



Estudio de la fluorescencia selectiva del estroma del adenoma pleomórfico salival con microscopio laser confocal en preparaciones coloreadas con Hematoxilina/ Eosina Y

Selective fluorescence study of salivary pleomorphic adenoma stroma with confocal laser microscope in stained slices with Hematoxylin / Eosine yellow

Gomez Rosso María A¹, Samar María E¹, Ávila Rodolfo E², Fernández Javier E¹

¹Departamento de Biología Bucal. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. samarcongreso@gmail.com

²Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

ABSTRACT

Introduction: The pleomorphic adenoma (PA) is a benign salivary gland tumor. It has ductal cells, myoepitheliocytes and a stroma with hyalinised, myxoid and chondroid metaplasia zones. On the other hand, the H/E gives an integral view of the tissue structure. Hematoxylin acts as a basic dye that stains violet. The eosin is an artificial acid dye that stains pink eosinophilic structures. The Eosina Y is strongly fluorescent, which allows to identify with the confocal laser microscope eosinophilic structures that are sometimes little visible to the photonic microscope. **Objective:** The PA chondroid stroma was analyzed with photonic and confocal scanning laser microscopes to demonstrate the value of the fluorescence emitted by Eosin Y in its structural description. **Material & Methods:** The histological examination of 10 PA parotid stained with H/E Y was performed. The images of the histological preparations were obtained by means of a photonic optical microscope and a FV1000 Olympus spectral confocal laser microscope, configured for the acquisition of orange / red fluorescence of the Eosin obtained between 555 to 655 nm. The eosin was excited at 543 nm using the He-Ne gas laser. **Results:** Photonic microscopy: The chondroid tumor areas presented a variable extension predominantly in only 4 cases. Histologically, these areas looked like immature hyaline cartilage, a chondroid type with an amorphous-like basophilic extracellular matrix and lacunae with round or oval chondroidocytes. * **Scanning confocal laser microscopy:** structures with strong red fluorescence were observed swollen in the extracellular matrix, the pericellular capsule of the chondroidocytes and the collagen of the territorial and inter-territorial matrices. **Conclusions:** The confocal laser scanning microscope allows visualizing structures in PA slides stained with H/E Y not visible to the clear field. We highlight the usefulness of H/E Y in histopathology both in photonic microscopy and confocal laser scanning microscopy.

KEY WORDS: photonic microscope, confocal laser scanning microscope, H/E, fluorescence, pleomorphic adenoma, stroma

RESUMEN

Introducción: El adenoma pleomórfico (AP) es un tumor benigno de glándulas salivales. Presenta células ductales y mioepiteliocitos y un estroma con zonas hialinizadas, mixoides y metaplasia condroide. Por otro lado, la H/E da una visión integral de la estructura tisular. La Hematoxilina actúa como colorante básica que tiñe de color violeta. La eosina es un colorante ácido artificial que tiñe de rosado estructuras eosinófilas. La Eosina Y es fuertemente fluorescente, lo que permite identificar con el microscopio laser confocal estructuras eosinófilas que a veces son poco visibles al microscopio fotónico. **Objetivo:** Se analizó con microscopía fotónica y laser confocal de barrido el estroma condroide del AP para demostrar el valor de la fluorescencia emitida por la Eosina Y en su descripción estructural. **Material y Métodos:** Se realizó el examen histológico de 10 AP de parótida coloreado con H/EY. Las imágenes de las preparaciones histológicas fueron obtenidas por medio de un microscopio óptico fotónico y un microscopio laser confocal espectral FV1000 Olympus, configurado para la adquisición de fluorescencia naranja/roja de la Eosina obtenida entre 555 a 655 nm. La eosina fue excitada a 543 nm empleando el láser gaseoso

de He-Ne. Resultados: Microscopía fotónica: Las áreas tumorales condroides presentaron una extensión variable predominando en sólo 4 casos. Histológicamente estas áreas tenían el aspecto de cartílago hialino inmaduro, tipo condroide, con una matriz extracelular basófila de apariencia amorfa y lagunas con condroidocitos redondos u ovals. Microscopía laser confocal de barrido: se observaron estructuras con fuerte fluorescencia roja sobresaliendo en la matriz extracelular, la cápsula pericelular de los condrocitos y el componente colágeno de las matrices territorial e interterritorial. Conclusiones: El microscopio confocal permite visualizar estructuras en preparaciones de AP coloreadas con H/EY no visibles con campo claro. Destacamos la utilidad de la H/EY en histopatología tanto en microscopía fotónica como confocal de barrido.

PALABRAS CLAVE: microscopia fotónica, microscopia confocal, H/E, fluorescencia, adenoma pleomórfico, estroma

Introducción

Los avances en medicina molecular han proporcionado una información valiosa sobre la patología tumoral como menciona Chan¹. Sin embargo, desde hace más de un siglo en la práctica diaria las biopsias se diagnostican por el examen histológico con la tinción de Hematoxilina y Eosina (H/E). Es una coloración topográfica que da una visión integral de la estructura de un tejido; complementada con marcaciones inmunohistoquímicas se obtiene una importante información para el tratamiento y pronóstico de los pacientes²⁻³.

