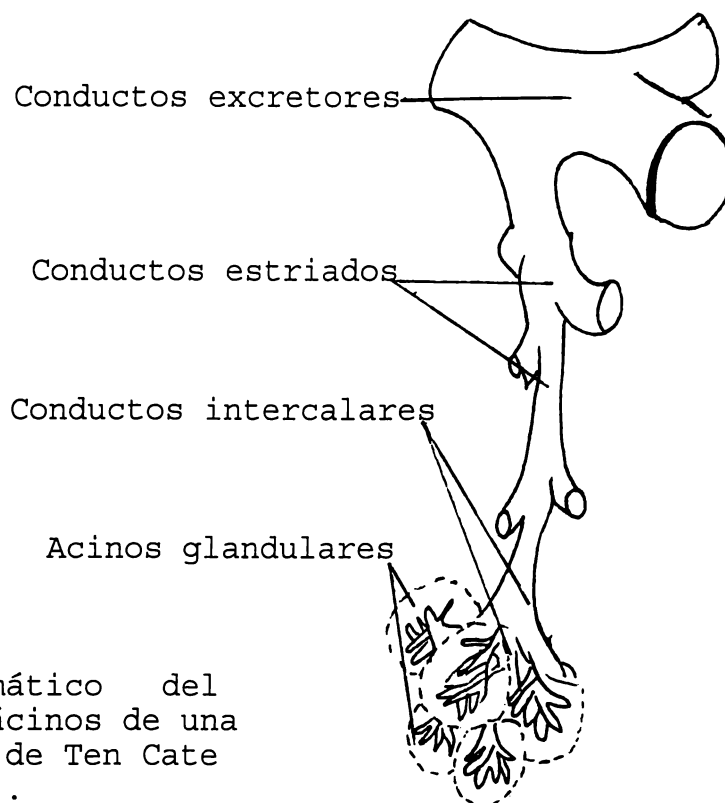


Fig. 1 Diagrama esquemático del sistema de conductos y ácinos de una glándula salival (adaptado de Ten Cate A.R. Oral Histology. 1989).

Por su tipo de secreción, las glándulas salivales se clasifican en: **Serosas** (glándula parótida y glándula de Von Ebner); **Mucosas** (glándulas del paladar y de los bordes laterales y base de la lengua) y **Mixtas** (glándula submandibular con predominio seroso; glándula sublingual, predominantemente mucosa y las glándulas salivales menores de labios, mucosa bucal y apicales de la lengua) (Seifert et al., 1986; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989) (Fig. 2).

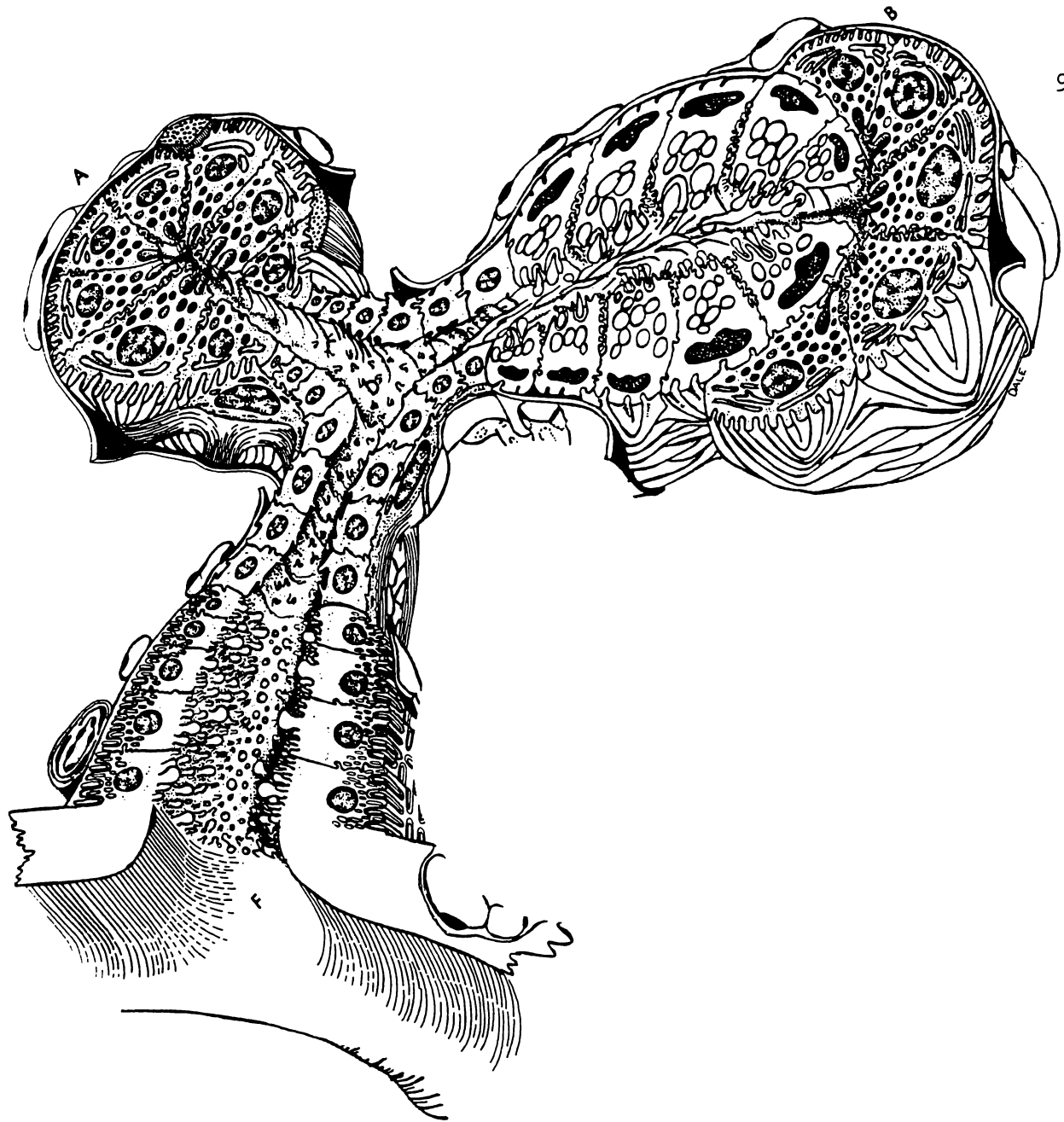


Fig. 2 Esquema de una glándula salival. A) Acino seromucoso, B) Media luna de un ácino seromucoso, C) Acino mucoso, D) Conducto intercaler, E) Conducto estriado y F) Conducto excretor (Adaptado de : Ten Cate A.R. Oral histology. 1989).

Acinos

Dependiendo del tipo de secreción de la glándula, los acinos se componen de: ácinos serosos, constituidos por un grupo de células epiteliales con forma piramidal rodeadas por una membrana basal. Las células epiteliales tienen un núcleo basal grande y

esférico, citoplasma denso con gránulos de zimógeno basófilos, P.A.S. positivos (Acido Peryódico de Schiff). La enzima primaria en los gránulos de zimógeno es la amilasa o la tialina (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989). También contiene un ergastoplasma rico en Acido Ribonucleico (ARN), en la parte basal de la célula, enzimas como la fosfatasa ácida, esterases, glucuronidasas, glucosidasas y galactosidasa (Seifert et al., 1986) y otras enzimas antibacterianas no específicas como son la lisozima y la lactoferrina (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

En contraste, el acino mucoso contiene un lúmen glandular claro. La célula que lo constituye es de forma piramidal, de núcleo basal pequeño, con abundante citoplasma, ocupado por vacuolas mucosas que contienen mucinas ácidas y neutras en concentraciones variables (Seifert et al., 1986; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989).

Los acinos mucosos son caracterizados por la concentración de células mucosas cerca del conducto intercalario y son rodeados por formaciones de células serosas (Fig. 3).

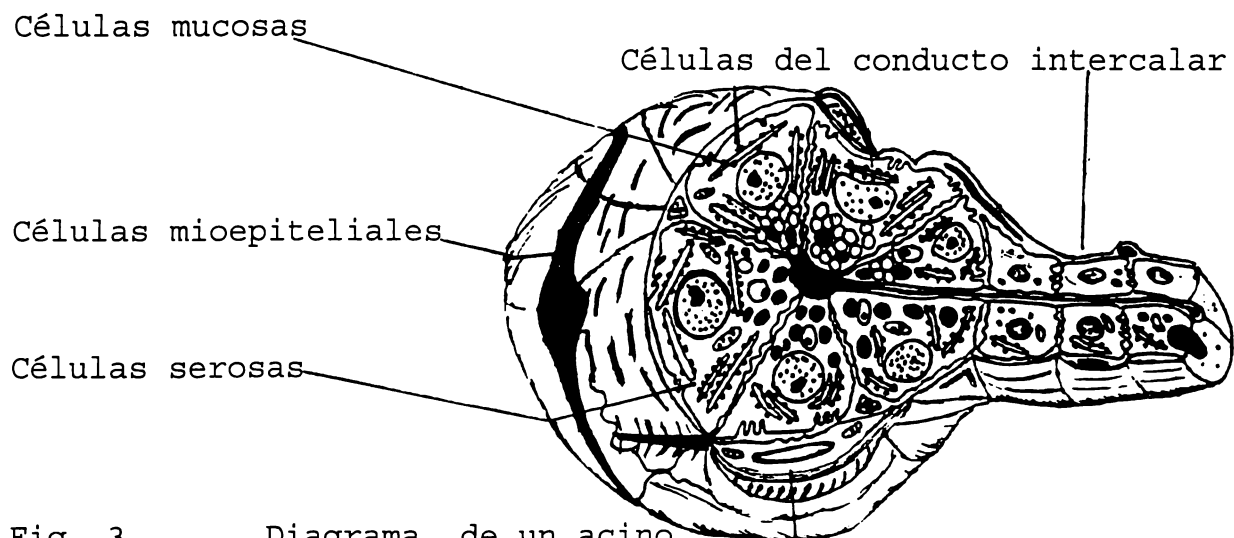


Fig. 3 Diagrama de un acino glandular (adaptado de Seifert G. et al. Disease of the salivary glands. 1986).

Célula mioepitelial

El término de célula mioepitelial fué usado por primera vez en 1897 por Renault. Este nombre describe las características similares de esta célula, con las células del músculo liso y con las células epiteliales. Esto ha provocado especulaciones respecto a su origen epitelial o mesenquimatoso (Palmer, 1986), ectodérmico o endodérmico, pero esta célula posee funciones y estructuras de célula epitelial y de célula mesenquimatosas (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

La célula mioepitelial se localiza entre la célula epitelial y la lámina basal del acino y del conducto intercalar (Garret y Emmelin, 1979; Dardick et al., 1982; Palmer, 1986; Seifert et al., 1986; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989) y probablemente también se encuentra en la unión de los conductos estriados e intercalares. Esta célula tiene forma estrellada o de cesta, con prolongaciones citoplásmicas que se extienden sobre la superficie epitelial, formando una malla contráctil (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Figs. 4 y 5).

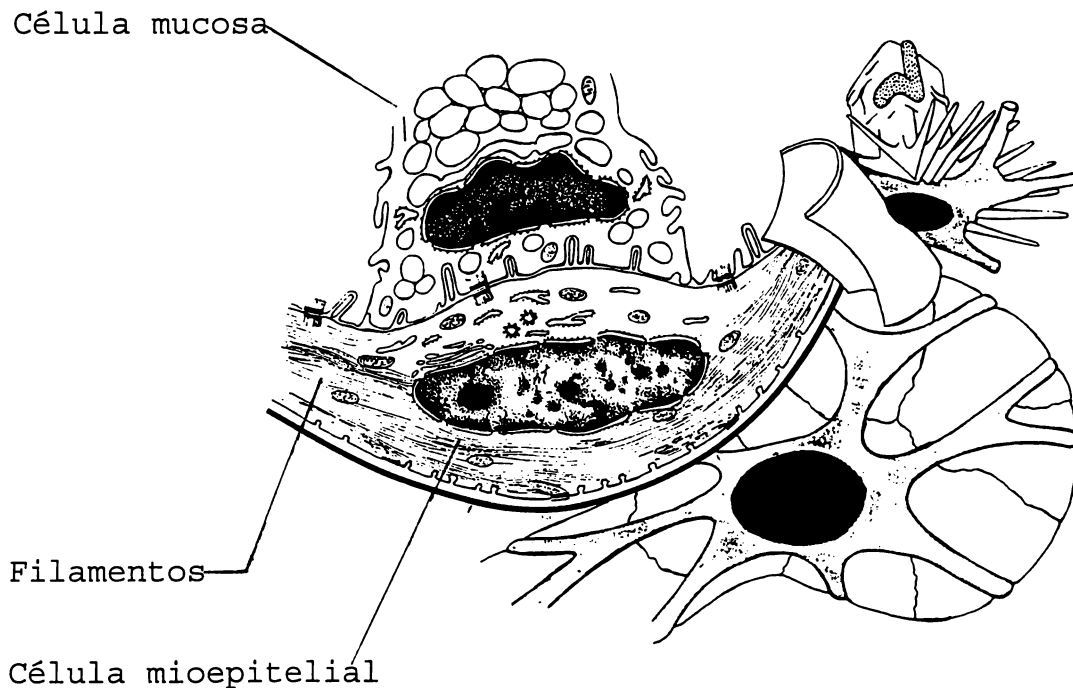


Fig. 4 Diagrama de una célula mioepitelial con dos aspectos (adaptado de Ten Cate A.R. Oral Histology. 1989)

Las células mioepiteliales muestran una separación de su citoplasma en dos partes principales, una parte no filamentosa y la otra filamentosa (Garret y Emmelin, 1979). La parte no filamentosa contiene un núcleo central con dirección hacia la lámina basal. El aparato de Golgi se localiza cerca del núcleo, contiene poco retículo endoplásmico rugoso, ribosomas y cuerpos semejantes a lisosomas. También, no son frecuentes las mitocondrias, y si están, se ven principalmente en el pericarión y en las prolongaciones celulares. El citoplasma también contiene glucógeno y glóbulos de grasa neutra (Garret y Emmelin, 1979).

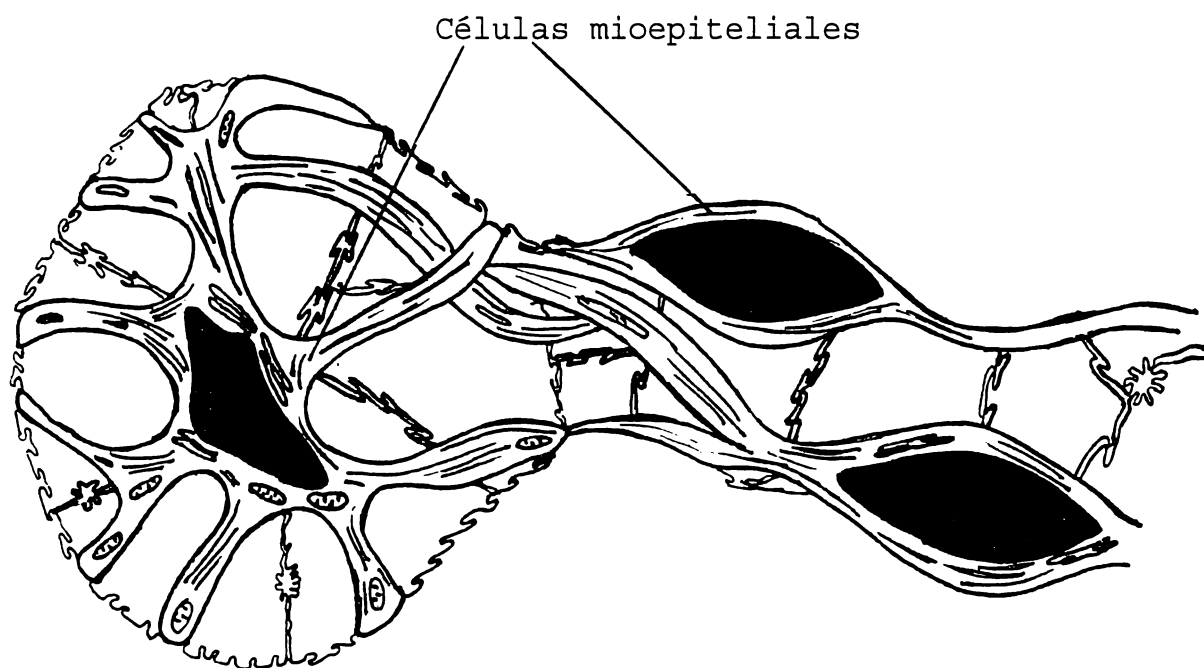


Fig. 5 Representación esquemática de células mioepiteliales asociadas con un acino y un conducto intercalar de la glándula submandibular de rata (reproducido de Garret J.R. y Emmelin N. Activities of salivary myoepithelial cells. A review. Medical Biology. 57: 1-28. 1979).

La parte filamentosa esta constituida en su mayoría por miofilamentos de actina, miosina y tropomiosina, los cuales están arreglados con un patrón similar a las células del músculo liso (Yanagawa et al., 1986). Haces de tonofilamentos y tonofibrillas de filamentos intermedios están adheridos a las uniones celulares, principalmente a los desmosomas, éstos filamentos están constituidos por citoqueratina. La vimentina no se encuentra constante y el filamento de desmina está ausente en la célula mioepitelial normal (Morinaga et al., 1987). El citoplasma tiene una fuerte actividad de ATPasa y de fosfatasa alcalina (Garret y Emmelin, 1979; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

Una de las funciones de la célula mioepitelial es la de contracción, expulsando rápidamente la saliva e incrementando la presión en las unidades secretoras (Palmer, 1986; Seifert et al., 1986; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989). La oxitocina induce la contracción en la célula mioepitelial (Martínez-Madrigal y Micheau, 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 la lámina basal. Esto es importante ya que en algunas alteraciones hiperplásicas o neoplásicas, ellas producen fibronectina, laminilla y colágena tipo III, que son proteínas constituyentes de la lámina basal (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

Martínez-Madrigal y Micheau, (1989) sugieren que los principales tipos morfológicos de la célula mioepitelial alterada son:

- 1.- Célula estrellada o con aspecto mixoide, que son manifestaciones típicas en áreas condromixoides del adenoma pleomorfo.
- 2.- Célula 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 (Fig. 6).

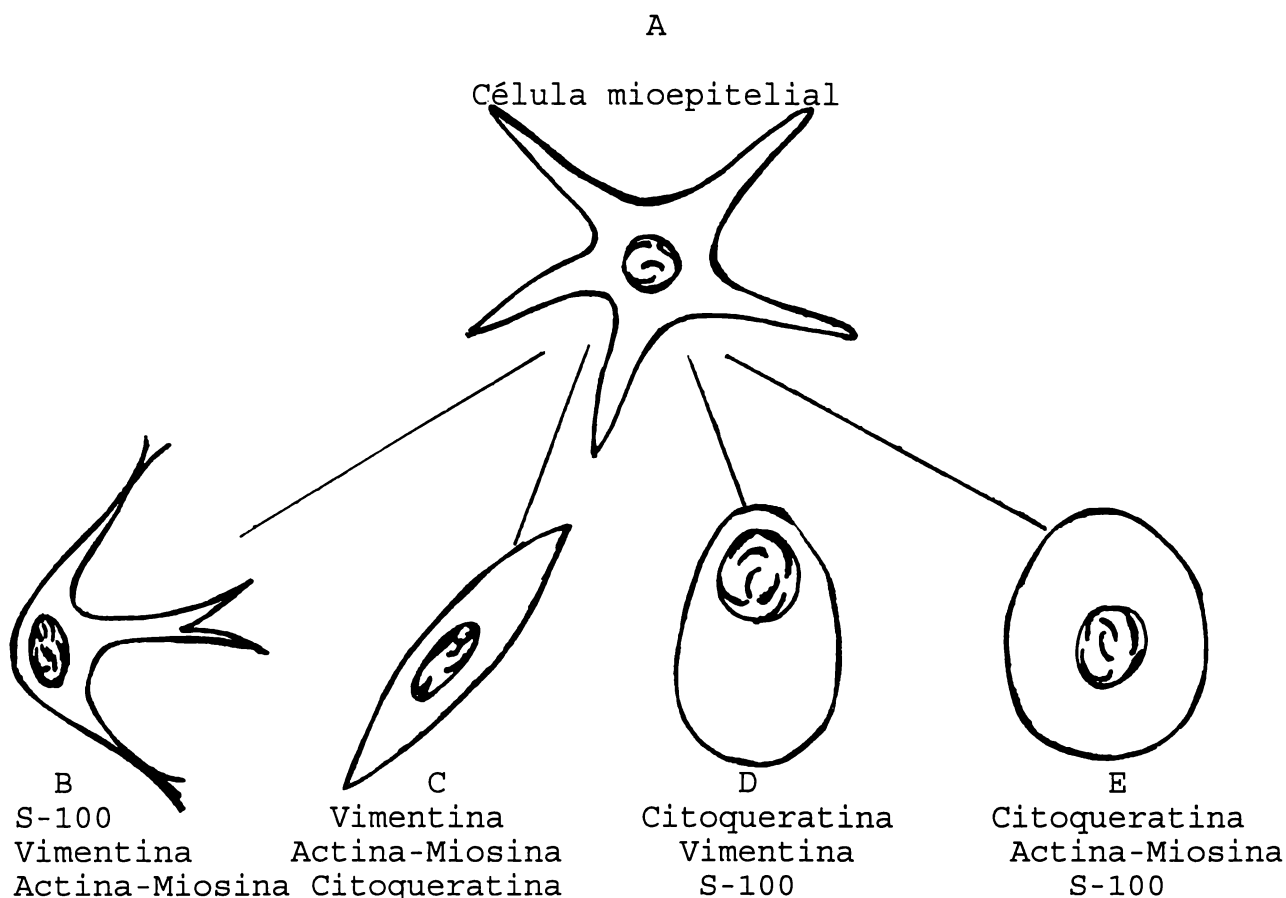


Fig. 6 Morfología y formas histológicas de células mioepiteliales normales (A) y modificadas (B-E). Las formas observadas más constantemente en orden de frecuencia son: B) Condromixóide, C) Fusiforme, D) Plasmocitoide o hialina y E) Epitelial (reproducido de: Martínez-Madrigal F. y Micheau C. Histology of the major salivary glands. Am. J. Surg. Pathol. 13(10), 879-899, 1989).

Martínez-Madrigal y Micheau, (1989) reportan que las células mioepiteliales con características mesenquimatosas, pueden secretar ácidos glucosaminoglucanos (ácido hialurónico, reparan sulfato, condroitin-4-sulfato y condroitin-6-sulfato) constituyentes de la membrana basal y elastina.

Sistema de conductos

El sistema de conductos transporta la saliva desde la glándula a la cavidad oral y modifica las concentraciones de agua y electrólitos (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989). El sistema de conductos comprende una variedad de redes de conductos los cuales están caracterizados por miembros progresivamente menores. Esta red contiene tres clases de conductos: **los conductos intercalares, estriados y terminales** (Ten Cate, 1989).

Los primeros dos segmentos, constituidos por los conductos estriados e intercalares, son intralobulares. También son conocidos como "**conductos secretores**" por su actividad metabólica. El otro segmento está constituido por los conductos interlobulares, llamados también "**conductos excretores**" (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

Los **conductos intercalares** son cortos en la glándula submandibular (Seifert et. al., 1986) en tanto que en la glándula parótida son largos. Los conductos intercalares están en contacto directo con los ácinos (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989). Están revestidos por una capa de epitelio cúbico, con núcleo central y citoplasma pequeño, conteniendo algo de retículo endoplásmico rugoso localizado basalmente. Tienen escasa cantidad de aparato de Golgi, el cual está situado apicalmente y algunos gránulos secretorios, especialmente en las células cercanas a la porción secretora.

Las células cuboidales de los conductos intercalares tienen pocas microvellosidades hacia la luz del conducto y en sus bordes laterales tienen interdigitaciones con cada una de las otras células y son conectadas por complejos de unión apicalmente y por uniones desmosómicas. (Ten Cate, 1989). Finalmente están cubiertas por una capa irregular de células mioepiteliales en la

superficie externa (Seifert et. al., 1986; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989; Ten Cate, 1989). 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 (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989).

Un alto grado de pleomorfismo estructural está descrito en los conductos intercalares de las glándulas labiales y de paladar blando (Ten Cate, 1989). Se han descrito células indiferenciadas en la porción basal de los conductos intercalares. Estas células son positivas con tinciones de inmunohistoquímica, para citoqueratina 13 y 16. Estas podrían ser células progenitoras (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989), lo que está sujeto a controversia.

Los **conductos estriados** en la glándula submandibular son más largos que en las otras glándulas. Poseen una capa de epitelio columnar simple. En la cara basal, tiene estriaciones paralelas causadas por invaginaciones de la membrana, dentro de las cuales se encuentran numerosas mitocondrias orientadas verticalmente. Esta capa comprende una superficie especializada en el epitelio, involucrada en el transporte de agua y electrolitos. Varias enzimas como la succinilhidrogenasa, ATPasa y anhidrasa carbónica están en el citoplasma de las células del conducto estriado (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989) (Fig. 7).

El potencial energético de las células del conducto estriado está dado por el sistema ATPasa en la membrana celular y por las enzimas oxidativa e hidrolítica de las mitocondrias.

El conducto estriado también puede concentrar yodo y secretar otros elementos de la saliva (Seifert et. al., 1986). El sistema de conducto interlobular sucede a los conductos intercalares y estriados. Están localizados en los septos de tejido conectivo, están revestidos por epitelio columnar pseudoestratificado, con células de Goblet intercaladas (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 (Ten Cate, 1989).

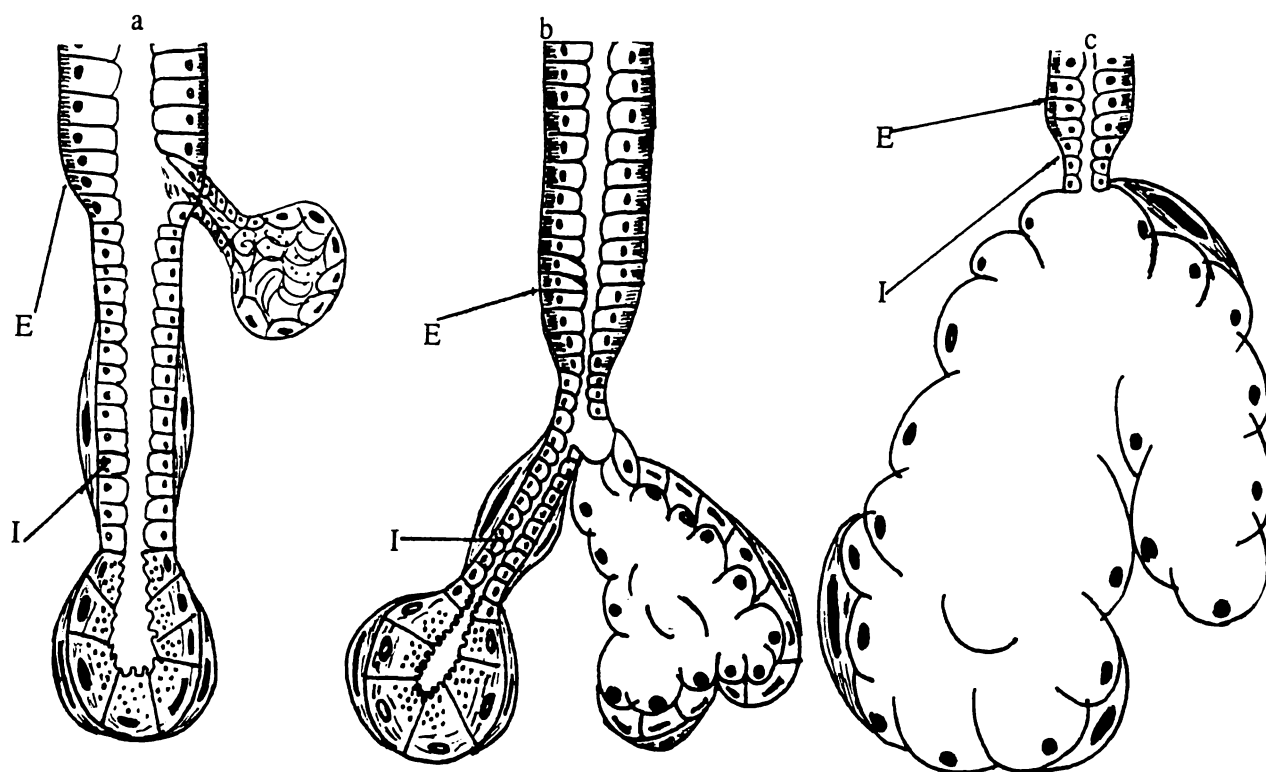


Fig.7 Morfología de las glándulas salivales mayores, caracterizadas por tres tipos de unidades secretorias; a) glándula parótida, muestra su conducto intercalalar (I) más largo que en la glándula submandibular (b) y la sublingual (c), en contraste el conducto estriado (E) es más largo en la glándula submandibular. En la glándula sublingual los conductos son indefinidos. Las glándulas sebáceas son más comunes en la glándula parótida (adaptado de Martínez-Madrigal F. y Micheau C. Histology of the major salivary glands. Am. J. Surg. Pathol. 13 (10): 879-899, 1989).

Algunos investigadores sugieren la existencia de células con potencial proliferativo en el sistema de conductos de las glándulas salivales, pero actualmente su localización exacta es controversial. Martínez-Madrigal y Micheau, (1989) sugieren que éste tipo de célula "stem" está presente en los conductos interlobulares, tienen un papel importante en la regeneración, por ser hipotéticamente células pluripotenciales indiferenciadas. En teoría estas células siguen la misma línea celular como en su desarrollo embrionario. Mientras que en otros estudios, Zajicek

et. al., (1989) utilizando células marcadas con timidina tritiatada [3 H] TdR, concluyen que este tipo de células se encuentran en los conductos intercalares de la glándula submandibular de ratas (Zajicek et. al., 1989). Pero hasta el momento no existe evidencia experimental de la localización exacta de este tipo celular en las glándulas salivales.

Sistema mesenquimatoso

El **sistema mesenquimatoso** está constituido por tejido conectivo, formado por una matriz extracelular de fibras de colágena y sustancias mixtas, como glucoproteínas y proteoglucanos. También contiene fibras de oxitalán en las glándulas salivales menores y en la glándula submandibular (Ten Cate, 1989).

Las funciones del sistema mesenquimatoso incluyen: estabilización de la estructura lobular, transporte de metabolitos en el sistema vascular aferente y eferente, transmisión de estímulos por las vías nerviosas autónomas (Seifert et. al., 1986).

La extensión de un complemento vascular a las glándulas salivales es requerido para la secreción rápida de saliva, la cual es agua en un 99%.

Células claras

Existe otro tipo de células en las glándulas salivales normales y anormales, las cuales son denominadas células claras. Estas células son identificadas con tinciones especiales. Son células indiferenciadas con citoplasma claro, con pocos organelos y con gránulos de glucógeno, que son disueltos durante la fijación con formalina. Las funciones de éstas células no se conocen a pesar de que Seifert et. al., (1986), las consideran encargadas de la regeneración. Estos autores también consideran a

las células sebáceas (vacuolas lipídicas), a las células de Goblet (vacuolas mucosas) y a las células mioepiteliales como células claras.

2. Sistema inmunológico

El sistema inmune en la mucosa oral es provisto por las glándulas salivales. Las glándulas salivales desarrollan protección en contra de varios patógenos y toxinas, a través de la secreción de anticuerpos, específicamente inmunoglobulina IgA secretoria (sIgA) (Kraus y Konno, 1963; Kraus y Konno, 1965). La sIgA es una forma especial de IgA, la cuál actúa predominantemente como anticuerpo en varios fluidos corporales externos como: lágrimas, leche, secreciones nasales, secreciones gastrointestinales, bilis y saliva (Kakizawa et. al., 1973; Hayashi et. al., 1989).

La IgA es producida por las células plasmáticas en el tejido conectivo que rodea a los ácinos glandulares y atraviesa la membrana basal (Mandel y Wotman, 1976) y se une con el componente secretorio (CS) que es producido por las células acinares (Hayashi et. al., 1989). Llegando a la saliva como IgA dimérica (Mandel y Wotman, 1976) (Fig. 8). El CS protege a la IgAs de la inactivación y destrucción en el medio ambiente bucal, de los cambios de pH y proteasas (Kraus y Konno, 1965).

En un estudio realizado por Hayashi et. al. (1989) observaron inmunohistoquímicamente que CS se encuentra en las células epiteliales de las glándulas submandibulares fetales, y que la cantidad de CS en las células epiteliales aumenta gradualmente conforme avanza la edad. CS aparece localizado en las células de los conductos y de los ácinos serosos, pero no en los ácinos mucosos. CS sirve como receptor específico mediando en el transporte transepitelial de inmunoglobulinas poliméricas. Se ha reportado que la IgA migra desde los nódulos linfáticos mesentéricos hasta el tejido glandular dentro de los linfocitos B.

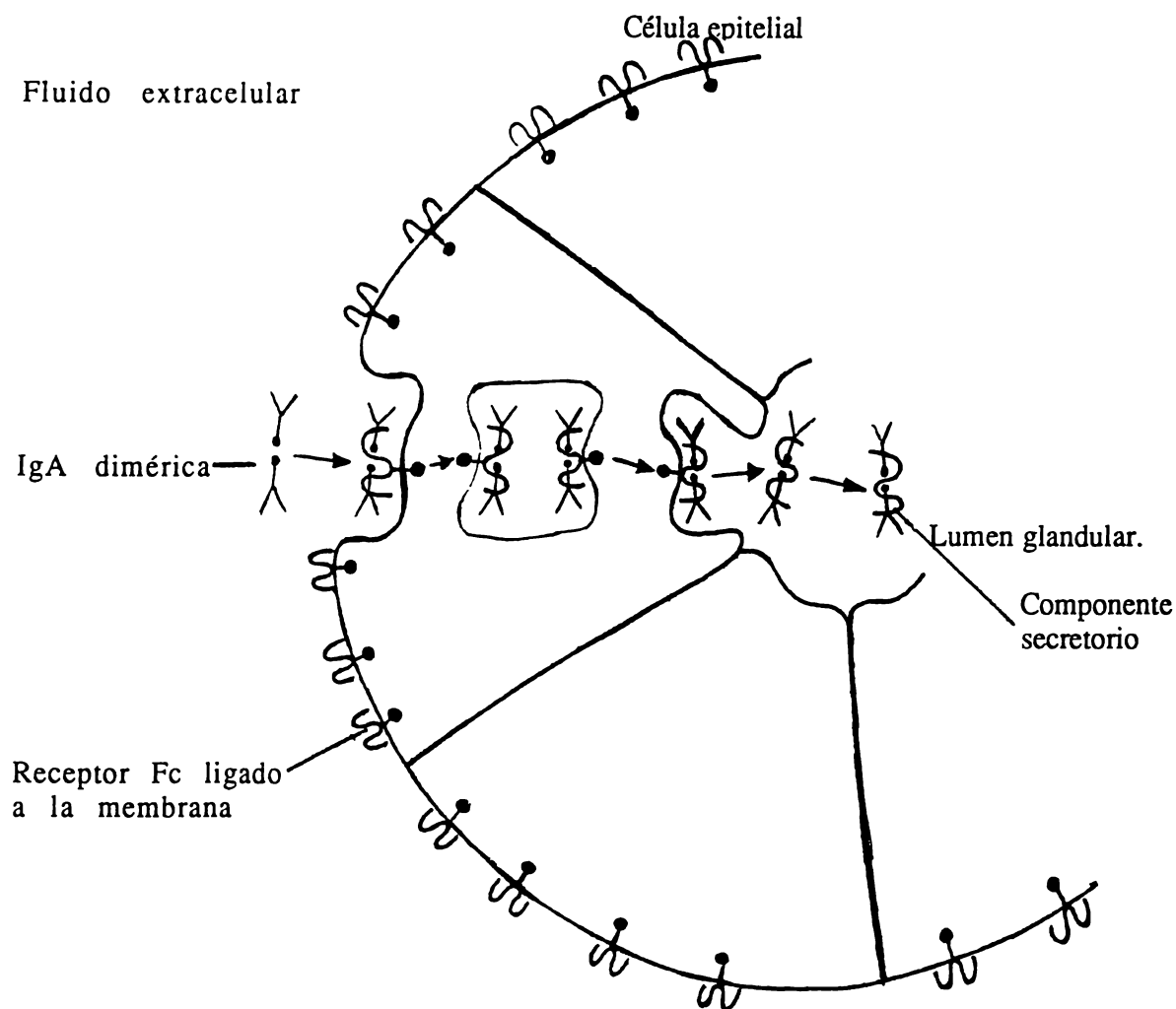


Fig. 8 Diagrama que explica el paso de la IgA dimérica a través de la célula epitelial y se une al receptor Fc que se encuentra en la superficie no luminal de la célula epitelial. La IgA y el receptor son ingeridos por endocitosis y transportados en vesículas, es secretada la IgA junto con el componente secretorio por exocitosis. Cuando es expuesto al lumen glandular, la parte del receptor Fc queda clavado durante todo el proceso en la transmembrana (adaptado de Alberts B. et al. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. 2nd Edition 1989).

3. Secreciones salivales

Todas las células eucarióticas sintetizan proteínas, las cuales son llevadas al medio extracelular. Durante la síntesis, las proteínas secretorias son secretadas dentro del citoplasma, atravesando por translocación las membranas del retículo endoplásmico. Subsecuentemente las vesículas son acarreadas a distintos subcompartimentos del aparato de Golgi y finalmente son expulsados por exocitosis al exterior. Durante la exocitosis, la membrana granular es conservada y posterior a la descarga, existe el cierre de la membrana por re-internalización y por restitución de la población granular (Castle et. al., 1987).

El volúmen y la composición de electrólitos de la saliva son modificados por numerosos factores, incluyendo: la especie, el tipo de glándula, la naturaleza, intensidad y duración del estímulo, circulación local y condiciones metabólicas, dieta y status nutricional, edad, balance endócrino, drogas y enfermedades (Mandel y Wotman, 1976; Mandel, 1987; Martínez, 1987).

La secreción primaria en el ácino salival es isotónica. El fluido secretado por el ácino es el paso inicial en la formación de saliva. La saliva es modificada progresivamente en los conductos salivales, y el mayor transporte de electrólitos ocurre en el conducto excretor principal.

Por los años de 1960 y 1970 varios conceptos básicos acerca de la secreción de agua y metabolitos en las glándulas salivales surgieron: 1) los iones y el agua fueron inicialmente secretados en los ácinos salivales, como una secreción isotónica primaria semejante al plasma; 2) la estimulación altera el volúmen, pero no la composición o la osmolaridad, de esta secreción primaria; 3) el contenido de electrólitos, pero no el contenido de agua, de la secreción primaria fue significativamente alterada por las células del conducto; 4) la función de transporte de iones de éstas células fueron modificadas por estímulos autónomos (Martínez, 1987).

La saliva es un complejo fluido de mucinas (glucoproteínas) largas y cortas, electrólitos, proteínas, azúcares, bacterias, enzimas, etc. Los constituyentes como proteínas y polisacáridos, en un medio acuoso, forman fluidos viscoso-elásticos (Mandel y Wotman, 1976; Schwartz et. al., 1987). También las glucoproteínas son polielectrolitos. La saliva natural es lábil y no homogénea (Schwartz et. al., 1987).

a).- Mucinas

Las mucinas salivales son proteínas secretadas de alto peso molecular (Cohen et. al., 1989; Tabak, 1991), producidas por células mucosas de las glándulas salivales mayores y menores. Estas juegan un papel muy importante en la protección de la superficie oral (Tabak, 1982). Recientemente se ha identificado un locus genético humano que codifica una familia de glucoproteínas tipo mucina. Este locus es definido como **GEN AUTOSOMICO SENCILLO** el cual es polimórfico (Swallow et. al., 1987; Gendler et. al., 1987). Los productos proteicos de este locus son mucinas de alto peso molecular que abundan en varios tejidos epiteliales, fluidos corporales y tumores derivados de tejido epitelial. Estas proteínas que se han estudiado casi exclusivamente en la glándula mamaria son altamente inmunogénicas.

Composición de las mucinas salivales humanas

Existen diferentes tipos de mucinas, estudios al respecto describen con más detalle dos mucinas estructural y funcionalmente diferentes, tanto en las subunidades como en los aminoácidos de la porción terminal-N, con diferente peso molecular, muestran variaciones en la composición de carbohidratos y glucoproteínas y en las uniones de los componentes (Kawagishi et. al., 1990).

Estas mucinas han sido estudiadas en la saliva de las glándulas submandibular y sublingual humanas. La mucina-glucoproteica 1 (MG1) es de alto peso molecular, larga, con múltiples subunidades y la mucina-glucoproteica 2 (MG2), de bajo peso molecular, pequeña, con subunidades sencillas. Estas mucinas están compuestas por varias estructuras dominantes, cada una de las cuales, puede ser responsable de las actividades biológicas en la boca (Levine et. al., 1987; Cohen et. al., 1989).

MG1 consiste de varias subunidades glucosiladas y no glucosiladas con uniones de disulfuro, las cadenas de oligosacáridos son significativamente más largas, contiene más sulfato pero menos ácido siálico que MG2 y contiene ácidos grasos covalentes. MG2 está compuesta por una cadena peptídica sencilla, uniformemente glucosilada (Levine et. al., 1987).

Algunos estudios han demostrado la presencia de mucinas glucoproteicas entre las células mucosas de los ácinos de la glándula submandibular, incluyendo mucinas neutras, mucinas sulfatadas, carbomucinas y sialomucinas (Levine et. al., 1987). La distribución y la inmunolocalización de las mucinas salivales humanas no han sido descritas.

b) Funciones de las mucinas salivales humanas

Las diferentes familias pueden tener funciones comunes, pero éstas funciones pueden ser muy específicas. Por ejemplo, las glucoproteínas enriquecidas en los residuos terminales con ácido siálico (mucinas) pueden interactuar con microorganismos estructurales adherentes con ácido siálico.

Otras que contengan residuos terminales de galactosa (glucoproteína rica en prolina) puede interactuar con microorganismos con estructuras adherentes que contengan galactosa (Levine et. al., 1987).

Las dos mucinas salivales humanas que han sido más estudiadas, tienen diferentes funciones, lo que puede atribuirse a diferencias estructurales. Funciones importantes:

- 1) MG1 Formación temprana de una capa de tejido
 - a) Barrera de permeabilidad
 - 1) Protección contra la desecación
 - 2) Protección contra el medio ambiente
 - b) Viscoelasticidad
 - c) Lubricación
 - d) Concentración de moléculas protectoras en la interfase con el medio ambiente.
 - 1) Lisozimas
 - 2) IgA secretora
 - 3) Fosfoproteínas
- 2) MG2 Formación de una película bacteriana
 - a) Espacio libre entre los microorganismos
 - b) Co-agregación
- 3) Asialo-MG2 Formación tardía o modificada de una cubierta tisular
 - a) Adhesión microbiana
 - b) Co-agregación.

Las propiedades lubricantes de las glucoproteínas salivales, son debidas en parte al contenido de carbohidratos en estas moléculas (Levine et. al., 1987).

C. TUMORES DE LAS GLANDULAS SALIVALES

Los tumores de las glándulas salivales comprenden aproximadamente el 3% de todas las neoplasias de Cabeza y Cuello (Eveson y Cawson, 1985). Los tumores de las glándulas salivales se desarrollan con mayor frecuencia en la glándula parótida (80%), en la glándula submandibular (5 - 10%) y en la glándula sublingual (1%). En las glándulas salivales menores se desarrollan con una menor incidencia (10-15%). El paladar es el sitio más frecuente de desarrollo de neoplasias de las glándulas salivales menores, los labios son el segundo sitio más común (Neville et. al., 1988), lengua y mucosa bucal en menor proporción (Eneroth, 1971). Los tumores de las glándulas salivales constituyen un grupo de lesiones de gran variación histomorfológica, que dificulta su clasificación. El Adenoma pleomorfo es la neoplasia más común de las glándulas salivales (Isacsson y Shear, 1983).

Los **tumores benignos** constituyen en la glándula parótida el 75-80%, en la glándula submandibular el 50%, en las glándulas salivales menores el 35% y en la glándula sublingual el 20%. 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).

Las **neoplasias malignas** se presentan como una masa (60-85% de los casos), pueden estar asociadas con parálisis facial (15%), se presentan con dolor, por compresión o invasión de terminaciones nerviosas (10%). Se pueden dividir en: **bajo grado 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. Finalmente 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).

1.- Tumorigénesis de las glándulas salivales

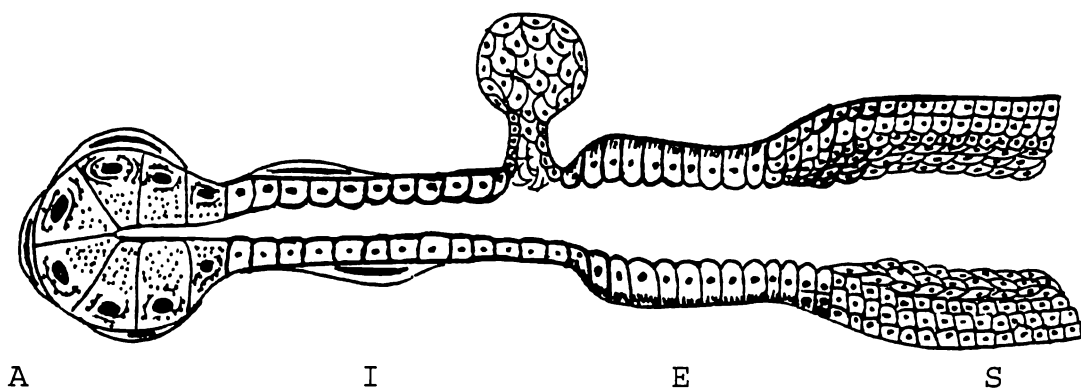
Se han propuesto clasificaciones por la histogénesis de los tumores, basadas en dos tipos de células como posibles progenitoras. Eversole (1971) sugiere que la célula del conducto intercalar da origen a los siguientes tumores: adenoma canalicular, adenoma celular, oncocitoma, cistadenoma papilar linfomatoso, adenoma papilar, carcinoma adenoideo quístico y algunos adenocarcinomas como el adenocarcinoma de células acinares. El otro tipo de célula es especulativamente la célula de reserva del conducto excretor como posible precursora del desarrollo de papilomas intraductales, adenoma pleomorfo, carcinoma epidermoide originado en la glándula salival y carcinoma mucoepidermoide (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989) (Fig. 9).

Eversole (1971) sugirió que la célula del conducto excretor era capaz de generar elementos escamosos ó epidermoides, ó que posee la habilidad de producir células semejantes a las células intercalares u otros tipos celulares. Esto consistente con la teoría del **PLURIPOTENCIAL UNICELULAR**. La otra teoría es de la **SEMIPLURIPOTENCIAL BICELULAR**, la cual involucra a las células de reserva del conducto excretor y del conducto intercalar como posibles células progenitoras.

La mayoría de las glándulas salivales se originan del ectodermo. Las glándulas parótidas, labiales y mucosas de las cavidades nasales y senos paranasales son de origen ectodérmico. Las glándulas linguales incluyendo a las de Von Ebner se detribran del endodermo. El origen de las glándulas submandibular y sublingual aún se desconoce pero probablemente sea ectodérmico (Batsakis, 1980). Esto permite el desarrollo de teorías basadas en la embriogénesis de las glándulas salivales y en la actividad del epitelio ductal durante los procesos reactivos.

Durante la embriogénesis de las glándulas salivales mayores, el desarrollo y diferenciación se origina con la formación de células de diferentes fenotipos (ductales y acinares), teniendo un precursor genotípico común. La característica morfológica es en parte el resultado de una interacción ectomesenquimatosas. Las

Tumores sebáceos
GS



Carcinoma de células acinares	Adenoma pleomorfo	Tumor de Warthin	Carcinoma mucoepidermoide
	Carcinoma adenoideo quístico	Oncocitoma	Adenocarcinoma ductal
	Adenoma monomorfo		Carcinoma epidermoide
	Carcinoma mioepitelial-epitelial.		

Fig. 9 Similaridad morfológica de algunos tumores de la glándula salival y las diferentes estructuras de la glándula. Acinos (A), conducto intercalar (I), conducto estriado (E), conducto secretor (S), glándula sebacea (GS) (tomado de Martínez-Madrigal F. y Micheau C. Histology of the major salivary glands. Am J Surg Pathol 13(10); 879-899, 1989).

estructuras epiteliales son delimitadas por la lámina basal que es producida por el epitelio y contiene ácido hialurónico y proteoglucanos (Batsakis, 1980). El origen de la capa celular germinal específica de los tejidos salivales puede estar relacionada con la histogénesis de los tumores de las glándulas salivales.

Algunas clasificaciones de las glándulas salivales se basan únicamente en las características histológicas de las neoplasias por: (1) la heterogenicidad de los tumores con respecto a una diferenciación mesenquimatosa; (2) la alta especialización de las células de los acinos y de los conductos estriados para diferenciarse y formar neoplasias. Un mecanismo que pudiera explicar la neoplasia, es representado por una alteración en la célula, en el momento de la renovación celular o tisular. El genoma de la célula normal tiene la información necesaria, para la expresión de un fenotipo normal o maligno. La neoplasia podría desarrollarse durante la síntesis de Acido Nucleico (DNA) en las células "stem" o de reserva, siendo un blanco oncogénico adecuado para la formación de una neoplasia (Batsakis, 1980).

Batsakis (1980) sugiere que las células de reserva del conducto intercaler son responsables de la regeneración del complejo túbulo-acinar distal y la célula de reserva del conducto excretor regenera los conductos excretores y los conductos interproximales e intralobulares.

El conducto intercaler es el segmento más activo de la glándula salival en la renovación y recambio celular y posiblemente en la organización morfológica de muchos tumores de las glándulas salivales (fig. 6) (Martínez-Madrigal y Micheau, 1989). Estudios experimentales realizados por Sato et. al., (1987) concluyen que la célula intercaler tiene la capacidad de diferenciarse en células acinares y en células mioepiteliales.

2.- Clasificación de los tumores de las glándulas salivales

Existen diferentes clasificaciones basadas en el tipo de glándula, características histológicas, características clínicas, edad, sexo y en la posible histogénesis del tipo de neoplasia. En 1971 Eversole propuso una clasificación y posteriormente la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Thackray y Sobin, 1972) sugirió otra; a partir de ésta se han desarrollado otras clasificaciones. Work y Batsakis (1977) presentaron una clasificación de glándulas salivales neoplásicas y no neoplásicas y

posteriormente Batsakis (1980) desarrolló otra. En 1987 se estableció un nuevo grupo internacional de expertos al respecto, quienes 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, et. al., 1990).

TIPOS HISTOLOGICOS DE LOS TUMORES DE LAS GLANDULAS SALIVALES

1. Adenomas

- 1.1.- Adenoma pleomorfo
- 1.2.- Mioepitelioma
- 1.3.- Adenoma de células basales
- 1.4.- Tumor de Warthin (adenolinfoma)
- 1.5.- Oncocitoma
- 1.6.- Adenoma canalicular
- 1.7.- Adenoma sebáceo
 - a) Linfadenoma sebáceo
- 1.8.- Papilomas ductales
 - a) Papiloma ductal simple
 - b) Papiloma ductal invertido
 - c) Sialoadenoma papilífero
- 1.9.- Cistadenoma
 - a) Papilar
 - b) Mucinoso

2. Carcinomas

- 2.1.- Carcinoma de células acinares
- 2.2.- Carcinoma mucoepidermoide
 - a) Bajo grado/bien diferenciado
 - b) Alto grado/pobremente diferenciado
- 2.3.- Carcinoma adenoideo quístico
 - a) Glandular/tubular
 - b) Sólido
- 2.5.- Carcinoma mioepitelial-epitelial
- 2.6.- Carcinoma de conducto salival

- 2.7.- Adenocarcinoma de células basales
- 2.8.- Carcinoma sebáceo
- 2.9.- Carcinoma oncocítico
- 2.10.- Cistadenocarcinoma papilar
- 2.11.- Adenocarcinoma mucinoso
- 2.12.- Adenocarcinoma, NOS
- 2.13.- Carcinoma de células escamosas
- 2.14.- Carcinoma en adenoma pleomorfo
 - a) Carcinoma no-invasivo
 - b) Carcinoma invasivo
 - c) Carcinosarcoma
 - d) Adenoma pleomorfo metastatizante
- 2.15.- Carcinoma mioepitelial (mioepitelioma maligno)
- 2.16.- Carcinoma indiferenciado
 - a) Carcinoma de células pequeñas
 - b) Carcinoma indiferenciado con estroma linfoide
- 2.17.- Otros carcinomas

3. Tumores no-epiteliales

- 3.1.- Angiomas
- 3.2.- Lipomas
- 3.3.- Tumores neurales
- 3.4.- Otros tumores mesenquimatosos benignos
- 3.5.- Sarcomas

4. Linfomas malignos

- 4.1.- Linfoma extranodular del parénquima de la glándula salival
- 4.2.- Linfoma de los nódulos linfáticos de la glándula salival

5. Tumores secundarios

6. Tumores no clasificados

7. Lesiones pseudotumorales

- 7.1.- Sialoadenosis
- 7.2.- Oncocitosis
- 7.3.- Sialometaplasia necrotizante (infartación de la glándula salival)
- 7.4.- Lesión linfoepitelial benigna

- 7.5.- Quistes de las glándulas salivales
 - a) Mucocelos de las glándulas salivales menores
 - b) Quístes de los conductos salivales
 - c) Quístes linfoepiteliales
 - d) Enfermedad disgenética (poliquística)
- 7.6. Sialoadenitis esclerosante crónica de la glándula submandibular (Tumor de Küttner)
- 7.7. Hiperplasia linfoide quística en SIDA

3.- Características histopatológicas de los tumores de las glándulas salivales

En este contexto serán tratadas las características histopatológicas de los tumores de las glándulas salivales utilizados en este proyecto.

a) Tumores benignos

1) Adenoma pleomorfo

El Adenoma pleomorfo es la neoplasia epitelial benigna más común de las glándulas salivales humanas (Eneroth, 1971; Eveson y Cawson, 1985; Pulitzer y Reitmeyer, 1987; Bullerdiek et. al., 1989).

Los términos "Adenoma pleomorfo" y "Tumor mixto" son descriptivamente adecuados para las lesiones compuestas de elementos epiteliales y mesenquimatosos (Pulitzer y Reitmeyer, 1987), lo cuál hace a ésta una neoplasia controversial.

Histogénesis del adenoma pleomorfo

El tipo de célula precursora de ésta neoplasia y su localización aun no han sido establecidos. Regezi (1977) y Batsakis (1980) proponen a la célula de reserva del conducto intercalar como célula progenitora de ésta neoplasia. Dardick et. al. (1982) y Kahm et. al. (1985) consideran a la célula mioepitelial como la célula precursora y sugieren que la célula "**indeterminada**" puede estar presente en estado pobremente diferenciado. En las áreas mixoides de la neoplasia, las células presentan variaciones en sus características epiteliales y mesenquimatosas. Esto sugiere la posibilidad que hay una célula "**stem**" que tiene la capacidad para diferenciarse en célula acinar, célula de conducto y célula mioepitelial (Sato et al., 1987). La otra posibilidad es que éstas regiones del tumor son originadas por la proliferación de distintos fenotipos celulares previamente diferenciadas.

Características histopatológicas

El adenoma pleomorfo es una neoplasia con gran variedad de aspectos histológicos. Esta formado principalmente por dos elementos celulares: (1) estructuras túbulo-ductales, posiblemente de origen ductal y (2) células mioepiteliales neoplásicas (Dardick et al. 1980, Mori et al. 1990). Se caracteriza por presentar células epiteliales entre una matriz mucoide o mixocondroide (Lucas 1984). Las células epiteliales pueden adquirir diferentes patrones en su agrupación dando la impresión de aspectos ductiformes, tubulo-ductales, áreas quísticas, áreas sólidas con aspecto glandular. También se encuentran células mioepiteliales entre el tejido hialino o mixomatoso (Yamada et al. 1989, Mori et al. 1990).

Seifert et al. (1976), han dividido esta neoplasia en cuatro tipos, con base en la diferenciación celular y propiedades del estroma.

TIPO I. Es el clásico tumor en el cuál el estroma constituye el 30-50% de la neoplasia. La forma sólida del epitelio presenta estructuras tubulares, trabeculares o quísticas con diferenciación variable de las células epiteliales (Seifert et al. 1986). Estas estructuras ductiformes, túbulo-ductales pueden mostrar espacios lumbinales, rodeados por capas de células epiteliales columnares o cúbicas, de citoplasma eosinófilo finamente granular y con núcleo grande que son positivas por queratina y en algunas áreas se pueden encontrar depósitos de queratina (Saku et al. 1984, Mori et al. 1985). La mayor parte de los espacios lumbinales de estas estructuras ductiformes contienen un material eosinófilo P.A.S. positivo (Lucas 1984).

TIPO II. Es un adenoma pleomorfo rico en estroma, este tipo incluye un 55% de todos los adenomas pleomorfos. El estroma es predominantemente mucoide en un 80% de los tumores. Se pueden encontrar áreas de estroma condroide ó muccondroide ó con un patrón fascicular, con bandas de células con arquitectura hialino-fibrosa. En algunas ocasiones, puede presentarse un patrón óseo. El estroma presenta cambios degenerativos (Seifert et al. 1986).

TIPO III. Es un adenoma pleomorfo rico en células en forma de huso con poco estroma, el arreglo del epitelio tienen semejanza con el tipo II

TIPO IV. Es un adenoma pleomorfo altamente celular con escaso estroma, el componente epitelial en algunas zonas está uniformemente diferenciado, dando la apariencia de un adenoma monomorfo, la diferencia está dada por el componente mucoide presente en el estroma (Seifert et al. 1986).

En la última reunión de la OMS, se decidió no subclasificar a los adenomas pleomorfos. Esta decisión fué tomada, debido a que en un mismo adenoma pleomorfo pueden encontrarse variaciones extremas que impiden sean subclasificados correctamente (Seifert G. et al. 1990).

Estudios realizados con microscopía electrónica por Line et. al. (1989), revelaron la presencia de tres tipos de células en la región del epitelio, células parecidas a células mioepiteliales, células del tipo epidermoide y células parecidas a las de los conductos. También observaron dos tipos de cartílago, uno de tipo hialino y el otro fibroso. Encontraron zonas intermedias entre el aspecto mixoide y el cartílago hialino, con típicos condrocitos en forma aislada, rodeados por pequeñas porciones de matriz cartilaginosa dentro del tejido mixoide, sugiriendo una transición de tejido epitelial a tejido cartilaginoso.

Saku et. al., (1990), reportan en un estudio reciente que los componentes de la membrana basal contribuyen a la variedad histológica del estroma, presentando las características de estroma hialino, fibroso, mixoide y condroide que caracterizan a ésta neoplasia.

2) Oncocitoma

El adenoma oxifílico es una neoplasia epitelial benigna de las glándulas salivales, que predomina en la glándula parótida. Esta lesión está relacionada con la edad, debido a que principalmente se presenta en pacientes entre los 50 y 70 años de edad (Lucas 1984; Regezi y Sciuba 1989).

Histogénesis

Esta neoplasia es originada por el oncocito (célula propia del envejecimiento), el cual forma parte del parénquima de las glándulas salivales (conductos intralobulares) y de otros órganos como páncreas, tiroides, paratiroides, pituitaria, testículos, trompas de falopio, estómago e hígado (Lucas R.A. 1984).

Características histológicas

Este tumor está compuesto de células denominadas oncocitos las cuales son grandes, redondas o poligonales, con un citoplasma eosinófilo granular dado por la alta actividad mitocondrial que tienen, con núcleo central, picnótico, hipercromático, conteniendo uno o dos nucleólos. Estas células se acomodan en columnas o pequeños grupos dando la impresión de ser acinos, pero sin lumen. Estas agrupaciones son divididas por finas bandas de tejido conectivo dando un aspecto organoide. Estos adenomas presentan un patrón celular muy uniforme (Levine et al. 1981, Mintz et al. 1982, Gardner y Daley 1983, Lucas 1984, Regezi y Sciuba 1989).

b) Tumores malignos

1) Carcinoma mucoepidermoide

Esta neoplasia se presenta a cualquier edad. Es una neoplasia epitelial maligna, poco común en las glándulas salivales. Está compuesta de células mucosecretoras, células de tipo epidermoide y células intermedias que varían en proporción. El carcinoma mucoepidermoide de las glándulas salivales mayores comprende aproximadamente el 11%, y en las glándulas salivales menores el 8% (Siar et al. 1987). El paladar es el sitio donde éste carcinoma es más frecuente en las glándulas salivales menores (Lucas 1984).

Histogénesis

Se ha sugerido que probablemente ésta neoplasia se origina de las células de los conductos excretores (Eversole 1971).

Características histológicas

Microscópicamente esta neoplasia está formada por células mucosecretoras, células de tipo epidermoide y una variedad de células intermedias (Dardick et al. 1984, Lucas 1984, Siar et al. 1987).

Esta neoplasia puede presentar diferentes grados de malignidad, dependiendo del patrón histológico que la caracteriza.

En el de bajo grado de malignidad o bien diferenciado predominan las células mucosecretoras y epidermoides con espacios quísticos y microquísticos (Lucas 1984). Regezi et al.

(1991), reportan la proliferación intraluminal e intramural en las áreas quísticas, así como áreas focales de crecimiento papilar. Los espacios quísticos están revestidos por una ó varias capas de células escamosas no queratinizadas con ó sin células de Goblet ó únicamente rodeados por células de Goblet (Loy et al. 1989). Las células mucosecretoras contienen mucina P.A.S. positiva. La acumulación de moco provoca distensión (Lucas 1984). En algunos casos puede observarse substancia homogénea con calcificaciones en la zona intraluminal (Siar et al. 1987). La actividad mitótica y la atipia en los tumores de bajo grado es menor (Loy et al. 1989). En algunas ocasiones, las células de tipo epitelial pueden mostrar queratinización (Lucas 1984).

El carcinoma mucoepidermoide de grado intermedio contiene pocas células mucosecretoras y muestra un patrón de crecimiento más sólido y lobular (Regezi et al. 1991). Se puede encontrar metaplasia escamosa en las islas de tejido epitelial (Dardick et al. 1984). Las células intermedias son pequeñas y se encuentran alrededor de los espacios ductiformes y en las áreas quísticas (Lucas 1984).

En los tumores de alto grado de malignidad o pobremente diferenciados se observan pocas células mucosas con pleomorfismo celular e hiperchromatismo nuclear (Regezi et al. 1991). También se observa mayor cantidad de células intermedias y epidermoides (Lucas 1984).

2) Carcinoma adenoideo quístico

Es una neoplasia epitelial maligna, sumamente agresiva (Regezi J.A. y Sciuba 1989), que infiltra nervios, hueso y otras estructuras adyacentes (Caselitz et al. 1984). Anteriormente era denominado cilindroma (Abaza et al. 1966). Representa un 7-18% de las neoplasias malignas de la glándula parótida y en un 33-58% de las glándulas salivales menores (Barnett et al. 1990).

Histogénesis

Se cree que posiblemente la célula de reserva indiferenciada del conducto intercaler sea la célula que da origen a este tumor, provocando la formación de diferentes subtipos (Lucas 1984, Caselitz et al. 1984, Caselitz et al. 1986).

Características histológicas

El carcinoma adenoideo quístico presenta varios subtipos como el tipo cribiforme (es el aspecto más común), tubular, trabecular o basaloide (Caselitz et al. 1984, Caselitz et al. 1987) y un patrón sólido (Regezi y Sciuba 1989). Las islas celulares son de aspecto redondo, ovoide, irregular y se encuentran en un escaso estroma de tejido conectivo (Lucas 1984).

Tipo cribiforme. Presenta características pseudoquísticas, rodeadas por células fusiformes, oscuras, organizadas en grupos y rodeadas por una delgada cápsula de tejido conectivo.

Los pseudoquistes pueden ocupar el 80% del tumor. Las células que rodean los pseudoquistes tienen aspecto de células mioepiteliales, con hipercromatismo nuclear y cromatina compacta (Caselitz et al. 1987) y escaso citoplasma (Abaza et al. 1966,

Forman 1970). Los espacios pseudoquísticos pueden ser el resultado de la producción de material mucoide por las células neoplásicas en proximidad con el estroma (Lucas R.A. 1984).

Tipo tubular. Las estructuras tubulares están delimitadas por células cuboidales con apariencia de células de conducto, de citoplasma eosinofílico pálido, bien definido por una membrana basal, de núcleo basal con cromatina dispersa y uno o dos nucléolos. Estas células rodean el lumen de las estructuras tubulares en una o dos capas. En la periferia se encuentran otras células con forma poligonal y de huso, con núcleos compactos (Caselitz et al. 1987).

Tipo trabecular. Está caracterizado por bandas hialinas de tejido conectivo entre las cuales algunas veces se observan células semejantes a células mioepiteliales ó células de conductos. Puede observarse una transición entre el patrón tubular y el cribiforme. La población celular aumenta cuando es menor la cantidad de tejido hialino (Caselitz et al. 1987).

Tipo basaloide. Las células presentan un aspecto indiferenciado. Los núcleos son largos con cromatina burda y con un gran número de mitosis (Caselitz et al. 1987).

Tipo sólido. Este tipo es el menos común. La compresión de estructuras ductiformes puede aparentar un patrón sólido. Una variante poco común de este tipo puede darse con un patrón de células fusiformes (Lucas 1984).

3) Carcinoma epidermoide

Esta neoplasia maligna es bien diferenciada en la mayoría de los casos y debe ser distinguida del carcinoma mucoepidermoide que tiene predominio de células epidermoides. El carcinoma epidermoide es más agresivo que el carcinoma mucoepidermoide. En casos en los cuales se presenta como un carcinoma indiferenciado, no presenta formaciones tubulares o apariencia escamosa, las células son fusiformes o esféricas, con pleomorfismo, hipercromatismo nuclear y aumento en el número de mitosis (Lucas 1984, Seifert et al. 1986).

D) MEMBRANA DEL GLOBULO DE GRASA DE LA LECHE PRODUCIDA POR LA GLANDULA MAMARIA [MILK FAT GLOBULE MEMBRANE (MFGm)]

1.- Origen de la membrana

La membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGm) ha sido estudiada principalmente en los glóbulos de grasa de la leche de animales de laboratorio. La unidad funcional de la glándula mamaria en lactación es el alveolo, el cual está constituido por células de núcleos grandes y esféricos. Estas células contienen un retículo endoplásmico rugoso, condensado en la porción basal de la célula; un aparato de Golgi localizado por arriba del núcleo, el cual tiene una cara apical terminada con numerosas vesículas, algunas de las cuales contienen productos de secreción (Mather y Keenan 1983).

La célula en lactación tiene **tres clases de membrana plasmática** : (1) en la **región apical**, que está involucrada con la secreción; (2) en la **región lateral**, que pone en contacto y une a las células epiteliales secretorias entre sí; (3) en la **región basal**, la cual está en asociación con la membrana basal y con las células mioepiteliales. Probablemente esta parte se encuentra relacionada con la identificación de hormonas y con procesos de absorción, al igual que con la secreción de la leche y el transporte de inmunoglobulinas (Fig. 10) (Wooding 1971, Patton y Keenan 1975, Mather y Keenan 1983, Welsch et al. 1990).

Las células se acomodan alrededor del lumen acinar dando un aspecto semejante a una esfera. Cada lumen recibe la leche secretada por las células, los lúmenes están conectados entre sí por medio de un sistema de conductos que drenan hacia la superficie externa de la piel. Cada alveolo tiene un sistema de capilares arterio-venosos, los cuales complementan la materia prima de la leche.

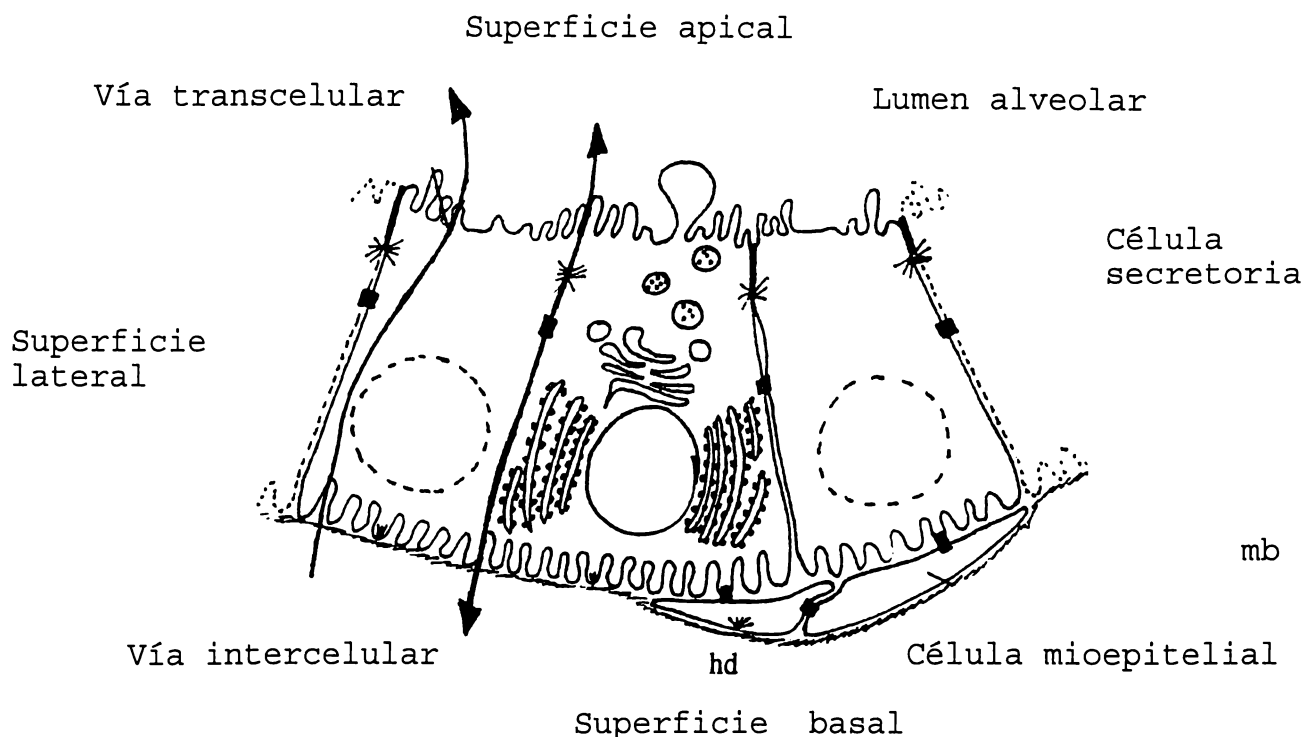


Fig. 10 Superficie de las células alveolares mamarias. La membrana basal (mb) está asociada con la célula mioepitelial y epitelial por medio de hemidesmosomas (hd), las membranas laterales se unen por medio de desmosomas (d) y uniones gap (ug) permitiendo la formación de canales de comunicación entre las células mioepiteliales y epiteliales. También presenta uniones intermedias (za, zonula adherentes), uniones estrechas (zo, zonula ocludens) (adaptado de Mather I.H. y Keenan T.W. Function of endomembranes and the cell surface in the secretion of organic milk constituents. Biochemistry of Lactation. Chapter 8. Edited by T.B. Mepham, 1983).

La síntesis de la MFGm se realiza en la célula mamaria en lactación (Fig. 11). Las gotas lipídicas son formadas en la región basal de la célula y son acarreadas a la región apical, donde son envueltas con la membrana plasmática y son expulsadas por la célula al interior del lumen (Patton y Keenan 1975, Mather y Keenan 1983).

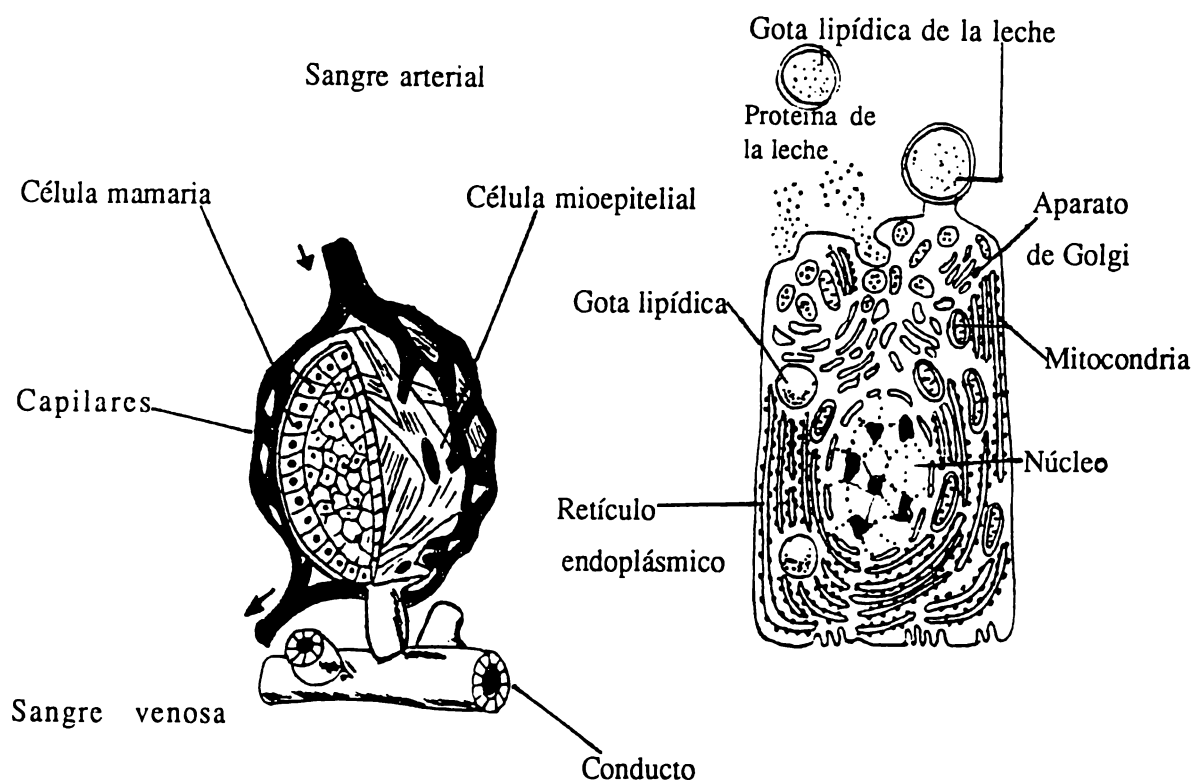


Fig. 11 Apariencia de la microestructura principal de la glándula mamaria. **Izq.** Alveolo sencillo mostrando el arreglo de las células mamarias, en el corte se observa el área luminal donde es secretada la leche. **Der.** Célula mamaria ilustrando el mecanismo de la secreción de grasa, proteínas y el principal sistema de membranas (adaptado de Patton S. and Keenan T.W. The milk fat globule membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. 415: 273-309; 1975)

2.- Composición de la membrana

Estudios realizados en animales de laboratorio han permitido observar que las fracciones de membrana plasmática contienen vesículas de superficie lisa y láminas planas de membrana, con complejos de unión y desmosomas en las membranas laterales de la célula. Las membranas contienen proteínas y fosfolípidos unidos

por carbohidratos. Está adicionada con esteroides, ésteres-esteroides y otros lípidos como gangliósidos y cerebrósidos presentes en cantidades variables. También contiene esfingomielina (Patton y Keenan 1975).

Las proteínas se encuentran distribuidas entre los compartimientos de la membrana celular. La concentración de proteínas varía, disminuyendo desde el retículo endoplásmico rugoso a la superficie de la célula. Las proteínas y los lípidos están unidos por residuos de carbohidratos, localizados en la cara luminal de la membrana del retículo endoplásmico rugoso y también en la superficie externa de la membrana plasmática. Esto permite la localización intraluminal de algunas enzimas como la galactosiltransferasa y dolico-oligosacáridos, los cuales transfieren los carbohidratos a lípidos y proteínas localizadas en la cara interna de la membrana.

La exocitosis de las vesículas intracelulares origina la exposición de residuos de carbohidratos asociados a la membrana, predominantemente en la superficie externa de la membrana plasmática. También contiene: sulfuro, hierro, cobre, molibdeno, manganeso, magnesio, calcio, sodio, potasio y zinc. Los cuales se pueden identificar en las fracciones de la membrana de la grasa globular de la leche. También se han aislado algunas proteínas como la butirofelina, glucoproteínas hidrófobas, caseína, la cual contiene uniones glucoprotéicas-O, entre otras, y la enzima xantina oxidasa (Patton y Keenan 1975, Mather y Keenan 1983).

3.- Relación de MFGm con las glándulas salivales

Se han desarrollado varios anticuerpos para la membrana del glóbulo de grasa de la leche humana ["human milk fat globule membrane" (HMFGm)] que son dirigidos a diferentes determinantes de las cadenas laterales de los oligosacáridos de una glucoproteína de alto peso molecular que forma parte de HMFGm (Jones y Walker 1987).

La membrana acarrea su determinante antigénico de la porción basal hasta la región apical de la célula secretora (Patton y

Keenan 1975). El tamaño de las moléculas acarreadas es diferente en distintas partes de las células (Burchell et al. 1983). Esto ha permitido que los anticuerpos sean usados para detectar diferenciación antigénica con respecto al HMFGm de la glándula mamaria y de los tumores que la involucran (Taylor-Papadimitrou et al. 1981, Hilkens et al. 1984). Los determinantes pueden ser detectados en la membrana de los alveolos glandulares mamarios (Hageman et al. 1983) ó en diferentes niveles de la célula mamaria dependiendo de la etapa de diferenciación celular (Moss et al. 1988).

Estos anticuerpos contra el HMFGm tienen el potencial de ser utilizados como forma de diagnóstico en otros órganos, como en el tracto gastrointestinal (Heitz et al. 1987), respiratorio (Griffiths et al. 1987), ovario (Ward y Cruckshank 1987), en las glándulas sudoríparas y salivales (Hageman et al 1983, Yamada et al. 1989).

En las glándulas salivales se han utilizado para tratar de determinar líneas celulares dentro de la estructura del tejido glandular normal, para poder traspolarlo a neoplasias tanto benignas como malignas de las glándulas salivales (Sumitomo et. al. 1986, Mori et al. 1990), tratando de determinar una posible histogénesis más precisa y como una forma de diagnóstico más certero, en aquellas neoplasias difíciles de ser identificadas por métodos convencionales.

E. ANTICUERPOS MONOCLONALES

El sistema inmune protege a todos los vertebrados de infecciones por microorganismos ó 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 **ANTIGENO** (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 ó respuesta humoral, a cargo de los linfocitos B (son producidos en la médula ósea del adulto ó en el hígado fetal). Esta respuesta involucra la producción de **anticuerpos**, los cuales son proteínas denominadas **inmunoglobulinas (Ig)** que pueden encontrarse en el torrente sanguíneo ó 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 inmunoglobulinas (Ig) y a su vez se han subclasificado por las características de su estructura básica siendo las siguientes: IgG (1,2,3 y 4), IgM, IgA (1, 2 y 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. 1989).

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 ó 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 ó B que desciende de una misma célula progenitora.

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 ó en un linfocito receptor y son llamados **determinantes antigénicos** (ó 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.

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 anticuerpos son homogéneos ó 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.

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).

1.- Producción de anticuerpos monoclonales

La técnica para producir anticuerpos monoclonales fué desarrollada por Köhler y Milstein (1975), los cuales ganaron el premio Nobel por su trabajo. Estos investigadores obtuvieron híbridos entre una colonia celular de plasmocitoma 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, Raybould y Takahashi 1988).

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 (Huser 1986, 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; Milstein y Cuello, 1983). La técnica para producir anticuerpos monoclonales se usa basándose en el resultado de que cuando se fusiona una célula de mieloma y una célula esplénica de ratón inmunizado se produce un hibridoma (Köhler y Milstein 1975) (Fig. 12).

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: (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 mililitro de medio de cultivo, e inyectados en ratones producen de 1 a 10 mg de anticuerpos por mililitro 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. Los hibridomas B secretan grandes cantidades 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 (Köhler 1986).

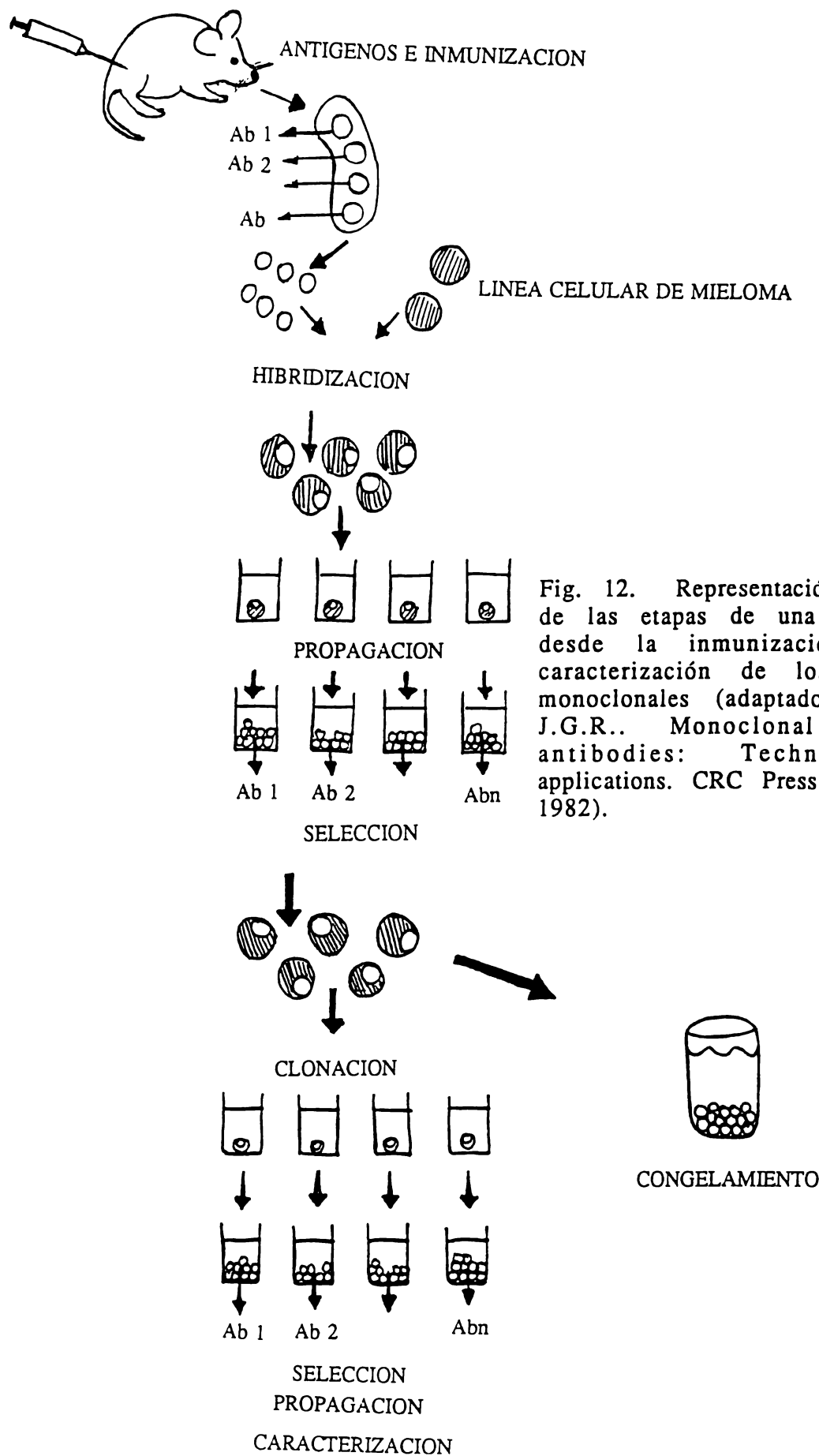


Fig. 12. Representación esquemática de las etapas de una hibridación, desde la inmunización hasta la caracterización de los anticuerpos monoclonales (adaptado de Hurrell, J.G.R.. Monoclonal hybridoma antibodies: Techniques and applications. CRC Press Inc., Florida. 1982).

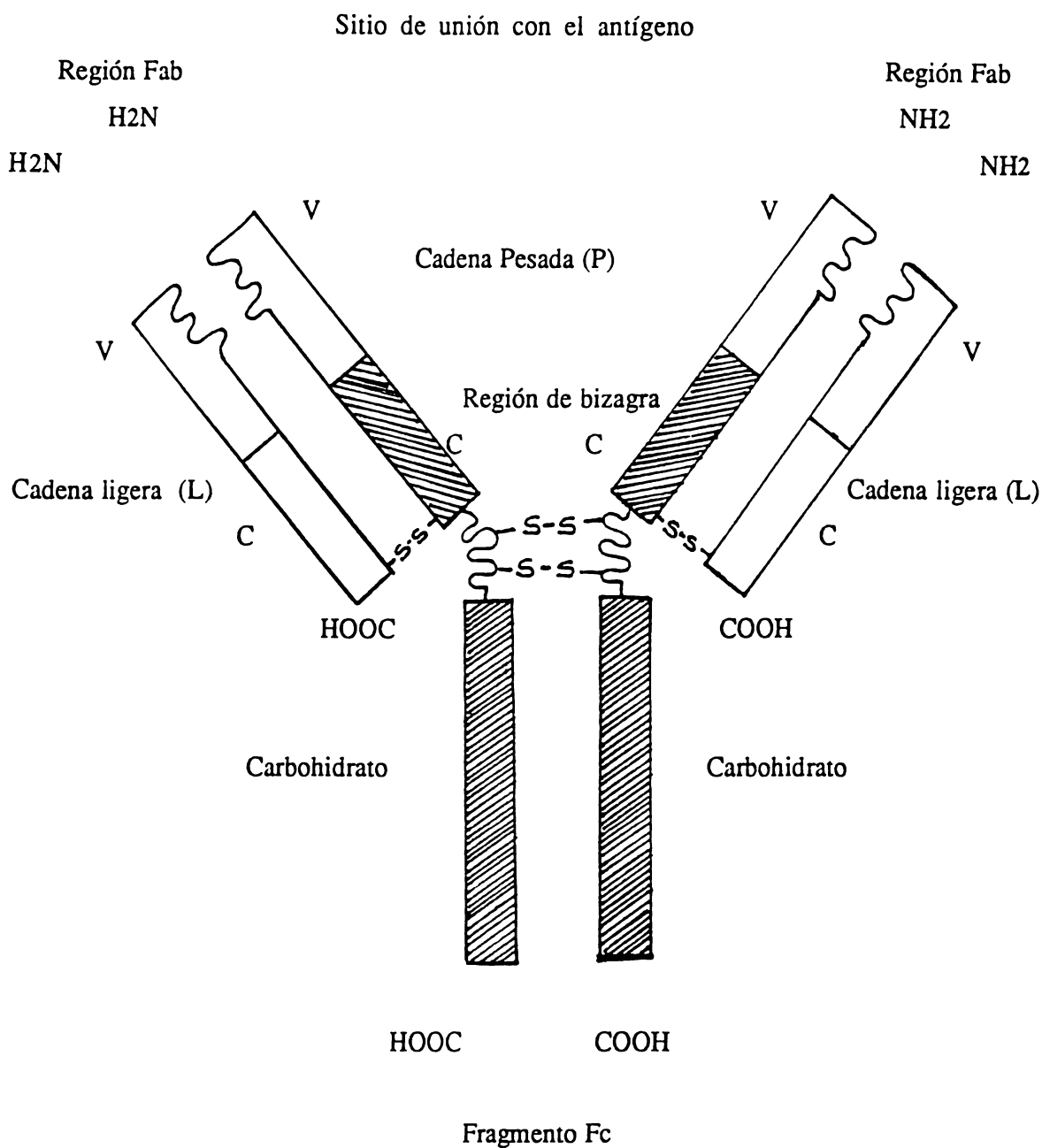


Fig. 13. Típica molécula de un anticuerpo, compuesto por dos cadenas pesadas (P) y dos cadenas Ligeras, con sus regiones variables (V) y regiones constantes (C) (Adaptado de Alberts et al., Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. 2nd Edition, 1989)

Técnica de hibridoma

La tecnología en hibridomas fué extendido primero a la genética de las células somáticas, lo cuál permitió mutaciones en los anticuerpos seleccionados, cambios en sus propiedades funcionales y en las regiones constantes de las cadenas pesadas de los anticuerpos son hechos con doble especificidad. La técnica de hibridoma puede inmortalizar células y la tecnología genética puede inmortalizar genes (Winter y Milstein 1991).

El anticuerpo con el que más se ha trabajado hasta el momento es IgG, el cuál es una molécula con forma de Y, en la cual las partes dominantes forman los extremos de los brazos para el antígeno. La estructura dominante de la molécula hace accesible la planeación de la proteína, teniendo como actividades funcionales en la porción dominante el acarreo del antígeno (fragmentos Fab, Fv) ó funciones efectoras (fragmento Fc). Los fragmentos pueden ser usados por separado ó intercambiados entre anticuerpos. Además, la extensión rígida B del esqueleto de la región variable (V) dominante, vence con uniones al antígeno, permitiendo el transplante de sitios necesarios de un anticuerpo a otro. El potencial de un anticuerpo en extinción está dado por la clase de constante (C) dominante (isotipo) (Winter y Milstein 1991) (Fig. 13).

Para desarrollar la técnica de hibridomas debe seleccionarse perfectamente la línea celular de mieloma, debido a que muchos mielomas humanos son difíciles de desarrollar en los medios de cultivo, teniendo un bajo crecimiento y poca secreción de inmunoglobulinas. En tanto que otras líneas celulares se adaptan perfectamente al medio, existiendo un gran desarrollo, pero existe el problema de la contaminación y esto puede ser con mycoplasma, por lo cual se debe tener cuidado (Sekora y Neville 1982).

Una vez obtenida la línea celular de mieloma y la célula esplénica de ratón previamente inmunizado (inmunizado intraperitonealmente con SRC trinitrofenilado, se remueve el bazo y se aíslan las células), se fusionan las células en presencia del glicol de polietileno [polyethilene glycol (PEG 1500)].

La célula esplénica muere en el medio de cultivo y la célula de mieloma es defectuosa para desarrollarse en el medio de cultivo, el cual contiene la enzima hipoxantin-fosforibosil-transferasa [hypoxantinephosphoribosyltransferase (HGPRT)] complementado con hipoxantina, aminopeptirina y timidina (HAT) (la aminopeptirina bloquea la vía principal en la síntesis de DNA, la forma de rescatarlo es con el uso de hipoxantina exógena, dependiendo de la presencia de la enzima HGPRT). Solamente los híbridos entre las células de mieloma y de bazo sobreviven en el medio con HAT, la célula de mieloma ayuda al crecimiento en el medio de cultivo y la célula esplénica contribuye al funcionamiento de la enzima HGPRT.

Conforme existe el desarrollo, las células se van seleccionando obteniéndose colonias o células individuales. Posteriormente existe propagación, nuevamente se realiza la separación de células, las cuales pueden ser congeladas, o pasar a la clonación, nuevamente se realiza la separación de células y finalmente la propagación y caracterización de anticuerpos.

Se han caracterizado IgG de diferentes subclases e IgM. Se han obtenido fusiones en combinaciones singénicas halogénicas y xenogénicas. Las ventajas de usar uniones singénicas y halogénicas es que dan la posibilidad del crecimiento de células híbridas como tumores en el ratón apropiado obteniéndose altos títulos en suero (EMBO, SKMB Course 1980; Fig. 12).

2.- 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 et al., 1978; Trucco et al., 1978), antígenos asociados a tumores (Kennett y Gilbert, 1979), para la especificidad de grupos sanguíneos (Barnstable et al., 1979) y para los antígenos de histocompatibilidad humana (Parham y Bodmer, 1978).

Los anticuerpos monoclonales son utilizados en gran diversidad de trabajos:

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.

Para purificación: De factores hormonales. Como enriquecimiento de interferón, purificación de membrana celular, como enriquecimiento del antígeno Ia de rata.

Para detectar y cuantificar: Combinaciones en bruto, como la gonadotropina coriónica humana en pruebas de embarazo.

Para mapear: Caracterización de epitopes, varios determinantes en la cadena u de ratón.

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.

Para selección: Seleccionando Idiotipos . En la supresión y realce de la respuesta inmune anti-NP (NP= 4-hidroxi-3 nitrofenilacetil).

Para localización: En órganos, como en el sistema nervioso de la sanguijuela. En cuerpos humanos, imágenes de tumores.

F. HIPOTESIS Y OBJETIVOS ESPECIFICOS

El desarrollo de marcadores celulares en combinación con métodos de inmunohistoquímica permitirá en el futuro definir con más seguridad los distintos tipos de células de las glándulas salivales en secciones de tejido normal y tumoral. En éste momento existe evidencia que los HMFG MoAbs también reconocen moléculas en las glándulas salivales humanas (Gendler et al., 1987; Hageman et al., 1983; Yamada et al., 1989; Durban, observaciones no publicadas). Estas observaciones son importantes porque, a pesar de que los tumores de las glándulas salivales son raros, no hay terapias adecuadas para esos que son de alto grado de malignidad y que tienen el potencial de metastatizarse.

Este estudio está diseñado para investigar la expresión de los antígenos del HMFG en glándulas salivales normales y anormales y para correlacionar la expresión de esta familia de mucinas con el comportamiento biológico de lesiones de estas glándulas.

La hipótesis a probarse en este proyecto es: **La expresión de antígenos del HMFG pueden servir como marcadores de las distintas líneas celulares de las glándulas salivales normales y, en analogía a los estudios con la glándula mamaria, los HMFG MoAbs son reactivos con un potencial importante en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los tumores de las glándulas salivales.**

Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de este proyecto son:

- 1) Utilizar los **MoAbs** contra los antígenos de la membrana **HMFG** para definir las líneas celulares de las glándulas salivales normales.
- 2) Determinar si hay variación entre distintas personas con respecto a la expresión de antígenos definidos por los **HMFG MoAbs**.
- 3) Examinar la reacción de distintos tumores de las glándulas salivales con los **HMFG MoAbs**.
- 4) Establecer si existe una correlación entre el tipo de tumor y la expresión de los antígenos del **HMFG**.

II. MATERIALES Y METODOS

Anticuerpos monoclonales (MoAbs). Un panel de ocho MoAbs se utilizaron en este estudio. Estos MoAbs fueron desarrollados independientemente por dos grupos de investigadores, el de Gordon Parry (UC, Berkeley) y el de Joyce Taylor-Papadimitrou (ICRF, London), que trabajan con la glándula mamaria y que han colaborado previamente con la Dra. Elisa M. Durban. La designación de estos MoAbs es: HMFG1, HMFG 2, LBL1- LBL6.

Muestras de tejido. Las glándulas salivales estudiadas, proceden de muestras obtenidas en Houston y en México. La Dra. Durban obtuvo un grupo de muestras de glándulas salivales normales en colaboración con la Dra. Rhonda Jacob de la Universidad de Texas M.D. Anderson Cáncer Center. También se obtuvieron muestras de tumores a través del Dr. Mario Luna quién es patólogo en el M.D. Anderson Cáncer Center. El resto de las muestras fueron obtenidas del laboratorio de Patología Bucal de la División de Investigación, Facultad de Odontología, U.N.A.M. y del laboratorio de Patología Bucal de la U.A.M. Xochimilco. Todas las muestras fueron fijadas en formalina y embebidas en parafina y se cortaron en secciones de 5u en The University of Texas Health Science Center, Houston, Dental Branch. Las secciones serán las necesarias para cada uno de los anticuerpos a utilizarse, se colocarán dos secciones por portaobjetos y se aplicará a cada sección un anticuerpo diferente. Todas aquellas secciones en las cuales el tejido se desprendió del portaobjetos fueron desechadas para evitar el falseamiento de los resultados.

El tamaño de las secciones dependió del tamaño de la glándula o neoplasia con la que se trabajo.

En total los especímenes obtenidos corresponden: glándula parótida 2 muestras, glándula submandibular 13 especímenes y de glándulas salivales menores 4 muestras que corresponden a labio.

Los tumores de glándulas salivales como adenoma pleomorfo fueron 17, oncocitoma una muestra, carcinoma mucoepidermoide 6 especímenes, carcinoma adenoideo quístico 4 especímenes y de carcinoma epidermoide poco diferenciado 1 muestra.

MATERIAL**EQUIPO**

Agitador magnético
Autoclave
Balanza granetaria
Tina para baño maría (Precisión Scientific modelo 181)
Tina de flotación
Histokinette
Micrótopo y cuchillas
Microcentrífuga (Allied Fisher Scientific modelo 235 C)
Mezcladora para microtubos (Allied Fisher Scientific, Fisher-brand, Vortex genie 2, 12-812).
Plancha
Microscopio (Carl Zeiss)
Fotomicroscopio (Nikon labophot, tipo 104)
Refrigerador
Congelador
Batería para tinción con Hematoxilina y Eosina
Batería para tinción con Inmunoperoxidasa
Canastillas para tinción
Micropipeta de 1000 ml (pipetman Gilson, hecha en Francia)
Micropipeta de 200 ml (pipetman Gilson, hecha en Francia)
Micropipeta de 20 ml (pipetman Gilson, hecha en Francia)
Pipeta de bomba GR 10 (glasfirn pi pum, hecha en Alemania)
Cronómetro (The West Bend Company modelo cat. no. 40 000)
Lápiz de diamante
Pinzas
Tijeras

CRISTALERIA

Porta y cubreobjetos con pantalla
Pipetas de 10 ml
Frascos con tapa de rosca de 5 ml
Frascos con tapa de rosca de 1000 ml
Frasco de Coplin
Vaso de precipitado de 2000 ml
Vaso de precipitado de 1000 ml
Vaso de precipitado de 500 ml
Vaso de precipitado de 100 ml
Vaso de precipitado de 25 ml
Matraz Erlenmeyer de 2000 ml
Matraz Erlenmeyer de 1000 ml
Matraz Erlenmeyer de 500 ml
Probeta de 1000 ml
Probeta de 500 ml
Probeta de 100 ml
Probeta de 50 ml
Cajas de Petri

OTROS ACCESORIOS

Botes de plástico de 400 ml
Botes de plástico de 200 ml
Tubos de plástico de 50 ml
Tubos de plástico de 15 ml
Tubos de polipropileno para microcentrífuga de 1.5 ml (de colores)
Colgadero redondo de flotación para tubos de 1.5 ml
Puntas para micropipetas de 0-200 ml (amarillas)
Puntas para micropipetas (azules)

REACTIVOS

Gelatina bacteriológica
Hematoxilina de Harris
Eosina
Cloruro de Sodio (NaCl)
Cloruro de Potasio (KCl)
Fosfato de Potasio (KH₂PO₄)
Fosfato de Sodio (Na₂HPO₄)
Etanol
Metanol
Xileno
Acido Clorhídrico concentrado (HCl)
Hidróxido de Amonio (NH₄OH)
Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)
Tris base (pH=8)
Tetraclorhidrato de diaminobenzidina
[diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)]
Suero de caballo concentrado
Agua desionizada
Agua destilada

ANTICUERPOS

Los anticuerpos se mantienen congelados (-20° C) en cantidades pequeñas (200 ml/tubo).

HMFG 1

HMFG 2

LP 1- LP 6

Vectastain ABC kit (Mouse IgG) PK 4002 (Vector Laboratories Inc. USA) (Se mantiene a 4° C)

PREPARACION DE SOLUCIONES

Metanol (para reprimir la actividad de la peroxidasa endógena)

Para preparar 50 ml. En 50 ml de metanol se mezclan 300 ml de H₂O₂ al 0.6%.

Solución salina amortiguada [phosphate buffer saline (PBS)]

Preparación de 2 litros de PBS

Reactivos

1) Pesar:

20 g.	NaCl
0.50 g.	KCl
2.89 g.	Na ₂ HPO ₄
0.50 g.	KH ₂ PO ₄

2) Disolver: Los reactivos se colocan en un matraz y se disuelven lentamente en 1800 ml de agua desionizada utilizando el agitador magnético.

3) Medir pH: Se mide el pH el cuál deber ser de 7.2 y se agrega agua hasta tener exactamente 2 litros (usar probeta).
Si el pH es menor de 7.2 se usa el ion NaOH (Hidróxido de Sodio)
Si el pH es mayor de 7.2 se agrega HCl (Acido Clorhídrico)

4) Vaciado: Se va vaciando en tubos de 400 ml, poniendo 200 ml en cada uno.

5) Esterilización: Se esteriliza a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Suero normal al 10% [Blocking Buffer (BB)]

Para preparar 1 litro de suero se utiliza:

900 ml de PBS

100 ml de Suero de caballo concentrado

Todo esto se mezcla perfectamente, se vacía en tubos de plástico de 15 ml, se puede congelar a -20°C , conservándose por largo tiempo y se va utilizando lo que se requiera.

Tetraclorhidrato de diaminobenzidina (DAB)

3'-3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), es un substrato de peroxidasa necesario para el uso de inmunoblott y procedimientos de tinciones inmunohistológicas. Este substrato produce un producto final insoluble de color café que puede ser observado visualmente.

Este substrato se prepara según las instrucciones del fabricante.

1 M (Molar) Tris base pH= 8.0

Sigma Chemical Co. P.O. Box 14508 St. Louis Mo 63178 USA
314-771-5750 (Este reactivo se prepara siguiendo las indicaciones del fabricante)

Trizma Base (Tris [hidroximetil] aminomethane)

$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$

Grado de reactivo: Pureza del 99.9%

Ciertos electrodos de pH no dan resultados exactos con el tris buffers

Se prepara a temperatura ambiente
Para preparar 1 M (Molar) se necesita:
121.1 g. de (Tris [hidroximetil] aminomethane)
1 litro de Agua desionizada
Para obtener un pH=8.0
Si el pH es menor de 8.0 se agrega hidróxido de sodio
Si el pH es mayor de 8.0 se agrega ácido clorhídrico

Preparación de anticuerpos secundarios (1:222)

2.25 ml de Anti-inmunoglobulina anti-ratón (bote azul del paquete de Vectastain PK 4002)

0.5 ml de Blocking Buffer (BB)

Ambas sustancias se mezclan en un frasco de vidrio con tapa de rosca de 5 ml y se ponen en hielo, formando los anticuerpos secundarios.

Nota: Estos segundos anticuerpos deben prepararse minutos antes de ser utilizados y mantenerse en un recipiente con hielo.

Preparación del reactivo ABC (1:100)

4.5 ml	de	A	(Avidina)
4.5 ml	de	B	(Enzima Biotinilada)
0.5 ml	de	C	[Blocking Buffer (BB)]

Todas las sustancias se vierten en un frasco de cristal con tapa de rosca de 5 ml. y se combinan con la ayuda de la mezcladora para microtubos, todas las preparaciones deben conservarse en refrigeración, en el momento de utilizarse, se colocarán en hielo para su mejor conservación.

Nota: El reactivo ABC debe ser preparado aproximadamente 30 minutos antes de su aplicación y mantenerse en un recipiente con hielo.

Preparación del substrato DAB

4.25 ml de Agua desionizada
0.25 ml de 1 M de Tris-base (pH=8.0)
5.0 ml de H₂O₂ (se agrega al final) (concentración final de 0.03%)
0.5 ml de DAB

La preparación de este substrato debe realizarse en la oscuridad al igual que su aplicación sobre las secciones.

Todos los ingredientes se mezclan perfectamente, solo se añade el peróxido de hidrógeno al final, para evitar la actividad de la peroxidasa.

Alcohol ácido

Para preparar 500 ml de alcohol ácido se necesita:

5 ml de HCl concentrado
350 ml de Alcohol absoluto
150 ml de Agua desionizada

Todos los ingredientes se mezclan en un frasco de cristal con tapa de rosca de 1000 ml.

Agua amoniacada

Se preparan 500 ml utilizando:

1 ml 17 NH₄OH
500 ml de Agua desionizada

Se combina todo perfectamente en un frasco de cristal con tapa de rosca de 1000 ml.

PROCEDIMIENTO

Técnica de inmunohistoquímica. El procedimiento utilizado es el "Biotin Avidin" inmunoperoxidasa (Biotina-Avidina). Una vez obtenidas las secciones, se limita el contorno del tejido con un lápiz de diamante, se procede a desparafinizar (xilol, tres cambios), se deshidratan (etanol 100% ,dos cambios; etanol 95%, dos cambios) y rehidratan con agua desionizada durante 30 seg. y se sumergen en Metanol (300 ml de 0.6% de H₂O₂ en 50 ml de metanol) durante 1 hora a temperatura ambiente (para reprimir la actividad de la peroxidasa endógena). Las secciones se lavan con solución salina fosfatada [solución buffer (PBS)].

Después de esto se colocan las secciones dentro de cajas de Petri, las cuales tienen en el fondo papel filtro humedecido con agua desionizada, lo cuál permite mantener un ambiente húmedo, evitando así la desecación del tejido, posteriormente se aplica suero normal por 1 hora para bloquear la actividad no específica ("blocking Buffer" suero de caballo al 10% en PBS , centrifugado por un minuto para remover los restos). Posteriormente las secciones se drenan y se colocan nuevamente dentro de las cajas de Petri y se aplica sobre el tejido los anticuerpos primarios (HMFG1, HMFG2, LBL1- LBL6) y se incuban durante la noche a 4' C.

Al día siguiente las secciones se lavan con PBS , se colocan dentro de las cajas de Petri (debe evitarse que el tejido se deshidrate) y se aplican los segundos anticuerpos que corresponden a suero de carnero contra IgG de ratón conjugados con Biotina (1:222) (Peroxidase mouse IgG, Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, INC), y se incuban durante una hora a temperatura ambiente. Después las secciones se lavan con PBS y se incuban con los reactivos intermediarios ABC (1:100) (los cuales son moléculas de peroxidasa biotinilada, enlazadas en una formación tridimensional a través de "Avidina") por una hora a 4' C. Nuevamente se lavan con PBS, se le añade el substrato de tetraclorhidrato de diaminobenzidina ["diaminobenzidine tetrahydrochloride" (DAB)] (compuesto con agua desionizada, 1M tris base con un pH=8, DAB y H₂O₂, la preparación y el proceso debe realizarse en cuarto oscuro), se incuban exactamente por 10 minutos a temperatura ambiente. El producto de ésta reacción enzimática es un precipitado de color café oscuro. Este precipitado localiza la posición de los complejos de antígeno (HMFG)-HMFG MoAbs.

Las secciones se lavan con agua desionizada y se contrastan con Hematoxilina de Harris (de acuerdo a Luna G. 1968) (Figs. 14 y 15).

PROCEDIMIENTOS EN LA TECNICA DE INMUNOPEROXIDASA

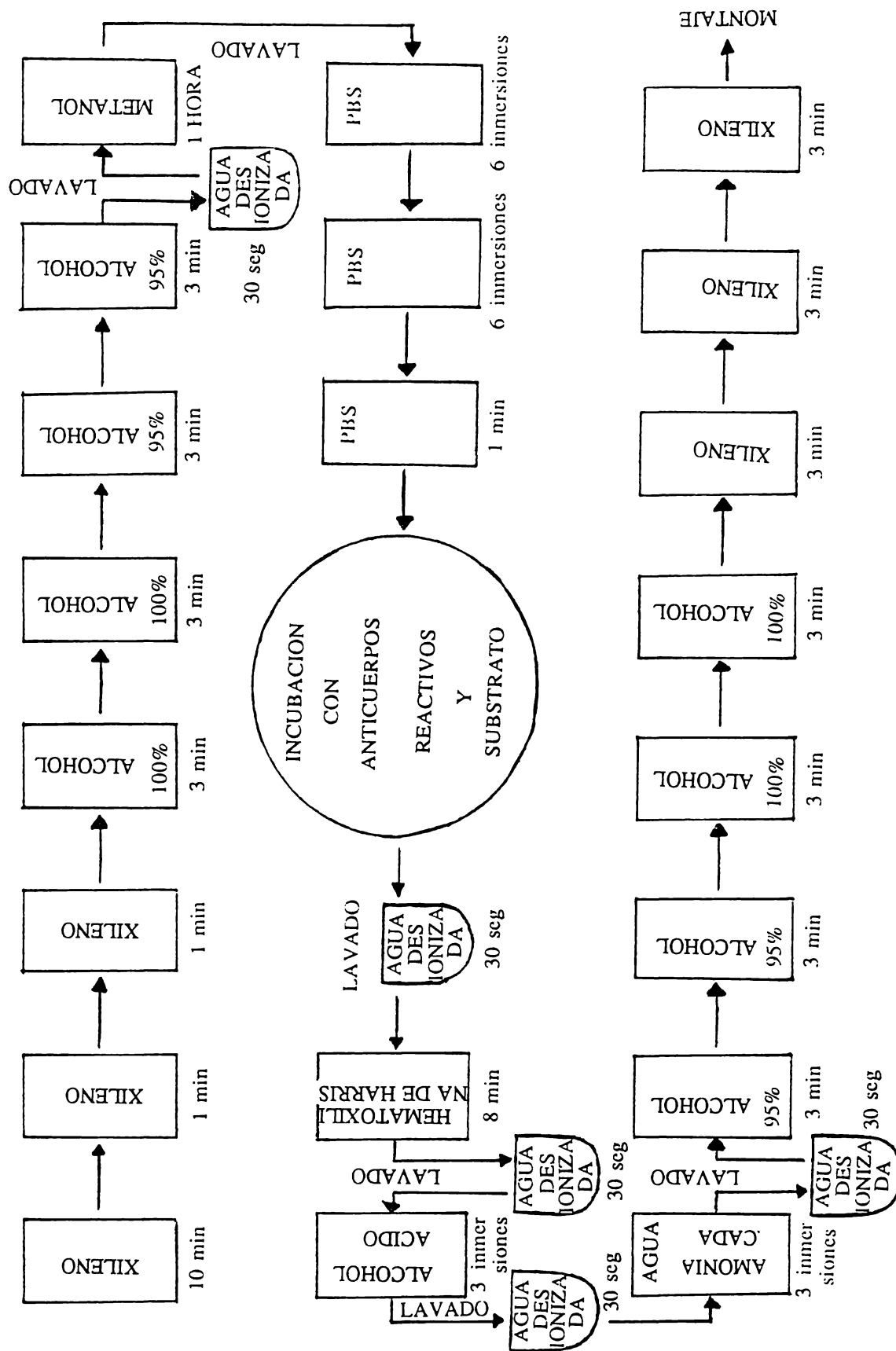


Fig. 14. Procedimientos en la técnica de Inmunoperoxidasa paso por paso.

INCUBACION CON LOS ANTICUERPOS, REACTIVOS Y SUBSTRATO.

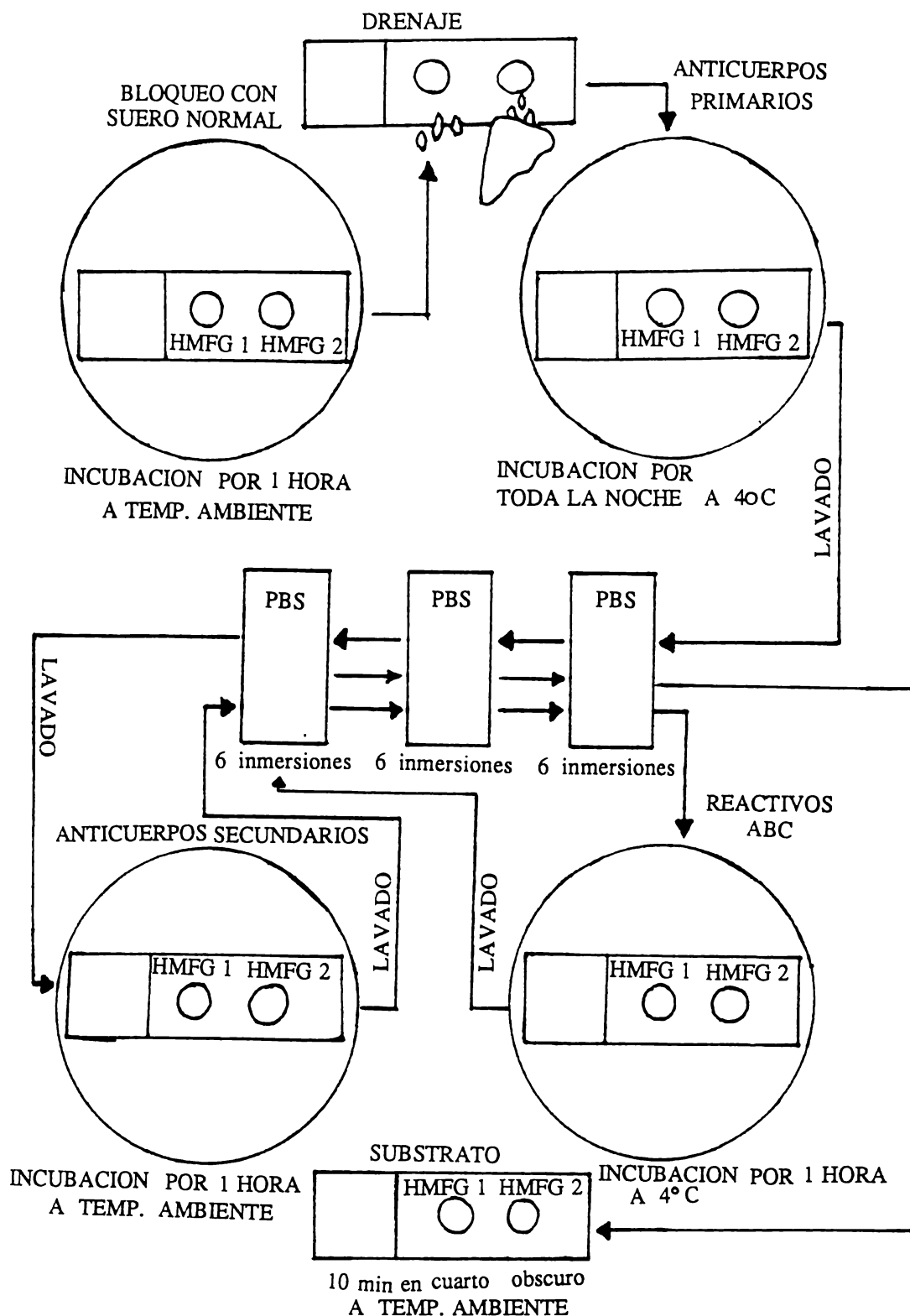


Fig. 15. Procedimientos para la incubación con los anticuerpos, reactivos y sustrato.

III. RESULTADOS

A. GLANDULAS SALIVALES NORMALES

- 1.- Glándulas submandibulares
- 2.- Glándulas parótidas
- 3.- Glándulas labiales
- 4.- Glándulas submandibulares con alteraciones pre-neoplásicas.

B. TUMORES DE GLANDULAS SALIVALES

- 1.- Tumores benignos
 - a) Adenomas pleomorfos
 - b) Adenoma oxifílico
- 2.- Tumores malignos
 - a) Carcinoma mucoepidermoide
 - b) Carcinoma adenoideo quístico
 - c) Carcinoma epidermoide poco diferenciado

A) GLANDULAS SALIVALES NORMALES

Glándulas salivales normales correspondientes a parótida, submandibular y labial, fueron examinadas por medio de un procedimiento estándar de inmunoperoxidasa, para observar su reacción con ocho anticuerpos monoclonales para el glóbulo de grasa de la leche humana [Human Milk Fat Globule (HMFG)]. Estos anticuerpos reconocen diferentes epítopes en el antígeno HMFG.

1. Glándula submandibular. Los anticuerpos monoclonales que reaccionaron más fuerte son HMFG1 y HMFG2 (Tabla 1). De nueve (9) glándulas normales, siete mostraron reactividad positiva y dos fueron completamente negativas. Los bordes luminales de casi todos los conductos excretor, estriado e intercalar; Fig. 1), en 5 glándulas reaccionaron muy fuerte (2-4+) y en las otras dos la reacción fue leve (1+). En general las secreciones intraductales y el citoplasma de las células de los conductos presentaron una reacción de leve a moderada (1-2+) en forma heterogénea.

Los anticuerpos de la serie LBL mostraron muy poca reacción con los conductos. LBL1 solamente reaccionó con los conductos de tres de las nueve glándulas submandibulares normales (Tabla 1). En general la reacción no fué de leve a moderada (1-2+), variando la cantidad de estructuras ductales positivas. Los anticuerpos LBL2 y LBL3 reaccionan exclusivamente con las células acinares produciendo una reacción más fuerte en los ácinos serosos (2-4+) sobre los mucosos (+ - 3+) (Fig. 1). Una excepción mostrada en el patrón de tinción fué la reacción del anticuerpo LBL2 con una de las glándulas submandibulares (1/9). En ésta los conductos reaccionaron de leve a moderadamente (1-2+) con este anticuerpo (Tabla 1).

Los anticuerpos monoclonales LBL4, LBL5 y LBL6 fueron negativos (Tabla 1).

Las células mioepiteliales no mostraron ninguna reacción en las glándulas examinadas.

2.- Glándula parótida. Solamente dos glándulas parótidas fueron estudiadas. Los anticuerpos monoclonales HMFG1 y HMFG2 reaccionaron específicamente en la mayoría de los conductos mostrando una reacción leve a moderada (1-2+) sobre la superficie luminal, en tanto que la secreción intraductal fué heterogéneamente moderada (2+) y la reacción en el citoplasma de las células ductales fué leve (1+). En general las células acinares resultaron negativas con estos anticuerpos, pero ocasionalmente se observaron algunas células mostrando con estos anticuerpos ligera (1+) reacción en la membrana citoplásmica de la superficie apical.

De la serie LBL, LBL1 mostró una leve reacción (1+) en los bordes luminales de los conductos y muy ligeramente (+) en el citoplasma de las células ductales. Los anticuerpos LBL2 y LBL3 mostraron una fuerte especificidad (3+) por las células acinares; LBL2 también tiñó (1-2+) el citoplasma de algunas células ductales (Tabla 2). Una excepción en el patrón de tinción fue mostrada por la reacción del anticuerpo LBL2 reaccionando de leve a moderadamente (1-2+) en los conductos (Tabla 2).

Los anticuerpos monoclonales LBL4, LBL5 y LBL6 dieron una reacción completamente negativa en las estructuras glandulares (Tabla 2).

Tabla 1. Reacción de la glándula submandibular con los anticuerpos monoclonales contra HMFG: HMFG1-HMFG2, LBL1-LBL6 (9 muestras).

Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales (número de muestras positivas)			
Anticuerpo monoclonal	Sistema de conductos	Acinos	
		Serosos	Mucosos
HMFG1	1-4+ (7/9)	1+ (1/9)	-
HMFG2	1-4+ (7/9)	-	-
LBL1	1+ (1/9) 2+ (2/9)	-	-
LBL2	1-2+ (1/9)	2-4+ (4/9)	±-2+ (6/9)
LBL3	-	1-3+ (6/9) 3-4+ (2/9)	±-2+ (5/9) 1-3+ (2/9)
LBL4	-	-	-
LBL5	-	-	-
LBL6	-	-	-

- = Negativo; + = muy leve; 1+ = leve; 2+ = moderado; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte.

Tabla 2. Respuesta de la glándula parótida con los anticuerpos monoclonales contra HMFG, HMFG1-HMFG2, LBL1-LBL6 (2 muestras).

Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales (número de muestras positivas)		
Anticuerpo monoclonal	Sistema de conductos*	Acinos serosos
HMFG1	1-2+ (2/2)	-
HMFG2	1-2+ (2/2)	-
LBL1	±-2+ (2/2)	1+ (1/2)
LBL2	1-2+ (2/2)	3+ (2/2)
LBL3	-	2-3+ (2/2)
LBL4	-	-
LBL5	-	-
LBL6	-	-

- = Negativo; ± = muy leve; 1+ = leve; 2+ = moderado; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte.

* Incluye secreción, superficie luminal y citoplasma.

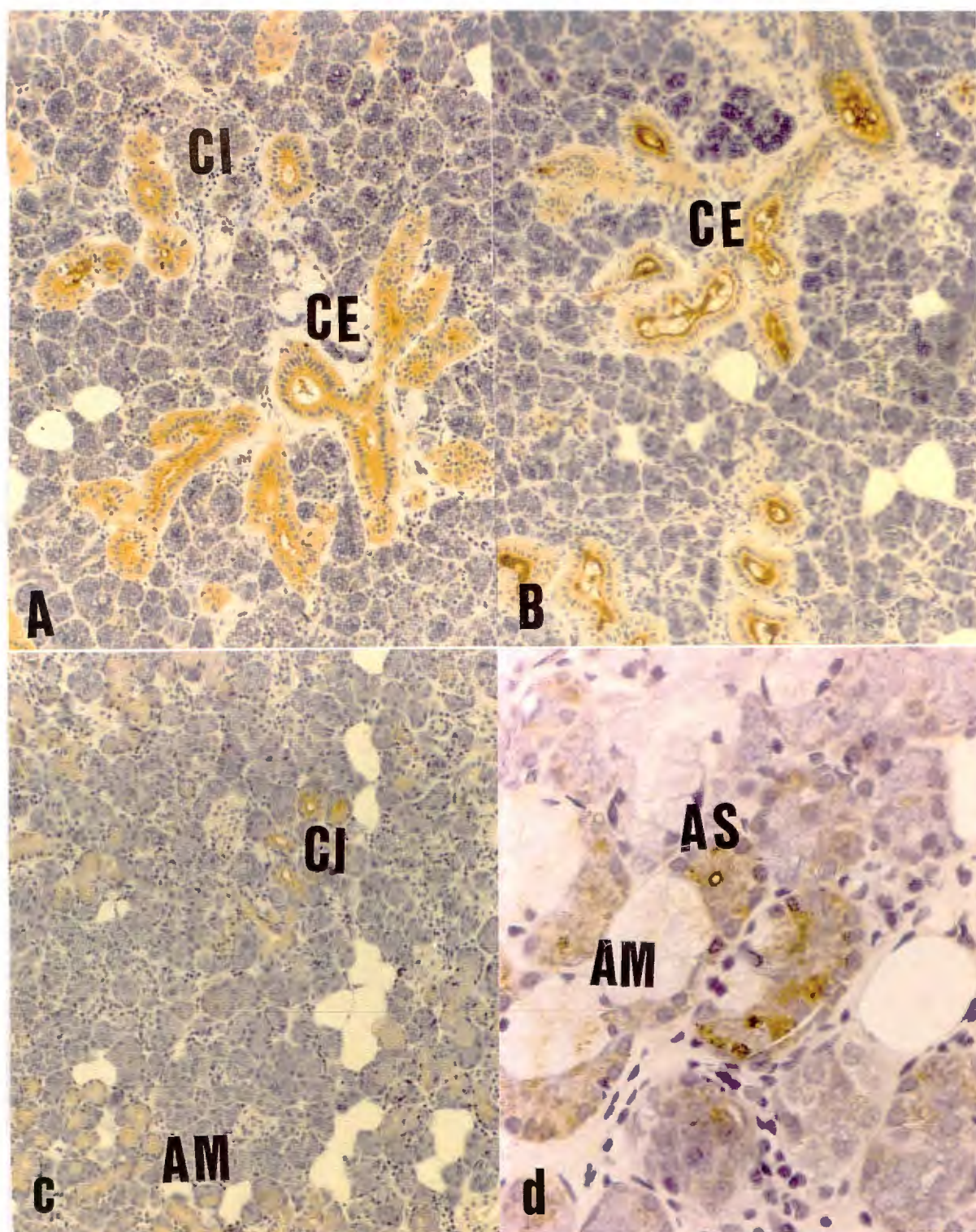


Fig. 1. Inmunoreacción de las glándulas submandibulares normales con los anticuerpos monoclonales para HMFG: (a) se puede observar que HMFG1 reacciona (3+) en los conductos intercalares (CI) y estriados (CE) y secreción, (b) HMFG2 reacciona con las mismas estructuras con diferente intensidad (ductos 2+ y secreción 3+), (c) con LBL2 se observó reacción (2+) sobre los ácinos mucosos (AM) y (d) LBL3 reaccionó (2-3+) principalmente con los acinos serosos (AS).

No fué observada reacción en las células mioepiteliales con ninguno de los anticuerpos.

3.- Glándula salival menor de labio. Las glándulas salivales menores mostraron una reacción ligera (1+) con los anticuerpos HMFG1 y HMFG2 en el borde luminal y en el citoplasma de las células ductales, mostrando aspecto granular (Tabla 3), a diferencia con la reacción observada en las glándulas submandibulares normales con HMFG1 y HMFG2.

Los anticuerpos monoclonales LBL1-LBL4 y LBL6 mostraron en las células acinares serosas reacción leve a moderada (1-2+) (Tabla 3) muy parecida a la reacción de las estructuras acinares de las glándulas parótida y submandibular. Las estructuras acinares serosas de las glándulas labiales reaccionan con la mayoría de los anticuerpos para HMFG. Las estructuras acinares mucosas reaccionan de leve a fuerte (1-3+) en diferente proporción con los anticuerpos LBL1, LBL2 y LBL3 (Tabla 3). Con LBL2 un baja cantidad de los conductos fueron de ligera a moderadamente positivos (1-2+) (ver Tabla 3).

Las células mioepiteliales no mostraron ninguna reacción en todas las muestras examinadas.

Esto es interesante de estudiar en el futuro el patrón de inmunoreactividad de las glándulas salivales menores de otras áreas (lengua, paladar y mucosa bucal).

4. Glándulas submandibulares con alteraciones preneoplásicas (A85-104P1, A85-87P1, MDA# 249329 y MDA# 249624). En adición a las nueve glándulas salivales submandibulares normales que fueron estudiadas, cuatro (4) más mostraron signos sugestivos a lesiones pre-neoplásicas. En estas se observaron cambios en la arquitectura de los conductos y ácinos, así como la presencia de células con pleomorfismo celular, hipercromatismo nuclear, pérdida de la relación nucleo-citoplasma, pérdida de la adhesión. La reacción con las cuatro glándulas con HMFG1 y HMFG2 (Tabla 4) sobre los conductos fué similar a las glándulas normales. En contraste a las glándulas normales, dos de ellas mostraron reacción fuertemente positiva (3-4+) sobre el sistema de conductos con LBL2 y LBL3 (Tabla 4), similares a las reacciones que fueron observadas en algunos de los adenomas pleomorfos (ver sección B). La inmunoreacción sobre los ácinos serosos y mucosos con LBL1-LBL3 fué en mayor intensidad y porcentaje que la observada en las glándulas normales (Tabla 4).

Tabla 3. Inmunoreacción de los anticuerpos monoclonales contra HMFG en las glándulas salivales labiales (4 muestras).

Anticuerpo monoclonal	Sistema de conductos	Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales (número de muestras positivas)	
		Acinos Serosos	Acinos Mucosos
HMFG1	±-1+ (2/4)	±-1+ (2/4)	-
HMFG2	±-1+ (1/4)	1+ (2/4)	-
LBL1	-	1-2+ (2/4)	1-2+ (3/4)
LBL2	1-2+ (2/4)	2+ (3/4)	1-3+ (3/4)
LBL3	-	1+ (2/4)	1-3+ (4/4)
LBL4	-	1-2+ (4/4)	-
LBL5	-	-	-
LBL6	-	1-2+ (4/4)	-

- = Negativo; + = muy leve; 1+ = leve; 2+ = moderado; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte. s = solo secreción.

Tabla 4. Reacción con los anticuerpos contra HMFG en glándulas submandibulares con alteraciones pre-neoplásicas (4 muestras).

Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales (número de muestras positivas)			
Anticuerpo monoclonal	Sistema de conductos	Acinos	
		Serosos	Mucosos
HMFG1	±-3+ (4/4)	1-2+ (1/4)	-
HMFG2	±-2+ (4/4)	1+ (1/4)	-
LBL1	-	1-3+ (2/4)	±-2+ (2/4)
LBL2	1-4+ (2/4)	1-4+ (4/4)	1-2+ (2/4)
LBL3	2-4+ (2/4)	2-4+ (3/4)	1-3+ (2/4)
LBL4	-	-	-
LBL5	-	-	-
LBL6	-	-	-

- = Negativo; + = muy leve; 1+ = leve; 2+ = moderado; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte.

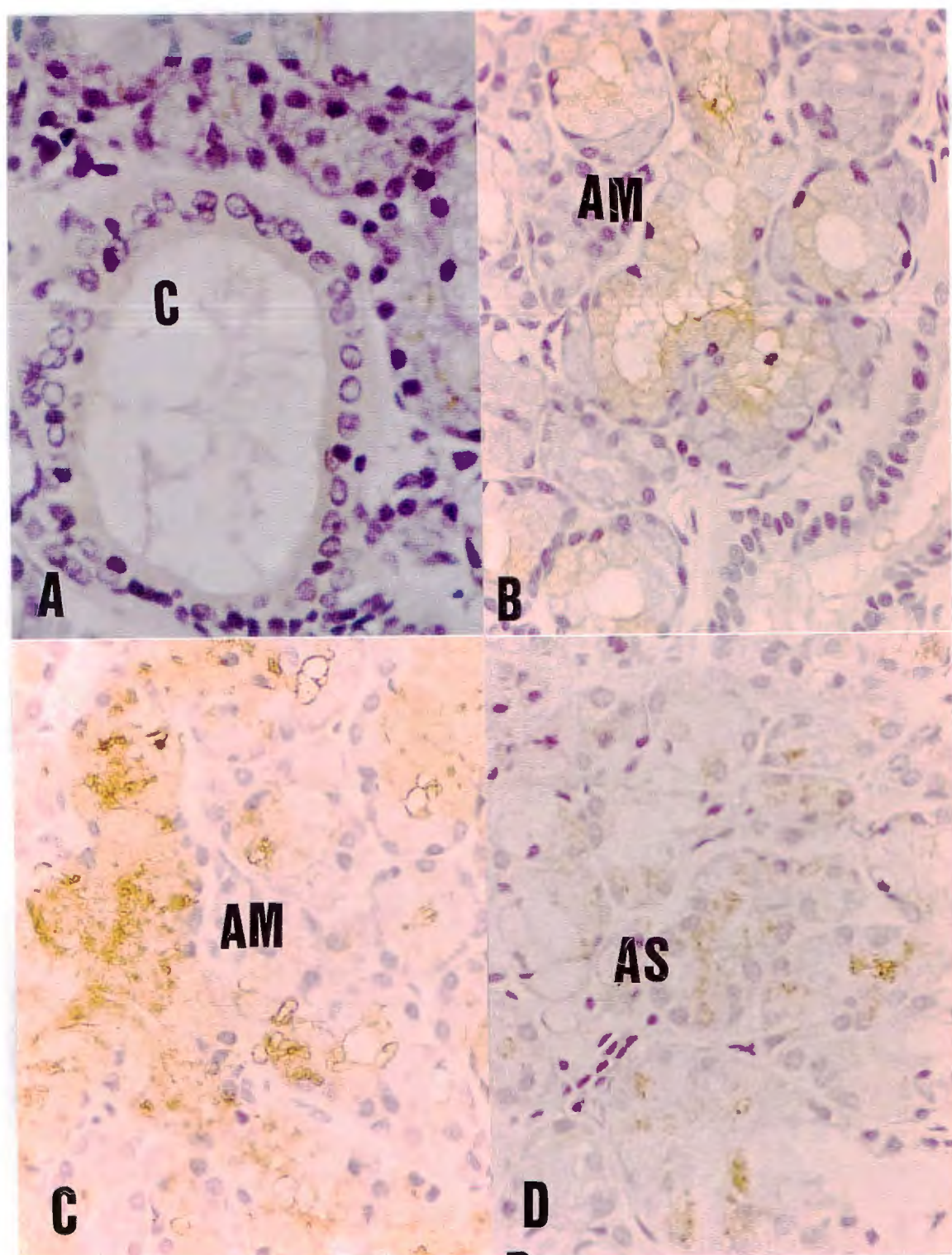


Fig. 2. Inmunoreactividad de las glándulas salivales labiales con los anticuerpos monoclonales contra HMFG. En estas glándulas la reacción mostró variaciones de lo observado con las glándulas submandibulares; (a) HMFG2 reaccionó (+ - 1+) con los acinos serosos (AS), mucosos (AM) y con los conductos (C), (b) LBL1 reaccionó en las células acinares mucosas (2-3+) mientras (d) LBL4 muestra una reacción (2+) con aspecto granular sobre los acinos serosos.

B) TUMORES DE GLANDULAS SALIVALES

Fueron utilizados ocho anticuerpos monoclonales para el glóbulo de grasa de la leche humana [Human Milk Fat Globule (HMFG)], sobre Tumores de las Glándulas Salivales Humanas por medio de un procedimiento estándar de inmunoperoxidasa para observar su reacción.

1.- Tumores benignos

a) 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 poligonales (con aspecto epidermoide), fusiformes, huso, redondas, de núcleo grande intensamente teñido y citoplasma eosinófilo, formando láminas, cordones y nidos ó islas grandes y pequeñas, sólidos ó 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 mucoi-de correspondiendo al estroma metaplásico que compone a la lesión. Se observaron algunas zonas con necrosis.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Este tumor mostró en las estructuras ductiformes (borde luminal, citoplasma y secreción) reacciones de moderada a muy fuerte (2-4+) con los anticuerpos monoclonales HMFG1 (2-3+), HMFG2 (3-4+), LBL1 (2-4+) y LBL2 (2-4+) en casi la mitad de las estructuras y con LBL3 (3-4+). Mientras que con los otros tres anticuerpos de la serie LBL la expresión fue de fuerte a muy fuerte LBL4 (3-4+), LBL5 (3-4+) en un y con LBL6 (3-4+) (Tablas 5 y 6).

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, intercaladas 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 con Inmunoperoxidasa. El citoplasma de las células fusiformes y grupos localizados entre la metaplasia hialina mostraron reacción moderadamente positiva (2+) con HMFG1, con HMFG2 de leve a moderada (1-2+) y con LBL4 moderadamente (2+) (Tabla 9). Las células claras fueron ligeramente positivas (1+) con los anticuerpos HMFG1-HMFG2.

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 ó en grupos (variedad de células claras) junto con las células epiteliales que formaban nidos ó islas compactas ó con pequeñas estructuras ductiformes no muy bien definidas. Con poco estroma laxo, zonas hialinas y mixoides con células estrelladas.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Las células claras mostraron una reacción moderada a fuertemente positiva (2-4+) en diferentes proporciones con los anticuerpos HMFG1, LBL1, LBL2, LBL3 y con LBL4 en muy baja cantidad (casi rara). La reacción en el borde

luminal de las estructuras ductiformes fue moderada a fuertemente positiva (2-3+) con LBL1-LBL3 (Tablas 5 y 6). Las células fusiformes mostraron una reacción de moderada a fuerte (2-3+) con el anticuerpo LBL2 y LBL3 (Tabla 9).

CASO FO38185.

Paciente masculino de 19 años de edad con lesión localizada en labio superior derecho.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. La lesión examinada correspondió a una neoplasia benigna de tejido glandular, muy celular, constituida por células epiteliales de núcleo intensamente basófilo, con poco citoplasma eosinófilo. Mezcladas entre éstas células epiteliales se encontraron otras de citoplasma claro, vacuolado tipo mucoso, ambas células en conjunto adoptan diferentes patrones como cordones, láminas y nidos compactos ó con estructuras ductales ocupadas por coágulos eosinófilos. También se observó metaplasia escamosa y formación de perlas de queratina. El estroma lo constituyó tejido conectivo laxo, con zonas de metaplasia hialina, mucoide y mixoide. La neoplasia se encontró cubierta parcialmente por una cápsula fibrosa.

Tinción con Inmunoperoxidasa. La reacción en las estructuras ductiformes (superficie, secreción y citoplasma) con los anticuerpos HMFG1, HMFG2 (Fig. 4), LBL1-LBL2 fué de leve a muy fuerte (1-4+) (Tabla 5) y con LBL3, LBL4, LBL5 y con LBL6 fué de moderada a muy fuerte (2-4+) (Tabla 6). Las zonas de la metaplasia escamosa, mostraron una reacción positiva que va de leve a fuerte (1-3+) con LBL1-LBL6. Las perlas de queratina fueron moderada y fuertemente (2-3+) positivas con LBL1 y LBL2 y levemente (1+) con HMFG1 (Tabla 7). Las células fusiformes mostraron una reacción homogénea de ligera a fuerte (1-3+) con HMFG1, LBL1-LBL3 (Tabla 9).

CASO FO16587A-B.

Paciente femenino de 68 años de edad con lesión localizada en paladar blando del lado derecho.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Se observó una neoplasia benigna originada de epitelio glandular, moderadamente celular,

constituida por cordones, láminas, nidos compactos ó con formaciones ductiformes y estructuras túbulo-ductales, conteniendo coágulos eosinófilos. Las células que constituyeron a esta neoplasia son de forma poligonal, cúbica, fusiforme, de núcleos grandes, hipercromáticos y con escaso citoplasma eosinófilo. El estroma es laxo, con zonas hialinas, mixoides, conteniendo algunas células de aspecto estrellado, también se observaron algunas células adiposas e infiltrado inflamatorio crónico.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Las estructuras ductales en su borde luminal, citoplasma y su contenido secretorio fueron leve ó fuertemente positivas (1-3+) con HMFG1, HMFG2, LBL2, LBL3. Mientras que con el resto de los anticuerpos la reacción fue menor (Tablas 5 y 6).

CASO F05887.

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 ó 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 con Inmunoperoxidasa. En este tumor las estructuras ductiformes reaccionaron de leve a fuerte (1-3+) con HMFG1, HMFG2, LBL1-LBL4 tiñendo principalmente la secreción de moderada a fuerte (2-3+) (Tablas 5 y 6). La metaplasia escamosa (perlas de queratina) mostró ligera (1+) reacción con HMFG1, pero fue rara, mientras tanto con LBL1-LBL4 y LBL6 la reacción fué de moderada a fuerte (2-3+) (Tablas 7 y 8). Las células fusiformes mostraron una reacción fuerte (3+) en los nidos celulares sólidos con LBL3 y LBL4 (Tabla 9).

CASO FO20687A-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 ó 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, fibroso y mucoide. También se observaron células adiposas e infiltrado inflamatorio crónico. La neoplasia se encuentra rodeada por una cápsula fibrosa.

Tinción con Inmunoperoxidasa. La inmunoreacción fué de leve a muy fuerte (1-4+) con los anticuerpos HMFG1 (2+), HMFG2 (2-3+), LBL1 (2-3+), LBL2 (1-2+) (Tabla 5) y LBL3 (2-4+), mientras que con LBL4 (2-3+), LBL5 (3-4+) y LBL6 (2-4+) en las estructuras ductiformes y tubulo-ductales la reacción fué de moderada a muy fuerte (2-4+) (Tabla 6). Se observaron islas de células fusiformes moderadamente positivas (2+) con LBL1 (Tabla 9).

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 láminas, cordones y nidos compactos ó con estructuras ductiformes. En la periferia de la neoplasia se encuentran islas celulares conteniendo en el centro material condroide ó 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 con Inmunoperoxidasa. En la zona de predominio celular, adyacente a la cápsula , se encontraron islas celulares con formaciones ductiformes, la reacción en la secreción es moderadamente positiva (2+) en forma heterogénea, en el borde luminal es moderada (2+) y en el citoplasma celular fué levemente positivo (1+) con los anticuerpos HMFG2, LBL1-LBL3. El resto de los anticuerpos fueron negativos.

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 dispuestas en empalizada. Las otras células formaron cordones y nidos compactos ó con estructuras 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 con Inmunoperoxidasa. Las zonas celulares que muestran formaciones de estructuras ductiformes, con HMFG1 (2+) y HMFG2 (2+) la reacción en su borde luminal es moderadamente (2+) positivo y en el citoplasma de las células fué también moderada (2+), en tanto con LBL1 y LBL2 la reacción fué de fuerte a muy fuerte (3-4+) (Tabla 5), LBL3 reaccionó en forma moderada a fuerte (2-3+) (Tabla 6). Las células fusiformes mostraron una reacción leve (1+) con HMFG2 y de moderada a fuerte (2-4+) con LBL1-LBL3 (Fig. 4) y con LBL6 la reacción fué moderada (2+) (Tabla 9). Las áreas de metaplasia escamosa reaccionaron ligera ó moderadamente (1-2+) raramente con LBL1, LBL2 (Tabla 7). Mientras LBL4 y LBL5 no mostraron reacción (Tabla 8).

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 lumen. Algunas células aisladas con forma estrellada y condroide se localizaron entre el tejido metaplásico. La neoplasia se encuentra dividida en lóbulos por bandas de fibras colágenas gruesas, algunas hialinizadas, con infiltrado inflamatorio crónico. La neoplasia se encontró parcialmente cubierta por una cápsula fibrosa.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Se observaron algunas estructuras ductiformes no vistas con H&E, que con los anticuerpos HMFG1, HMFG2, LBL1-LBL4 reaccionaron en el borde luminal moderadamente (2+) y la secreción levemente (1+), en tanto que el citoplasma es raro. Los espacios celulares de la metaplasia condroide fueron ligeramente positivos (1+), en estas estructuras la reacción es con la misma intensidad y cantidad con los anteriores anticuerpos. Los dos anticuerpos monoclonales, LBL5 y LBL6 fueron negativos.

CASO F00689.

Paciente masculino de 43 años de edad con lesión localizada en glándula parótida.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Microscopicamente fué observada una neoplasia benigna de tejido glandular con zonas de gran celularidad. Algunas células mostraban forma poligonal con núcleo tenuemente basófilo y abundante citoplasma eosinófilo claro, con aspecto de célula ductal. Se observaron zonas de metaplasia escamosa (Fig. 3) formada por rosetas ó nidos bien delimitados junto con algunas estructuras ductiformes. Estas rosetas se encontraron entre células de forma fusiforme, triangular ó cúbicas, de núcleo grande e hiper cromático y escaso citoplasma, agrupadas en cordones y láminas. El estroma metaplásico es el que predomina, mostrando áreas de aspecto hialino, mixoide, condroide y mixocondroide. También se observó tejido glandular de aspecto normal adyacente a la neoplasia.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Las células de la metaplasia escamosa mostraron en su citoplasma una reacción de leve a fuerte (1-3+) con HMFG1, HMFG2, LBL1 y LBL2 (Tabla 7), en tanto que con el resto de los anticuerpos existió reacción con similar intensidad pero en menor cantidad de estructuras LBL3-LBL6 (Tabla 8).

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, ovales y redondas, de núcleos hiper cromáticos, nucléolos prominentes, con escaso citoplasma eosinófilo. Las células forman láminas, islas ó 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 con Inmunoperoxidasa. Con HMFG1 el citoplasma de las células fusiformes mostraron una reacción moderada (2+). Entre la neoplasia se encontraron porciones de glándula normal, mostrando las células mucosas reacción leve (1+) y las células de los conductos también. Las células fusiformes en su citoplasma mostraron reacción de moderada a muy fuerte (2-4+) aproximadamente en 1-3% con los anticuerpos HMFG2, LBL4, LBL5 y LBL6 (Tabla 9).

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 con Inmunoperoxidasa. Los bordes luminales de las estructuras ductiformes fueron moderadamente (2+) positivos, el citoplasma celular mostró una reacción moderada (2+) y la secreción fué leve (1+) con HMFG1. En tanto que con LBL1, las células fusiformes fueron de moderada a fuertemente positivas (2-3+) (Tabla 9) y el borde luminal y el citoplasma celular de las estructuras ductiformes fueron de leve a fuertemente (1-3+) positivos (Tabla 5). Con el resto de los anticuerpos fué negativo (Tabla 6).

B86-84.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Se observó bajo el microscopio de luz 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 con Inmunoperoxidasa. Las estructuras ductiformes en la superficie luminal mostraron una reacción de moderada a fuerte (2-3+) en un 2-20% con todos los anticuerpos monoclonales (HMFG1, HMFG2, LBL1-LBL5 y LBL6; Tablas 5 y 6) y la metaplasia escamosa mostró una reacción ligera (1+) con HMFG1 y HMFG2 (Tabla 7).

CASO S728202 B4.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Fue observada una neoplasia benigna de tejido glandular, muy celular, con células fusiformes, estrelladas, cúbicas, triangulares de tamaño variable, con núcleo central grande y abundante citoplasma eosinófilo, formando cordones, nidos grandes y pequeños, estructuras tubulares y ductales con doble capa celular y coágulos eosinófilos en su interior, mezclados en un estroma de tejido conectivo laxo metaplásico de aspecto mixoide, mucoso y hialino.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Con HMFG1 y HMFG2, el citoplasma de las células fué moderadamente (2+) positivo, el borde de las estructuras ductiformes y la secreción fueron de fuerte a muy fuertemente (3-4+) positivas (con ambos anticuerpos, la reacción en intensidad y porcentaje es la misma). LBL1 (Tabla 5),

LBL3 y LBL4 reaccionaron de leve a moderado (1-2+), casi exclusivamente con la secreción y en menor proporción con el citoplasma (Tabla 6). LBL5 y LBL6 reaccionaron en diferentes proporciones (Tabla 6). LBL2 reaccionó débilmente con las células fusiformes (Tabla 9).

CASO S651921B2.

Neoplasia benigna de glándula submandibular.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. La revisión microscópica mostró la presencia de una neoplasia benigna originada en epitelio glandular, muy celular y con moderada cantidad de estroma metaplásico. Las células que lo forman son fusiformes, estrelladas, poligonales, ovales, de tamaño variable formando nidos eosinófilos claros bien delimitados, formando metaplasia escamosa, algunos con perlas de queratina o células cúbicas formando estructuras ductiformes y microquistes. El estroma estuvo formado por tejido conectivo laxo, con zonas mucoides, hialinas y mixoides. Adyacente a la neoplasia se encontró tejido glandular de apariencia normal.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Las estructuras ductiformes en sus diferentes componentes fueron de leve a moderadamente (1-2+) positivas con HMFG2 (raro; Tabla 5), LBL3 (raro) y LBL5 (Tabla 6). Las células fusiformes mostraron una reacción de moderada a fuerte (2-3+) con LBL6 (Tabla 9). La metaplasia escamosa fué de leve a moderada (1-2+) en su reacción con HMFG2, LBL1, LBL2 (Tabla 7), LBL3-LBL6 (Tabla 8).

CASO S689238 D1.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. El espécimen examinado correspondió a una neoplasia benigna de tejido glandular, muy celular y poco estroma, con macroquistes conteniendo una sustancia eosinófila clara y espacios de cristales de colesterol. Las células fueron de forma y tamaño variable, de núcleo grande e hipercromático con citoplasma eosinófilo abundante en algunas, escaso en otras, adoptando un patrón en bandas, cordones o masas semicompactas, formaciones de estructuras tubulo-ductales y ductiformes, ocupadas por secreciones. El estroma de tejido conectivo laxo fué escaso y con áreas mixoides.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Las estructuras ductiformes y tubulo-ductales fueron ligera y moderadamente positivas, en la membrana celular, el borde luminal con HMFG1 y HMFG2. La secreción fué de moderada a fuerte (2-3+) en proporciones diferentes entre HMFG1 y HMFG2 (Tabla 5). Las células claras fueron ligeramente positivas (1+) solo con HMFG1, las células fusiformes fueron de moderada a fuertemente positivas (2-3+) con LBL6 (Tabla 9). Con los anticuerpos LBL3 y LBL6 se observó una escasa reacción en forma moderada (2+) (Tabla 6).

Los adenomas pleomorfos muestra diferentes patrones histomorfológicos que podrían ser usados como una característica de diferenciación celular, en este particular estudio fue posible observar que aquellos tumores que mostraban estructuras ductiformes bien definidas mostraron una respuesta más específica por los anticuerpos HMFG1-HMFG2, LBL1, LBL2 (Tabla 5) y LBL3 y en menor proporción con el resto de los anticuerpos monoclonales (Tabla 6). Aquellos tumores que mostraron dentro de sus características histomorfológicas metaplasia escamosa con formación de perlas de queratina, exhibieron una mayor actividad con casi todos los anticuerpos con diferentes niveles de intensidad en la inmunoreacción (Tablas 7 y 8). Así con sus diferentes componentes, estos tumores mostraron distinta intensidad en la inmunoreacción entre uno y otro anticuerpo monoclonal (Tabla 10). Las células fusiformes y la variedad de células claras (estas últimas presentes en cinco tumores) presentaron reacción en menor porcentaje y baja intensidad con pocos anticuerpos.

Tabla 5. Estructuras ductiformes: Reacción de sus componentes con los anticuerpos HMFG1- HMFG2, LBL1-LBL2.

Caso No.	Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales			
	HMFG1	HMFG2	LBL1	LBL2
FO7177	2-3+	3-4+	2-4+	2-4+
FO6383	0	0	0	0
FO14385	-	2+	3+	3+
FO38185	2-3+	3-4+	1-4+	1-4+
FO16587	1-3+	1-3+	3+	3+
FO5887	2+	2+	2+	2+
FO20687	2+	2-3+	2-3+	1-2+
FO25287	muy raro	muy raro	muy raro	muy raro
FO31487	2+	2+	3-4+	3-4+
FO13588	muy raro	raro	raro	raro
FO0689	raro	-	-	-
B84-0713	0	0	0	0
B86-13	2+	-	1-3+	-
B86-84	2-3+	2-3+	2-3+	2-3+
S728202B4	2-4+	1-2+	1-2+	-
S651921B2	muy raro	2+	-	-
S689238D1	2+	2-3+	-	-

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

Tabla 6. Estructuras ductiformes: Reacción de sus componentes con los anticuerpos monoclonales LBL3-LBL6.

Caso No.	Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales			
	LBL3	LBL4	LBL5	LBL6
FO7177	3-4+	3-4+	3-4+	3-4+
FO6383	0	0	0	0
FO14385	3-4+	-	-	-
FO38185	2-4+	2-4+	2-4+	2-4+
FO16587	2+	2-4+	1-2+	2+
FO5887	2-3+	2-3+	-	-
FO20687	2-4+	2-3+	3-4+	2-4+
FO25287	2+	-	-	-
FO31487	2-3+	-	-	-
FO13588	2+	raro	-	-
FO0689	-	-	-	-
B84-0713	0	0	0	0
B86-13	-	-	-	-
B86-84	1-3+	1-3+	muy raro	2-3+
S728202B4	1-2+	1-3+	2-3+	1-4+
S651921B2	muy raro	-	muy raro	-
S689238D1	muy raro	-	-	2+

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

Tabla 7. Metaplasia escamosa: Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales HMFG1-HMFG2, LBL1-LBL2.

Caso No.	Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales			
	HMFG1	HMFG2	LBL1	LBL2
FO7177	0	0	0	0
FO6383	0	0	0	0
FO14385	0	0	0	0
FO38185	1+	1+	2-3+	2-3+
FO16587	0	0	0	0
FO5887	muy rara	-	1-2+	2+
FO20687	0	0	0	0
FO25287	0	0	0	0
FO31487	-	-	1-2+	2+
FO13588	muy rara	-	-	muy rara
FO0689	1+	1+	2-3+	1-3+
B84-0713	0	0	0	0
B86-13	0	0	0	0
B86-84	1+	1+	-	-
S728202B4	-	-	-	-
S689238D1	0	0	0	0
S651921B2	-	1+	1-2+	1+

0 = No se observó metaplasia escamosa; - = negativa; 1+ = leve; 2+ = moderada; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte.

Tabla 8. Metaplasia escamosa: Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales LBL3-LBL6.

Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales				
Caso No.	LBL3	LBL4	LBL5	LBL6
FO7177	0	0	0	0
FO6383	0	0	0	0
FO14385	0	0	0	0
FO38185	1-3+	2-3+	muy rara	2-3+
FO16587	0	0	0	0
FO5887	2-3+	2-3+	-	muy rara
FO20687	0	0	0	0
FO25287	0	0	0	0
FO31487	-	-	-	muy rara
FO13588	-	-	-	-
FO0689	1-3+	1-2+	1-3+	1-2+
B84-0713	0	0	0	0
B86-13	0	0	0	0
B86-84	-	-	-	-
S728202B4	-	-	-	muy rara
S689238D1	0	0	0	0
S651921B2	1+	1+	1+	1+

0 = No muestra metaplasia escamosa; - = negativa; 1+ = leve; 2+ = moderada; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte.

Tabla 9. Inmunoreacción de las células fusiformes de los adenomas pleomorfos con los anticuerpos contra HMFG.

Anticuerpo	No. de tumores con células fusiformes positivas (%)	Intensidad de la reacción (no. de tumores con células fusiformes positivas)
HMFG1	4/17 (23.5%)	1-3+ (4/17)
HMFG2	3/17 (17.6%)	1-2+ (3/17)
LBL1	4/17 (23.5%)	2-4+ (4/17)
LBL2	3/17 (17.6%)	1-3+ (3/17)
LBL3	4/17 (23.5%)	2-4+ (4/17)
LBL4	3/17 (17.6%)	2-3+ (3/17)
LBL5	2/17 (11.7%)	2-3+ (2/17)
LBL6	5/17 (29.4%)	2-4+ (5/17)

1+ = Leve; 2+ = moderada; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte.

Tabla 10. Análisis del número de tumores que reaccionaron con los anticuerpos contra HMFG (estructuras ductiformes y metaplasia escamosa).

Anticuerpo	No. de tumores positivos (%)	Intensidad de la reacción (no. de tumores)
HMFG1	11/17 (64.7%)	1-4+ (11/17)
HMFG2	13/17 (76.5%)	2-4+ (13/17)
LBL1	12/17 (70.6%)	1-4+ (12/17)
LBL2	9/17 (52.9%)	1-4+ (9/17)
LBL3	13/17 (76.5%)	1-4+ (13/17)
LBL4	8/17 (47%)	1-4+ (8/17)
LBL5	7/17 (41.2%)	1-4+ (7/17)
LBL6	7/17 (41.2%)	1-4+ (7/17)

- = No existió reacción; 1+ = leve; 2+ = moderada; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte.

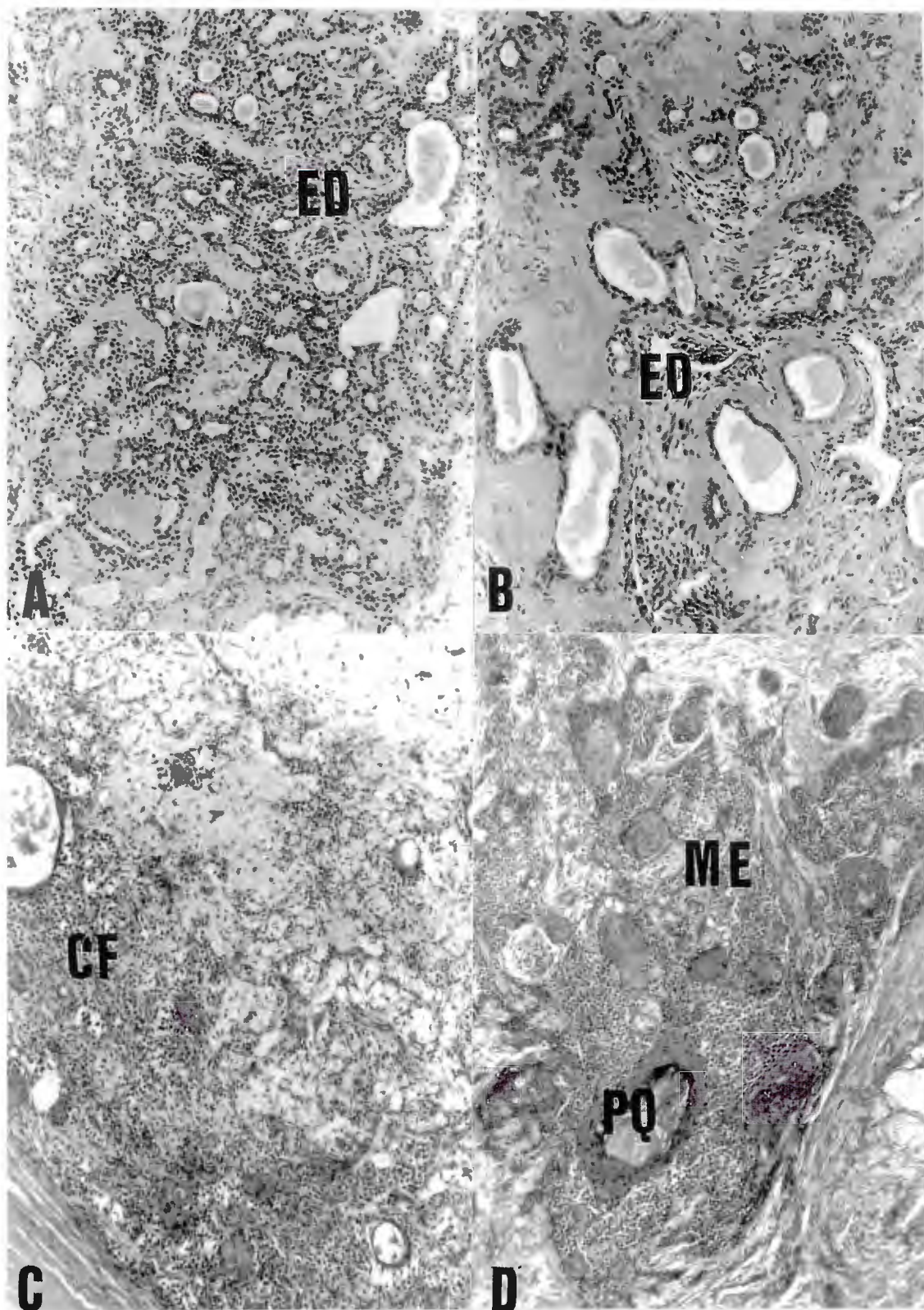


Fig. 3. Cortes histopatológicos teñidos con H-E de los adenomas pleomorfos (a, b y c) estructuras ductiformes (ED) con coágulos eosinófilos y secreciones, células fusiformes (CF) y estrelladas, así como metaplasia escamosa (ME) y formación de perlas de queratina (PQ) (d).

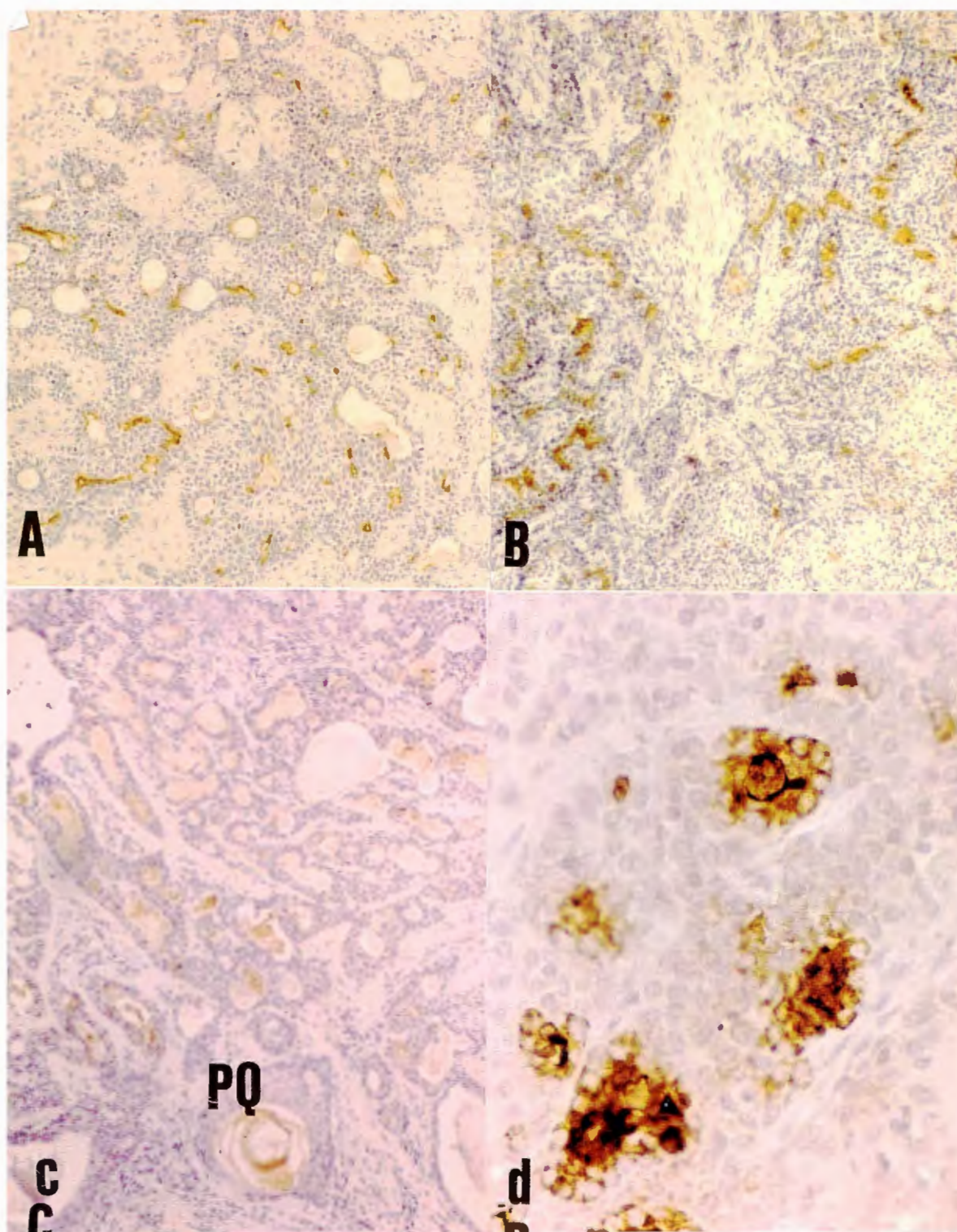


Fig. 4. Reacción de los anticuerpos contra HMFG en los adenomas pleomorfos con (a) HMFG2 (FO31485) se observa reacción (3+) en la superficie luminal de las estructuras ductiformes (ED), con (b) LBL1 (FO31487) podemos ver que reacciona (3+) con las células fusiformes (CF), (c) LBL2 (FO5887) muestra una reacción (2+) sobre la metaplasia escamosa (ME) y las perlas de queratina (PQ), en tanto que con (d) LBL4 (FO7177) se puede observar una fuerte reacción con las células epiteliales de forma poliédrica.

b) Oncocitoma (Adenoma oxifílico)**CASO FO26586**

Paciente femenino de 65 años, con lesión localizada en la región postero-inferior de la glándula parótida.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Se observó una neoplasia benigna de glándula salival, constituida por células grandes, bien delimitadas, con abundante citoplasma eosinófilo, granular, con núcleo central grande, pálido ó hipercromático, algunos de ellos con cariólisis, cariorrexis y nucléolos prominentes. Las células están arregladas en cordones ó nidos compactos, existen formaciones ductiformes conteniendo poca secreción y también tiene escaso estroma de aspecto hialino muy vascularizado y áreas hemorrágicas. La lesión esta limitada por una cápsula fibrosa discontinua.

Tinción con Inmunoperoxidasa. El borde luminal de las formaciones ductiformes y la secreción son levemente positivos (1+) con HMFG1. En tanto con HMFG2 y LBL1 reaccionaron en la mayor parte de la muestra y LBL3-LBL6 reaccionaron en toda la sección en forma moderada (2+).

2) Tumores Malignos

a) Carcinoma mucoepidermoide

CASO FO23786 A

Paciente femenino de 14 años de edad con lesión localizada en maxilar superior izquierdo.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Neoplasia maligna de grado intermedio de tejido glandular, compuesta en su mayor parte por células de citoplasma claro o levemente eosinófilo, vacuolado, con núcleo central grande, hipercromático correspondiendo a la célula mucosecretora. En tanto que la célula epidermoide que compone a la neoplasia fué de forma poligonal, también se observaron células columnares de citoplasma eosinófilo, núcleo hipercromático, arregladas en cordones y patrones sólidos. Pudo observarse también un conducto. Formación de micro y macroquistes conteniendo coágulos eosinófilos homogéneos. El tumor mostró escaso estroma hialino y grandes áreas hemorrágicas.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Esta neoplasia solo mostró moderada reacción con el anticuerpo LBL2 por parte de las células mucosecretoras y epidermoides (Tabla 11 y 12).

CASO FO28486

Paciente masculino de 60 años de edad con lesión neoplásica localizada en el área retromolar derecha.

Tinción con Hematoxilina y Eosina: Se observó la presencia de una neoplasia maligna de grado intermedio, originada en epitelio glandular, constituida por células redondas, ovales, poligonales, de límites bien definidos, dispuestas en grupos compactos. Estuvo formada por dos tipos celulares, uno de ellos de tipo mucoso con forma redonda, citoplasma claro, vacuolado, con núcleo central grande hipercromático; el otro tipo de célula con características de célula epidermoide, de citoplasma eosinófilo, de núcleo grande, hipercromático,

nucléolos prominentes, existieron áreas con microquistes y formaciones ductiformes con coágulos eosinófilos. El estroma circundante en algunas áreas presentó hialinización. La neoplasia esta muy vascularizada y se observaron áreas hemorrágicas.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Las células epidermoides mostraron una reacción ligera (1+) con los anticuerpos monoclonales HMFG1-HMFG2, en tanto que con LBL4 y LBL6 la reacción fué de moderada a fuerte (2-3+) (Tabla 11 y 12).

CASO F024987

Paciente femenino de 43 años de edad con lesión neoplásica en la zona retromolar derecha.

Tinción con Hematoxilina y Eosina: Fue observada una neoplasia maligna bien diferenciada de epitelio glandular, compuesta predominantemente por células mucosas de citoplasma claro o levemente eosinófilo, vacuolado, con núcleo central pequeño, picnótico. El otro tipo celular que también compone a la neoplasia, son células epidermoides que mostraron forma poligonal y en algunas áreas fueron fusiformes, de citoplasma eosinófilo, núcleo hipercromático, las células estaban agrupadas en masas sólidas. Se observaron conductos con cambios neoplásicos, formaciones ductiformes, micro y macroquistes conteniendo un material eosinófilo de aspecto mucoso y homogéneo en algunas zonas. Las islas de células neoplásicas se encontraron rodeadas por un estroma de tejido conectivo fibroso denso, muy vascularizado, con grandes zonas hemorrágicas y escaso infiltrado inflamatorio crónico. La neoplasia se encontró cubierta por una capa de epitelio escamoso estratificado queratinizado.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Con HMFG1, la secreción de las áreas microquísticas fueron moderadamente positivas (2+) al igual que las células epidermoides. Con HMFG2 la secreción fué moderada (2+) y las células epidermoides de leve a moderada (1-2+) en un. Con LBL1 la reacción fué de leve a moderada (1-2+) en las células mucossecretoras, en la secreción y en las células epidermoides. LBL2 reaccionó con la secreción en un 30-40% en forma moderada (2+). LBL3 en las células mucossecretoras y en la secreción reaccionaron de fuerte a muy fuerte (+3-4). Mientras que con LBL4 y LBL5 las secreciones mostraron de leve a moderada reacción (1-2+) (Tabla 11 y 12).

CASO FO12989.

Paciente femenino de 31 años de edad con lesión localizada en paladar duro.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Se observó una neoplasia maligna de grado intermedio, constituida por células mucosecretoras y células epidermoides, agrupadas en patrones sólidos, ductiformes y quísticos con proyecciones papilares hacia la luz, también fueron observados ductos con metaplasia escamosa, queratinización individual y pequeñas perlas de queratina, las células epidermoides muestran hipercromatismo nuclear, nucléolos prominentes y pleomorfismo celular. Los quistes se encontraron revestidos por una o dos capas de células epiteliales cúbicas y células de Goblet intercaladas. El estroma de tejido conectivo fibroso denso mostró zonas de metaplasia hialina, grandes áreas hemorrágicas e infiltrado inflamatorio crónico. La neoplasia se encontró cubierta por epitelio estratificado escamoso queratinizado.

Tinción con Inmunoperoxidasa. La secreción mucosa y las células epidermoides que formaron parte de esta neoplasia maligna mostraron una afinidad de moderada a fuerte (2-3+) con los anticuerpos monoclonales LBL1, LBL2 y LBL3 (Tabla 12).

CASO S7712504A1.

Lesión localizada en glándula sublingual.

Tinción con Hematoxilina y Eosina: Se observó una neoplasia maligna bien diferenciada de tejido glandular, compuesta por células mucosecretoras en su mayor parte y por células del tipo epidermoide. Las células mucosecretoras tienen citoplasma claro ó ligeramente basófilo, vacuolado, con núcleo picnótico. Las células de tipo epidermoide tienen forma poliédrica o fusiforme, con citoplasma intensamente eosinófilo y núcleo central hipercromático. Las células están agrupadas en nidos rodeadas por escasas bandas de tejido conectivo hialino. También se observaron conductos grandes (excretorios) formados por células mucosecretoras y células epiteliales columnares, cuboidales y fusiformes con cambios metaplásicos, conductos pequeños y áreas quísticas que contienen coágulos eosinófilos. El estroma circundante es fibroso denso, con áreas hialinas, altamente vascularizado, áreas con hemorragia antigua e infiltrado inflamatorio crónico, haces gruesos de terminaciones nerviosas, tejido adiposo y una capa de epitelio estratificado escamoso en la superficie externa.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Las células epidermoides de esta neoplasia mostraron una afinidad de leve a fuerte (1-3+) con los ocho anticuerpos monoclonales.

CASO S78540B9.

Tinción con Hematoxilina y Eosina: Se observó una neoplasia maligna compuesta por células redondas, de citoplasma claro, levemente eosinófilo, de núcleo pequeño y por células epidermoides que muestran pleomorfismo celular, hipercromatismo y pleomorfismo nuclear, pérdida de la adhesión, se observaron algunas masas compactas e islas aisladas infiltrando músculo. El estroma estaba formado por tejido conectivo fibroso denso con algunas áreas hialinas, infiltrado inflamatorio crónico y algunas células multinucleadas reactivas.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Esta neoplasia únicamente mostró reacción con los anticuerpos HMFG1 y HMFG2 en forma leve y moderada (1-2+). HMFG1 en las células epidermoides y mucosecretoras y HMFG2 con las células mucosecretoras únicamente (Tabla 11 y 12).

Como se ha podido observar entre una neoplasia y otra las respuestas a los anticuerpos monoclonales varía en intensidad y porcentaje (Tablas 11 y 12), dependiendo del grado de malignidad (diferenciación celular y actividad funcional) de cada una de las neoplasias estudiadas.

Tabla 11. Carcinoma mucoepidermoide: Reacción con los anticuerpos monoclonales contra HMFG; HMFG1-HMFG2, LBL1-LBL2.

Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales (componentes)				
Caso No.	HMFG1	HMFG2	LBL1	LBL2
FO23786 (GI)	-	-	-	2+ (CM, CE)
FO28486 (GI)	1+ (CE)	1+ (CE)	-	-
FO24987* (BG)	2+ (S, CE)	1-2+ (S, CE)	1-2+ (CM, S, CE)	2+ (S)
FO12989* (GI)	-	-	2-3+ (S, CE)	2-3+ (S, CE)
S7712504A1 (BG)	2-3+ (CE)	3+ (CE)	2+ (CE)	2+ (CE)
S78540B9 (AG)	1-2+ (CM, CE)	2+ (CM)	-	-

BG= Bajo grado de malignidad; GI= Grado intermedio; AG= alto grado; CM= células mucosecretoras; CE= células epidermoides; S= secreción.

- = Negativo; 1+ = leve; 2+ = moderado; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte.

* Estas neoplasias histológicamente mostraron microquistes y conductos con secreción mucosa, siendo positivas estas secreciones con algunos anticuerpos monoclonales.

Tabla 12. Carcinoma mucoepidermoide: Reacción con los anticuerpos monoclonales contra HMFG; LBL3-LBL6.

Inmunoreacción con los anticuerpos monoclonales (componentes)				
Caso No.	LBL3	LBL4	LBL5	LBL6
FO23786 (GI)	-	-	-	-
FO28486 (GI)	-	3+ (CE)	-	2+ (CE)
FO24987* (BG)	3-4+ (S CM)	1-2+ (S)	-	2+ (S)
FO12989* (GI)	2-3+ (S CE)	-	-	-
S7712504A1 (BG)	1-2+ (CE)	1-2+ (CE)	2-3+ (CE)	1-2+ (CE)
S78540B1 (AG)	-	-	-	-

BG= Bajo grado de malignidad; GI= grado intermedio; AG= alto grado; CM= células mucosecretoras; CE= células epidermoides; S= secreción.

- = Negativo; 1+ = leve; 2+ = moderado; 3+ = fuerte; 4+ = muy fuerte

* Estas neoplasias histológicamente mostraron microquistes y conductos con secreción mucosa, siendo positivas estas secreciones con algunos anticuerpos monoclonales.

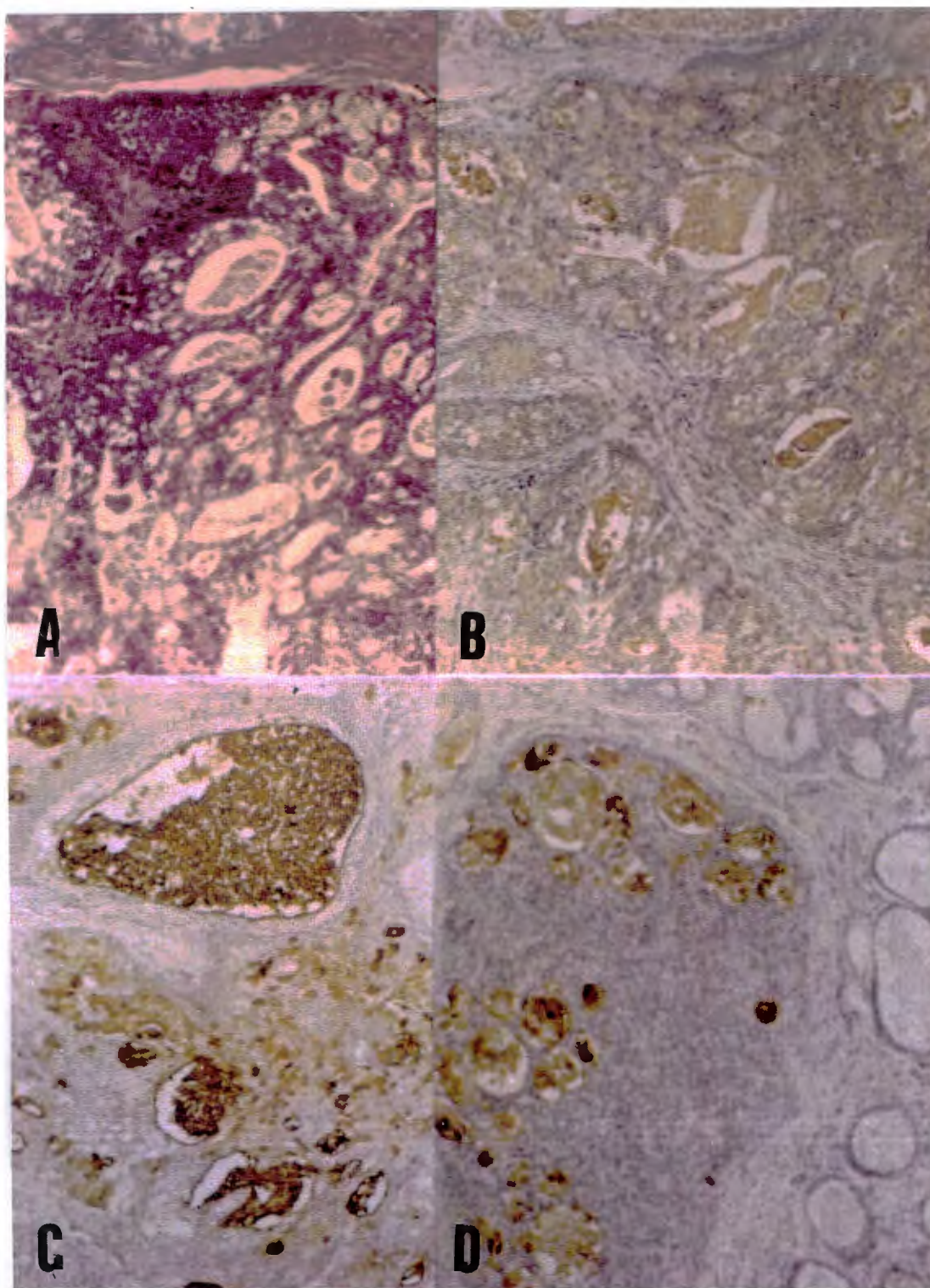


Fig. 5. Reacción de un carcinoma mucoepidermoide de bajo grado de malignidad (FO24987) con los anticuerpos contra HMFG. (a) H-E, (b) con HMFG1 reaccionó principalmente sobre la secreción (S) y las células epidermoides (CE), (c) HMFG2 reaccionó (3-4+) con las células mucosecretoras (CM) y la secreción, (d) LBL6 reaccionó (2+) con la secreción. Noten que la reacción de estos tumores con los anticuerpos contra HMFG varía dependiendo del grado de malignidad (ver; resultados pag. 97-103).

b) Carcinoma Adenoideo Quístico**CASO SS753176I7.**

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Se observó una neoplasia maligna de tejido glandular compuesta por células pequeñas de forma cuboidal, de núcleo grande hipercromático, con escaso citoplasma eosinófilo, formando estructuras ductales ó islas compactas pequeñas y grandes, algunas de estas islas mostraron microquistes, conteniendo coágulos eosinófilos ó secreción ligeramente basófila. También se observó compresión vascular por parte de las islas de células neoplásicas e invasión a tejido adiposo. El estroma estaba formado por tejido conectivo denso con áreas hialinas entre las islas de células neoplásicas. También se observó gran vascularidad y escaso infiltrado inflamatorio crónico.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Las estructuras ductales que fueron las que predominaron en esta neoplasia, mostraron una reacción de leve a moderada (1-2+) con los anticuerpos monoclonales HMFG1 y HMFG2, siendo negativo con el resto de los anticuerpos monoclonales.

CASO SS832947B6.

Lesión localizada en glándula submandibular.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Compuesta por células epiteliales de forma cúbica, adoptando un patrón cribiforme, conteniendo en el centro material hialino.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Esta neoplasia no presentó reacción con ningún anticuerpo.

CASO SS8312105C8.

Lesión localizada en glándula parótida.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Se observó una neoplasia maligna, formada por células pequeñas, homogéneas de forma cúbica, con núcleo grande e hipercromático, de escaso citoplasma

eosinófilo, acomodadas en islas con aspecto cribiforme. Las estructuras ductales mostraron coágulos eosinófilos y secreción mucosa ligeramente basófila. El estroma era denso y en zonas adyacentes a las islas de células neoplásicas estaba hialinizado.

Tinción con Inmunoperoxidasa. El anticuerpo monoclonal HMFG2, fué el único que mostró una moderada reacción (2+) con ésta neoplasia.

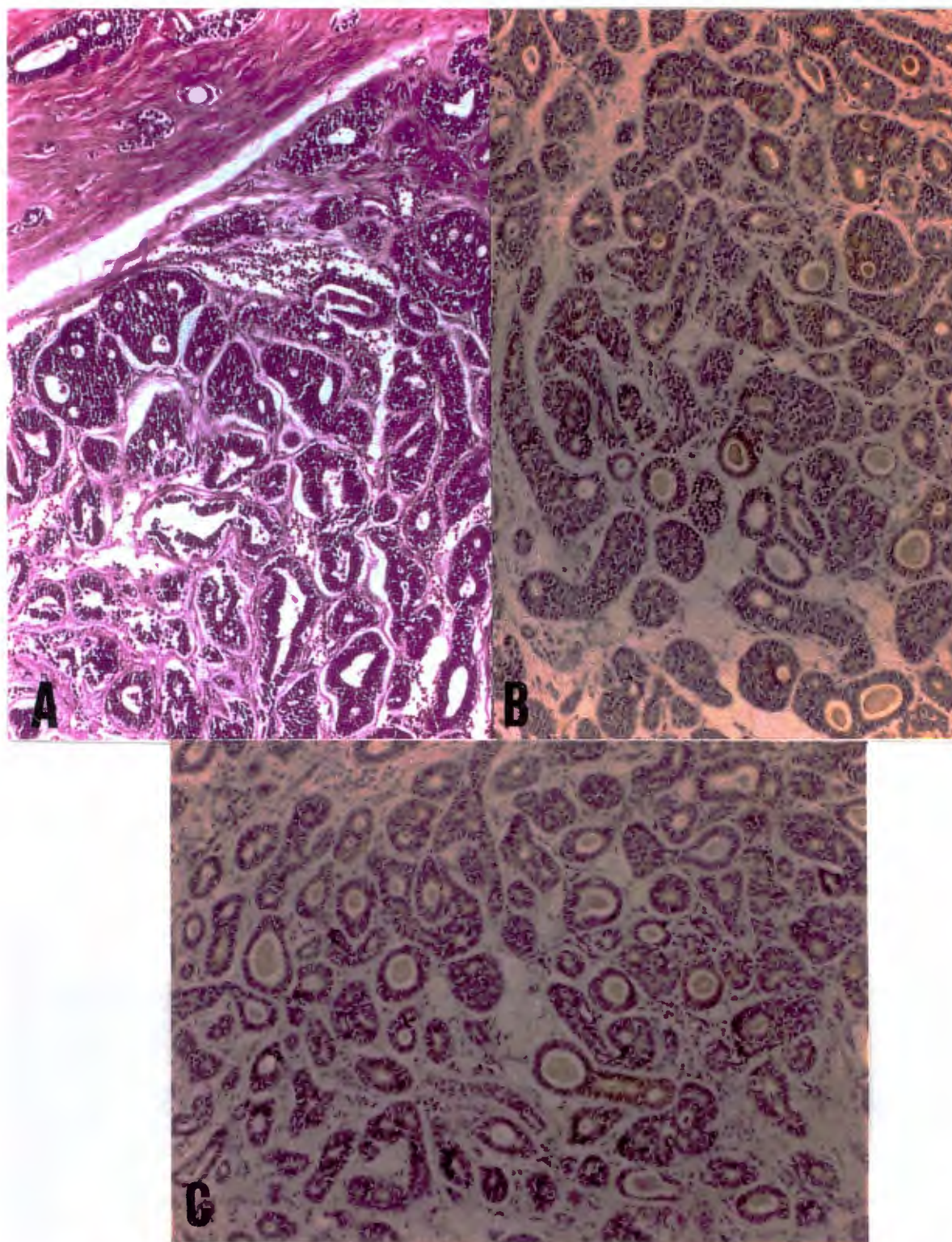


Fig. 6. Reacción de un carcinoma adenoideo quístico. Con (a) tinción de H-E se caracteriza por un patrón ductiforme (SS75317617), con los anticuerpos contra HMFG solamente reaccionó con (b) HMFG1 y (c) HMFG2 en forma leve (2+) sobre la superficie luminal.

c) Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado.

CASO S63126C2.

Tinción con Hematoxilina y Eosina. Fue observada una neoplasia maligna, compuesta por células de estirpe epitelial, de núcleo hipercromático, con alteraciones en la relación núcleo-citoplasma, hipercromatismo celular, discariosis, pérdida de la polaridad, aumento en el número de mitosis, mitosis anormales, pérdida de la adhesión. Las células forman cordones e islas. El estroma circundante es laxo, con zonas hialinas, mixoides y necrosis coagulativa y también grandes zonas hemorrágicas.

Tinción con Inmunoperoxidasa. Las células que caracterizan a ésta neoplasia no mostraron reacción con ningún anticuerpo, siendo negativo a los ocho anticuerpos monoclonales.

IV. DISCUSION

Los anticuerpos monoclonales para HMFG detectan carbohidratos terminales en las cadenas laterales de moléculas glucoproteícas de la membrana del glóbulo de grasa de la leche humana (Taylor-Papadimitriou et. al., 1981). Entre las glucoproteínas del HMFG, hay una de alto peso molecular parecida a las mucinas salivales. El anticuerpo designado HMFG1 detecta carbohidratos complejos en glucoproteínas largas, de alto peso molecular mientras que el designado HMFG2 detecta moléculas pequeñas de bajo peso molecular [donde la glucosilación puede ser incompleta y los residuos de ácidos siálicos más expuestos (Taylor-Papadimitriou, et al., 1981; Griffiths, et al., 1987)]. Los estudios realizados con los anticuerpos HMFG1 y HMFG2 en el epitelio de la glándula mamaria y en sus neoplasias, muestran importantes diferencias entre ambos anticuerpos monoclonales. HMFG2 se expresa fuertemente en los carcinomas ductales metastásicos, en tanto que HMFG1 reacciona más fuertemente con las células mamarias normales y en lactación (demostrado en células de cultivo) (Burchell et. al., 1983). Los determinantes sencillos en HMFG permiten un análisis más detallado del contorno de las células epiteliales mamarias malignas en comparación con su contraparte benigna (Taylor-Papadimitriou, et al., 1981). La expresión de los determinantes antigénicos por las células epiteliales mamarias normales y malignas cultivadas, muestran gran diversidad principalmente las expresadas con HMFG2 (Taylor-Papadimitriou et. al., 1981). Los anticuerpos contra HMFG son detectados en suero de pacientes con cáncer de glándula mamaria (Ashorn et. al., 1988; Cooper et. al., 1989; Ceriani et. al., 1990) y en pacientes con cáncer de ovario (Ashorn et al., 1988). También son utilizados en inmunocentigrafía (Burchell et. al., 1984), en la localización de tumores en pacientes con Cáncer (Griffiths et. al., 1986) y en el diagnóstico y pronóstico del Cáncer (Wrba et al., 1988).

Los anticuerpos monoclonales LBL1-LBL6 son utilizados en contra de las membranas de HMFG, detectan glucoproteínas largas unidas a moléculas de glucoproteínas sencillas de la membrana del glóbulo de grasa de la leche humana (PAS-O), el cual es un antígeno de alta diferenciación en la superficie de la célula epitelial normal de la glándula mamaria en lactación y también es establecida en la superficie de muchos tumores mamarios y líneas celulares de carcinomas mamarios. Un rasgo característico e importante de estas células que expresan PAS-O es la heterogeneidad de célula a célula con respecto a la presencia o ausencia de la molécula (Moss et al., 1988).

En general se observó que los anticuerpos HMFG 1 y HMFG2, se expresan principalmente sobre el sistema de conductos y con mayor intensidad en las glándulas submandibulares (Tabla 1) que en las glándulas parótida y labial (Tablas 2 y 3), mostrando mayor reacción en la superficie luminal, observándose la reacción en algunos casos en forma heterogénea, solo una glándula submandibular mostró reacción con HMFG1 sobre una pequeña proporción (10%) de los acinos serosos (Tabla 1).

Entre el panel de anticuerpos monoclonales LBL, LBL1 muestra leve reacción con los conductos de la glándula parótida (Tabla 2). LBL1, LBL2 y LBL3 mostraron reacción por los acinos serosos de todas las glándulas salivales normales (Tablas 1, 2 y 3), en mayor proporción e intensidad sobre los acinos mucosos especialmente de las glándulas labiales (Tabla 3).

LBL4 y LBL6 mostraron reacción en los acinos serosos de las glándulas labiales (Tabla 3). Esta variación en la reacción es probablemente debida a la producción de mucinas de diferentes pesos moleculares entre las glándulas salivales mayores y menores.

A diferencia de lo observado en las glándulas salivales normales, es importante hacer notar, que dentro de las muestras de glándulas submandibulares normales, se estableció que cuatro de ellas, mostraban cambios sugestivos de lesiones pre-neoplásicas o neoplásicas en sitios de las glándulas, mostrando sobre esas áreas alteradas respuestas de diferente intensidad (3-4+) en su citoplasma y membrana celular de las células ductales (Tabla 4), en comparación con las glándulas salivales normales (Tablas 1, 2 y 3).

Esto sugeriría que estas alteraciones en el tejido glandular, dejan al descubierto determinantes antigénicos que normalmente están ocultos y que podría ser de utilidad en la diferenciación y desdiferenciación celular. La respuesta obtenida en las glándulas salivales alteradas con los anticuerpos LBL2 y LBL3 (Tabla 4) es similar a la observada en algunos adenomas pleomorfos (Tabla 5 y 6).

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 pleomorfos (tumores más comunes de las glándulas salivales) muestran gran variedad de patrones histológicos, lo cual es utilizado como características de diferenciación celular en las clasificaciones (Eversole, 1971; Thackray and Sobin, 1972; Work y Batsakis, 1977; Batsakis, 1980; Seifert et al., 1986; Seifert et al., 1990). En este estudio fué posible observar, que aquellos tumores con estructuras ductiformes bien definidas, mostraron una reacción más específica y consistente con la mayoría de los anticuerpos, principalmente con HMFG1, HMFG2, LBL1, LBL2 y LBL3 (Tablas 5 y 6). Aquellos adenomas pleomorfos con metaplasia escamosa que mostraban formación de perlas de queratina (3 tumores), su reacción fué con la mayoría de los anticuerpos, a diferencia de aquellos en los cuales la formación de perlas de queratina no era tan evidente (Tablas 7 y 8). Así como cada tumor muestra diferentes componentes histológicos, también mostraron intensidad variable en la reacción entre uno y otro anticuerpo (Tabla 10).

Esto puede sugerir que existe una diferenciación celular con funciones específicas de las células, como es la formación de ductos y perlas de queratina, y que posiblemente esta neoplasia se origine a partir de los conductos intercalares (Regezi, 1977; Batsakis, 1980; Seifert et al., 1986; Martínez-Madrigal y Micheau, 1989) ó bien podría ser originado del conducto excretor de las glándulas salivales.

Las células fusiformes que forma parte de los componentes principales de esta neoplasia, mostraron reacción en muy pocos de los tumores, siendo muy variable en proporción e intensidad (Tabla 9).

La variedad de células claras presentes en estos tumores (4 casos), mostraron reacción en menor proporción e intensidad con escasos anticuerpos monoclonales.

Por lo tanto en los adenomas pleomorfos podemos encontrar diferentes niveles de diferenciación y actividad celular, pudiendo ser detectados con estos anticuerpos. También se observó que aquellos adenomas pleomorfos en los cuales predomina el material condroide mostraron una reacción menor que en los cuales es menor la cantidad de dicho tejido o en los que abunda el estroma hialino.

Los Carcinomas mucoepidermoide de bajo grado de malignidad mostraron una respuesta casi uniforme con la mayoría

de los anticuerpos (de 7-8 anticuerpos), en tanto que los de grado intermedio mostraron variedad de reacción en intensidad y con los anticuerpos, principalmente con LBL4 y LBL6 (Tabla 11 y 12) que no mostraron reacción en las glándulas normales. En contraste, el Carcinoma mucoepidermoide de alto grado de malignidad solamente mostró una pequeña reacción con solo dos anticuerpos HMFG1-HMFG2 (Tabla 11 y 12).

Los Carcinomas adenoideo quístico y epidermoide que se caracterizan por su alto grado de malignidad y su rápida facilidad para dar metástasis no mostraron una afinidad específica por los anticuerpos. Solamente un carcinoma adenoideo quístico mostró una reacción leve a moderada (1-2+) con HMFG1 y HMFG2. El carcinoma epidermoide fué negativo con todos los anticuerpos.

Estos puntos son importantes de hacerse notar debido a que entre un paciente y otro existe diferencia en la respuesta inmunológica por su idiosincracia, edad, sexo etc., así como entre célula y célula existen diferencias en su fenotipo, aun procediendo de una misma célula progenitora, con el mismo genotipo, el cual puede variar en su expresión y de ahí la gran diversidad de respuesta a los patrones terapéuticos.

V. SUMMARY

The salivary glands play an important role in the health and disease of the oral cavity. They produce saliva which controls humidity, lubrication and pH balance in the mouth. Saliva maintains the integrity of the mucous membrane and teeth, ecological balance and remove debris. The manifestation of several lesions in the salivary glands as tumors or reactions can produce local or sometimes systemic alterations.

Benign or malignant tumors of the salivary glands are uncommon and their origin is uncertain. Using a panel of eight monoclonal antibodies to the human milk fat globule (HMFG) membrane, the aim of this study was to examine the structure of normal salivary glands and their tumors in detail, and to identify the origin of the tumors. A major tool that was used in the study was immunohistochemical technique.

The expression of human milk fat globule (HMFG) membrane antigens by salivary glands appeared to act as a marker of normal glands and their tumors. This finding is analogous to results of studies reported with mammary glands. The monoclonal antibodies to HMFG membrane antigens used in this study were HMFG1, HMFG2, LBL1-LBL6; they detect glycoproteins of high molecular weight. HMFG1 and HMFG2 were found to have a moderate reaction with the duct system of normal salivary glands, and a negative reaction with acinar cells. Of the LBL panel, LBL1-LBL3 had a reaction with acinar cells (serous and mucinous cells) and LBL4-LBL6 showed a negative reaction with the structures of almost all normal salivary glands (Tables 1, 2 and 3).

In the tumors studied, the reactivity of pleomorphic adenomas with HMFG1 and HMFG2 antibodies was moderate to very strong particularly in duct-like structures. HMFG1 reacted with eleven (64.7%) and HMFG2 with thirteen (76.5%) of a total of seventeen adenomas. The LBL panel reaction was different with each antibody. LBL1, LBL2 and LBL3 showed a light to very strong reactivity with a majority of the tumors [LBL1 with twelve (70.6%), LBL2 with nine (52.9%) and LBL3 with thirteen (76.5%) adenomas respectively (Table 9)]. In contrast LBL4, LBL5 and LBL6 had a light to strong reaction with fewer tumors [LBL4 with eight (47%), LBL5 with seven (41.2%) and LBL6 with seven (41.2%) adenomas respectively (Table 9)]. The spindle-shaped cells of a few tumors (2 to 5 tumors) displayed reactivity with almost all eight monoclonal antibodies (Table 10).

Of six mucoepidermoid carcinomas, one tumor showed reaction with all eight monoclonal antibodies, one with seven antibodies, one with HMFG1, HMFG2, LBL4 and LBL6, another only with HMFG1 and HMFG2, another with LBL1, LBL2 and LBL3, and the last tumor reacted only with LBL2. Importantly, the extent of immunoreactivity appeared to correlate with the extent of cell differentiation exhibited by the tumors (Tables 11 and 12).

Three adenoid cystic carcinoma were studied. Of these one reacted with both HMFG1 and HMFG2, another only with HMFG1 and the third with neither of the two monoclonal antibodies. The LBL panel also exhibited no reaction with any of the three carcinomas.

Only one epidermoid carcinoma was studied and it showed a negative reaction with all eight monoclonal antibodies.

In summary, of all of the tumors studied, the reactivity of the pleomorphic adenomas with the HMFG monoclonal antibodies was most extensive, although some components of mucoepidermoid and adenoid cystic carcinomas were also immunoreactive. In general, the most significant reaction observed in almost all tumors was with cell that form duct-like structures.

VI. CONCLUSIONES

Los anticuerpos monoclonales para HMFG, HMFG1 y HMFG2 mostraron una reacción más estable y consistente que los de la serie LBL que muestran variaciones en su reacción.

Los anticuerpos monoclonales para HMFG, HMFG1 y HMFG2 reaccionan específicamente con el sistema de conductos de las glándulas salivales normales.

Los anticuerpos monoclonales correspondientes al panel de LBL, LBL1, LBL2 y LBL3 inmunoreaccionan con las células acinares serosas y mucosas, predominando los cinos serosos sobre los mucosos.

Los anticuerpos LBL4, LBL5 y LBL6, no tienen un patrón de reacción bien definido en las glándulas salivales normales.

Los anticuerpos monoclonales para HMFG, reaccionan fuertemente con aquellas células que presentan alteraciones sugestivas como pre-neoplásicas.

Los anticuerpos monoclonales para HMFG reaccionan con las neoplasias bien diferenciadas, cuyas células cumplen con funciones definidas.

Los anticuerpos monoclonales HMFG1 y HMFG2 reaccionan con células tumorales que tienen semejanza con la célula que les dió origen en el adenoma pleomorfo (estructuras ductiformes y metaplasia escamosa provenientes de las células de los conductos), carcinoma mucoepidrmioide y carcinoma adenoideo quístico.

Los anticuerpos monoclonales LBL1, LBL2 y LBL3 mostraron inmunoreacción con la mayor parte de los adenomas pleomorfos.

VII. BIBLIOGRAFIA

Abaza, N.A.; El-Khashah, M.M. and Fahim, M.S. (1966). Adenoid cystic carcinoma (cylindroma) of the palate. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med.* 22(4), 429-439.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K and Watson, J.D. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Second Edition. Garland Publishing.

©
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, α_1 -antichymotrypsin, α_1 -antitrypsin and carcinoembryonic antigen. *Gustav Fisher Verlag, Stuttgart*. 292-296.

Aroni, K.; Fotiou, G.; Liossi, A.; Bazopoulou, E. and Kyrkou, K. (1991). Immunohistochemical study of four histologic types of parotid gland pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med.* 20, 37-40.

Ashorn, P.; Kallioniemi, A.P.; Hietanen, T.; Ashorn, R. and Krohn, K. (1988). Elevated serum HMFG antigen levels in breast and ovarian cancer patients measured with a sandwich ELISA. *Int. J. Cancer Supplement.* 2, 28-33.

Barnett, T.A.; Kapp, D.S. and Goffinet, D.R. (1990). Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: Management of recurrent, advanced, or persistent disease with hyperthermia and radiation therapy. *Cancer.* 65: 2648-2656.

Barnstable, C.J.; Bodmer, W.F.; Brown, G.; Galfre, G.; Milstein, C.; Williams, A.T. and Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell.* 14 (May), 9-20.

Batsakis, J.G. (1980). Salivary gland neoplasia: An outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med.* 49(3), 229-232.

Blitzer, A. (1987). Inflammatory and obstructive disorders of salivary glands. *J Dent Res.* 66 (Spec Iss), 675-679.

Bullerdiek, J.; Takla, G.; Bartnitzke, S.; Brandt, G.; Chilla, R. and Hanbrich, J. (1989). Relationship of cytogenetic subtypes of salivary gland pleomorphic adenomas with patient age and histologic type. *Cancer*. 64(4), 876-880.

Burchell, J.; Durbin, H. and Taylor-Papadimitriou, J. (1983). Complexity of expression of antigenic determinants, recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2, in normal and malignant human mammary epithelial cells. *J of Immunology*. 131(1), 508-513.

Burchell, J.; Taylor-Papadimitriou, J.; Granowska, M. and Britton, Ph. (1984). Monoclonal antibodies for succesful tumour imaging. *Behring Inst. Mitt. No. 74*, 87-93.

Caselitz, J.; Becker, J. Seifert, G.; Weber, K. and Osborn. (1984). Coexpression of keratin and vimentin filaments in adenoid cystic carcinomas of salivary glands. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 403: 337-344.

Caselitz, J.;Schulze, I. and Seifert, G. (1986). Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 15, 308-318.

Castle, J.D.; Arvan, P. and Cameron (1987).. Protein production and secretion in exocrine cells. *J Dent Res*. 66 (Spec Iss), 633-637.

Chomette, G.P.; Auriol, M.M.; Labrouse, F. and Vaillant, J.M. (1991). Mucoepidermoid tumors of salivary glands: histoprognotic value of NORs stained with AgNOR technique. *J Oral Pathol Med*. 20, 130-132.

Ceriani, R.L.; Blank, E.W.; Rosenbaum, E.H.; Zeev, D.B.; Lowitz, R.S.; Johansen, L. and Trujillo T. (1990). Diagnostic ability of different human milk fat globule antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 15:161-174.

Cohen, R.E.; Aguirre, A.; Neiders, M.E.; Levine, M.J.; Jones, P.C.; Reddy, M.S. and Haar, J.G. (1990). Immunohistochemistry of high molecular-weight human salivary mucin. *Arch Oral Biol*. 35(2), 127-136.

Cooper, E.H.; Forbes, M.A.; Hancock, A.K.; Price, J.J. and Parker, D. (1989). An evaluation of mucin-like carcinoma associated antigen (MCA) in breast cancer. *Br. J. Cancer*. 59, 797-800.

Dardick, I.; van Nostrand, A.W.P. and Phillips, M.J. (1982). Histogenesis of salivary gland pleomorphic adenoma (mixed tumor) with an evaluation of the role of the 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.

Dardick, I.; van Nostrand, P.A.W.; Rippstein, P.; Skimming, L.; Hoppe, D. and Dairkee, Sh. H. (1987). Characterization of epimyoepithelial islands in benign lymphoepithelial lesions of major salivary gland: An immunohistochemical and ultrastructural study. Head and Neck Surgery. 10, 168-178.

Devlin, J.J.; Panganiban, L.C. and Devlin, P.E. (1990). Random peptide libraries; A source of specific protein binding molecules. Science. 249, 404-406.

Eneroth, C.M. (1971). Salivary gland tumors in the parotid gland, submandibular gland and the palate region. Cancer. 27 (June), 1415-1418.

Eveson, J.W. and Cawson, R.A. (1985). Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. J Pathol. 146, 51-58.

Eversole, L.R. (1971). Histogenic classification of salivary tumors. Arch Pathol. 92 (December), 433-443.

Ferguson, D.B. (1991). Genetic control and structure of the proline-rich proteins of human saliva. Edited by Ferguson D.B.: Aspects of Oral Molecular Biology Front Oral Physiol Basel, Karger, vol. 8, pp 95-116.

Forman, G.H. (1970). Adenoid cystic carcinoma of the floor of the mouth presenting by metastasis. Oral Surg Oral Pathol Oral Med. 29(1), 1-7.

Gardner, D.G. and Daley, T.D. (1983). The use of the terms monomorphic adenoma, basal cell adenoma, and canalicular adenoma as applied to salivary gland tumors. Oral Surg Oral Pathol Oral Med. 56(6), 608-615.

Garret, J.R. and Emmelin, N. (1979). Activities of salivary myoepithelial cells. A review. *Medical Biology*. 57, 1-28.

Gendler, S.J.; Burchell, J.; Duhig, T.; Lamport, D.; White, R.; Parker, M. and Taylor-Papadimitriou, J. (1987). Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Biochemistry*. 84, 6060-6064.

Griffiths, A.B.; Padmanabhan, N.; Shepherd, Ph.; Lazarus, C.; Maisey, M., Fentiman, I.; Rubens, R. and Taylor-Papadimitriou, J. (1986). Monoclonal antibody HMFG2 retains activity in vivo and binds to high molecular weight components expressed by metastatic breast cancers. *Mol. Biol. Med.* 3, 425-435.

Griffiths, A.H.; Burchell, J.; Gendler, S.; Lewis, A.; Blight, K.; Tilly, R. and Taylor-Papadimitrou, J. (1987). Immunological analysis of mucin molecules expressed by normal and malignant mammary apithelial cells. *Int J Cancer*. 40, 319-327.

Hageman, P.H.; Van Den Tweel, J.; Hilgers, J.; Hilkens, J.; Petersen, H.; Delemarre, J.; Van Den Valk, M.; Van Doorneward, G.; Atsma, D. and Schol, D. (1983). Sweat glands and salivary glands as model system for the characterization of monoclonal antibodies against differentiation antigens of the human mammary glands. *Prot of the Biol Fluids*. 1009-1012.

Hayashi, Y.; Kasashima, Ch.; Takemura, T. and Hirokawa, K. (1989). Ontogenic development of the secretory immune system in human fetal salivary glands. *Pathol Immunopathol Res.* 8, 314-320.

Hilkens, J.; Buijs, F.; Hilgers, J.; Hageman, Ph.; Calafat, J.; Sonnenberg, A. and Van Der Valk, M. (1984). Monoclonal antibodies against human milk-fat-globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *Int J Cancer*. 34, 197-206.

Huber, R. (1986). Structural basis for antigen-antibody recognition. *Science*. 233, 702-703.

Hunkapiller, T. and Hood, L. (1986). The growing immunoglobulin gene superfamily. *Nature*. 323 (September), 15-16.

Hurrell, J.G.R. (1982). Monoclonal hybridoma antibodies: Techniques and Applications (CRC Press Inc. Florida).

Huse, W.D.; Sastry, L.; Iverson, Sh. A.; Kang, A.S.; Alting-Mees, M.; Burton, D.R.; Benkovic, S.J. and Lerner, R.A. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*. 246 (December), 1275-1281.

Hybridoma Techniques. EMBO, SKMB Course 1980. Basel Cold Spring Harbor Laboratory.

Isacsson, G. and Shear. (1983). Intraoral salivary gland tumours: A retrospective study of 201 cases. *J Oral Pathol*. 12,57-62.

Jones, J.L. and Walker, R.A. (1987). The assessment of in vitro modulation of milk fat globule membrane expression by human breast carcinoma. *J Pathol*. 153, 51-60.

Kahn, H.J.; Baumal, R.; Marks, A.; Dardick, I. and van Nostrand, P.A.W. (1985). Myoepithelial cells in salivary gland tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 109 (February), 190-195.

Kakizawa, T.; Noma, H. and Omori, K. (1973). The evaluation of secretory IgA in human saliva. *Bull Tokyo Dent Coll*. 14(3), 125-139.

Kawagishi, S.; Fahim, R.E.F.; Wong, K.H. and Bennick, A. (1990). Purification and characterization of subunits of a high molecular weight human salivary mucin.

Kennett, R.H.; Dennis, K.A.; Tung, A.S. and Klinman, N.R. (1978). Hybrid plasmacytoma production: fusions with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 81, 71-91.

Kennett, R.H. (1979). Monoclonal antibodies. Hybrid myelomas- A revolution in serology and immunogenetics. *Am J 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.; Hengartner, H. and Shulman, M.J. (1978). Immunoglobulin production by lymphocyte hybridomas. *Eur J Immunol*. 8, 82-88.

Köhler, G. (1986). Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Science*. 233, 1281-1286.

Kraus, F.W. and Konno, J. (1963). Antibodies in saliva. *Annals New York Academy of Science*

Kraus, F.W. and Konno, J. (1965). The salivary secretion of antibody. *Ala J Med Sci*. 2(10) Jan, 15-22.

Levine, J.; Krutchkoff, D.J. and Eisenberg, E. (1981). Monomorphic adenoma of minor salivary glands: A reappraisal and report of nine new cases. *J Oral Surgery*. 39 (February), 101-107.

Levine, M.J.; Jones, P.C.; Loomis, R.E.; Reddy, M.S.; Al-Hashimi, I.; Bergey, E.J.; Bradway, S.D.; Cohen, R.E. and Tabak, L.A. (1987). Functions of human saliva and salivary mucins: An overview in: *Oral Mucosal Disease: Biology, Etiology and Therapy* (Edited by Mackenzie, I.C., Squier, C.A. and Dabelsteen, E.) pp 24-27.

Line, S.R.P.; Torloni, H. and Junqueira, L.C.U. (1989). Diversity of collagen expression in the pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Virchows A Cell Pathol*. 414, 477-483.

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.

Luna, L.G. (1968). *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd Edn.

Mandel, I.D. and Wotman, . (1976). The salivary secretions in health and disease. *Oral Surg Rev*. 8, 25-47.

Mandel, I.D. (1987). The functions of saliva. *J Dent Res*. 66 (spec. iss.) 623-627.

Martinez-Madrigal, F. and Micheau, C. (1989). Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol*. 13(10), 879-899.

Martinez, J.R. (1987). Ion transport and water movement. *J Dent Res*. 66 (Spec Iss), 638-647.

Mason, D.K. and Chisholm, D.M. (1975). Salivary glands in health and disease. W.B. Saunders Company LTD pp 319.

Mather, I.H. and Keenan, T.W. (1983). Function of endomembranes and the cell surface in the secretion of organic milk constituents. *Biochem of Lactation*. 231-280.

Milstein, C. and Cuello, A.C. (1983). Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature*. 305(6), 537-540.

Mintz, G.A.; Abrams, A.M. and Melrose, R.J. (1982). Monomorphic adenomas of the major and minor salivary glands. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med*. 53(4), 375-385.

Mori, M.; Murase, N.; Hyun, K.H.; Sumitomo, Sh. and Kawamura. (1985). Immunohistochemical studies of keratin distribution in salivary gland tumors. *Acta Histochem Cytochem*. 18(1), 21-32.

Mori, M.; Yamada, Y; Tanaka, T. and Okada, Y. (1990). Multiple expression of keratins, vimentin and S-100 protein in pleomorphic salivary adenomas. *Virchows Archiv B Cell Pathol*. 58, 435-444.

Morinaga, Sh.; Nakajima, T. and Shimosato, Y. (1987). Normal and neoplastic myoepithelial cells in salivary glands: An immunohistochemical study. *Hum Pathol*. 18, 1218-1226.

Moss, L.; Greenwalt, D.; Cullen, B.; Dihn, N.; Ranken, R. and Parry, G. (1988). Cell-to-cell heterogeneity in the expression of carbohydrate based epitopes of a mucin-type glycoprotein on the surface of human mammary carcinoma cells. *J Cell Physiol*. 137, 310-320.

Neville, B.W.; Damm, D.D.; Weir, J.C. and Fantasia, J.E. (1988). Labial salivary gland tumors. *Cancer*. 61, 2113-2116.

Newmark, P. (1985). The many merits of monoclonals. *Nature* 316 (August), 387.

Noda, Y.; Horike, H.; Watanabe, Y. 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.

Palmer, R.M. (1986). The identification of myoepithelial cells in human salivary glands. A review and comparison of light microscopical method. *J Oral Pathol Med*. 15, 221-229.

Parham, P. and Bodmer, W.F. (1978). Monoclonal antibody to a human histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 276, 397-398.

Pateisky, N.; Phillip, K.; Skodler, W.D.; Czerwenka, K.; Hamilton, G. and Burchell, J. (1985). Radioimmunoassay in patients with suspected ovarian cancer. *J. Nucl. Med.* 26, 1369-1376.

Patton, S. and Keenan, T.W. (1975). The milk fat globule membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. 415, 273-309.

Pulitzer, D.R. and Reitmeyer, W.J. (1987). Oncocytic pleomorphic adenoma of the parotid gland. *J Surg Oncology*. 34, 198-201.

Raybould, T.J.G. and Takahashi, M. (1988). Production of stable rabbit. mouse hybridomas that secrete rabbit mAb of defined specificity. *Science*. 240, 1788-1790.

Regezi, J.A. and Sciuba, J.J. (1989). *Oral Pathology: Clinical-Pathologic Correlations*. W.B. Saunders Company.

Regezi, J.A.; Zarbo, R.J. and Batsakis, J.G. (1991). Immunoprofile of mucoepidermoid carcinomas of minor salivary glands. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med*. 71, 189-192.

Regezi, J.A.; Zarbo, R.J.; Stewart, J.C.B. and Courtney, R.M. (1991). Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary gland. A comparative histologic and immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med*. 71, 469-475.

Reth, M.; Kelsoe, G. and Rajewsky, K. (1981). Idiotypic regulation by isologous monoclonal anti-idiotypic antibodies. *Nature*. 290, 257-259.

Roitt, I.; Brostoff, J. and Male, D. (1989). *Immunology* 2nd Edition. The C.V. Mosby Company.

Saku, T.; Okabe, H.; Yagi, Y.; Sato, E. and Tsuda, N. (1984). A comparative study on the immunolocalization of keratin and myosin in salivary gland tumors. *Acta Pathol Jpn*. 34(5), 1031-1040.

Saku, T.; Cheng, J.; Okabe, H. and Koyama, Z. (1990). Immunolocalization of basement membrane molecules in the stroma of salivary gland pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med*. 19, 208-214.

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 human salivary intercalated duct cell clone. *Cancer Research*. 47(15), 4453-4459.

Schwarz, W.H. (1987). The rheology of saliva. *J Dent Res*. 66 (Spec Iss), 660-664.

Seifert, G.; Miehlike, A.; Hanbrich, J. and Chilla, R. (1986). *Disease of the salivary glands*. Ed. George Thieme Verlag. Thieme Inc. Stuttgart 489 pp.

Seifert, G.; Brocheriou, C.; Cardesa, A. and Eveson, J.W. (1990). WHO International Histological Classification of Tumours. Tentative histological classification of salivary gland tumours. *Path Res Pract*. 186, 555-581.

Siar, C.H.; Ng, K.H. and Loh, H.T. (1987). Mucoepidermoid carcinoma with calcifications. *Oral Surg Oral Pathol Oral Med*. 63, 468-471.

Sikora, K. and Neville, A.M. (1982). Human monoclonal antibodies. *Nature*. 300 (November), 316.

Sumitomo, S.; Kumasa, Sh.; Iwui, Y. and Mori, M. (1986). Expression of involucrin in human salivary gland lesions and tumors. *Acta Histochem Cytochem*. 19(5), 581-587.

Swallow, D.M.; Gendler, S.; Griffiths, B.; Corney, G.; Taylor-Papadimitriou, J. and Bramwell, M.E. (1987). The human tumor-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM. *Nature*. 328, 82-84.

Tabak, L.A.; Levine, M.J.; Mandel, I.D. and Ellison, S.A. (1982). Role of the salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol Med*. 11, 1-17.

Tabak, L.A. (1991). Genetic control of salivary mucin formation. Edited by Ferguson D.B.: *Aspects of Oral Molecular Biology Front Oral Physiol Basel, Karger*, vol. 8, pp 77-94.

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 452pp.

Thackray, A.C. and Sobin, L.H. (1972). Histological Typing of Salivary Gland Tumours. World Health Organization. Geneva.

Ward, B.G. and Cruickshank, D.J. (1987). Circulating tumour-associated antigen detected by the monoclonal antibody HMFG-2 in human epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 39, 30-33.

Welsch, U.; Schumacher, U.; Bucheim, W.; Achinko, I.; Jenness, P. and Patton, S. (1990). Histochemical and biochemical observations on milk-fat-globule membranes from several mammalian species. *Acta Histochemical Suppl-Band XL*, S. 59-64.

Winter, G. and Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature*. 149 (January). 293-299.

Wooding, F.B.P. (1971). The structure of the milk fat globule membrane. *J. Ultrastructure Research*. 37, 388-400.

Work, W.P. and Batsakis, J.G. (1977). Classification of salivary gland diseases. Symposium on Salivary Gland Diseases. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 10(2), 287-296.

Wrba, F.; Reiner, A.; Markis-Ritzinger, E. and Holzner, J.H. (1988). Pronostic significance of immunohistochemical parameters in breast carcinoma. *Path. Res. Pract*. 183, 277-283.

Yamada, K.; Tanaka, T.; Mori, M.; Tsubura, A.; Morii, S.; Tsubine, M.; Ando, Ch. and Hilgers, J. (1989). Immunohistochemical expression of MAM-3 and MAM-6 antigens in salivary glands tumours. *Virchows Arch A Pathol Anat*. 415, 509-521.

Yamada, K.; Kunikata, M.; Mori, M.; Chomette, G.; Auriol, M.; Vaillant, J.M.; Tubura, A.; Morii, S. and Hilgers, J. (1991). Immunohistochemical localization of MAM-3 and MAM-6 antigens in adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 20, 57-63.

Yanagawa, T.; Hayashi, Y.; Nagamine, Sh.; Yoshida, H.; Yura, Y. and Sato, M. (1986). Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonal cells grown in athymic nude mice. *Virchows Arch [Cell Pathol]*. 51, 187-195.

Zajicek, G.; Schwartz-Arad, D.; Arber, N. and Michaeli, Y. (1989). The streaming of the submandibular gland II: parenchyma and stroma advance at the same velocity. Cell Tissue Kinet. 22, 343-347.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

EXPRESION DEL ANTIGENO HUMAN MILK FAT GLOBULE
[GLOBULO DE GRASA DE LA LECHE HUMANA (HMFG)]
COMO MARCADOR DEL COMPORTAMIENTO DE LAS
GLANDULAS SALIVALES NORMALES Y TUMORALES.

POR

DRA. SANTA PONCE BRAVO

1993

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

Nombre	y	Dirección
Fecha		

EXPRESION DEL ANTIGENO HUMAN MILK FAT GLOBULE [GLOBULO DE GRASA DE LA LECHE HUMANA (HMFG)] COMO MARCADOR DEL COMPORTAMIENTO DE LAS GLANDULAS SALIVALES NORMALES Y TUMORALES.

Aprobado por:

C.D. M.O. LUIS A. GAITAN CEPEDA

C.D. M.O. ELBA ROSA LEYVA HUERTA

C.D. M. Sc. ADALBERTO MOSQUEDA TAYLOR

C.D. M. Sc. D.O. JAVIER PORTILLA ROBERTSON

Director de la tesis. ELISA MARIA DURBAN Ph. D.