La Hematoxilina es un compuesto que se obtiene del palo de Campeche (Haematoxylin campechiano), arbusto espinoso del orden de las leguminosas. Cuando es oxidada se convierte en una molécula coloreada que actúa como colorante básico que tiñe de color violeta. La eosina es un colorante ácido artificial que tiñe de color rosado a las estructuras eosinófilas⁴⁻⁵.

La Eosina Y es un colorante xanténico fuertemente fluorescente que tiñe fibras colágenas, miocitos, mitocondrias y oncocitos entre otras estructuras eosinófilas⁶.

Por otro lado, el adenoma pleomórfico (AP) es un tumor benigno de glándulas salivales. Presenta células ductales y mioepiteliocitos y un estroma con zonas hialinizadas, mixoides y metaplasia condroide⁷.

Basándonos en la propiedad autofluorescente de la Eosina Y, que permite identificar con el microscopio laser confocal estructuras eosinófilas que a veces son poco visibles al microscopio fotónico, analizamos con microscopía fotónica y laser confocal de barrido las áreas de metaplasia condroide en el estroma del AP para

demostrar el valor de la fluorescencia emitida por la Eosina Y en su descripción estructural.

Material y métodos

Se realizó el examen histológico de las piezas quirúrgicas correspondientes a 10 casos de adenoma pleomórfico (ICD-O-Code 8940/0-International Classification of Diseases for Oncology) de glándula parótida, procesadas según la técnica de inclusión en parafina⁸.

Los cortes histológicos seriados, de 4 µm de espesor, se colorearon con Hematoxilina/Eosina Y se revisaron según la última clasificación de la OMS, correspondiente al año 2017⁸.

Las imágenes de las preparaciones histológicas fueron obtenidas por medio de un microscopio óptico de campo claro o fotónico y un microscopio laser confocal. Este microscopio combina partes de un microscopio óptico, al que se adapta un equipo fluorescente, con un sistema de barrido en el que se utiliza un rayo láser. El rayo láser es fuertemente convergente, lo que permite elegir un plano de iluminación de poco espesor. Un sistema de espejos mueve el rayo láser a través de ese plano de la muestra, iluminando un solo punto por vez, y un detector (a través de un orificio confocal) selecciona sólo la fluorescencia emitida en ese plano, eliminando la luz que trae información de niveles superiores o inferiores. Por medio de una computadora se registran los datos y se obtiene así una "sección óptica" muy delgada, que aparece como una imagen bidimensional en un monitor de alta resolución. Este microscopio detecta compuestos autofluorescentes o inmunomarcados⁴.

En la presente investigación se utilizó el microscopio confocal espectral FV1000 (Olympus, Japan) perteneciente al Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), configurado para la adquisición de la fluorescencia naranja/roja de la Eosina obtenida entre los 555 a los 655 nm. La eosina fue excitada a 543 nm empleando el láser gaseoso de He-Ne. Las imágenes de 1024x1024 pixeles fueron obtenidas con las lentes objetivo de 20 y 60X PLAPON con una resolución del pixel representando unos 100nm de la muestra y una velocidad de barrido de 10µs/pixel. El mismo laser fue utilizado para adquirir la imagen de transmisión del mismo campo de la imagen de fluorescencia.

Comité de ética

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina (Registro 188/14).

RESULTADOS

Microscopía fotónica

Estos tumores desarrollaban una amplia gama de características histológicas. El componente epitelial se configuraba en formas glandulares, túbulos, bandas y láminas sólidas. Se agregaban tejido mixoide, metaplasia condroide, tejido hialino y a veces adiposo, óseo y nidos de sebocitos.

Las áreas tumorales condroides presentaron una extensión variable predominando en sólo 4 casos. Histológicamente estas áreas tenían el aspecto de cartílago hialino inmaduro, tipo condroide, con una matriz extracelular basófila de apariencia amorfa y lagunas escasas con condroidocitos redondos u ovales. (Figura 1).

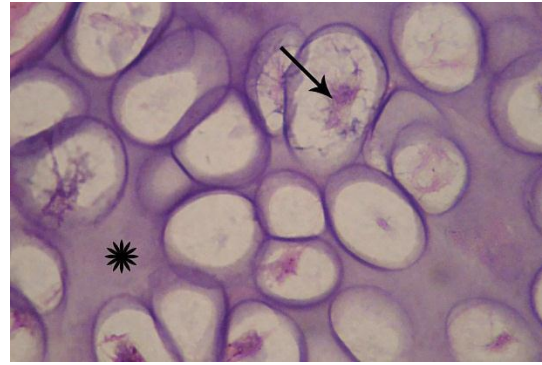


Figura 1: Adenoma pleomórfico. Estroma condroide. Se señalan los condroidocitos (flecha) y la matriz extracelular basófila de aspecto amorfo (asterisco). H/E. Objetivo 40 x

Microscopía láser confocal de barrido

A diferencia de las imágenes observadas con el microscopio fotónico se destacaban estructuras con fuerte fluorescencia roja, sobresaliendo en la matriz extracelular, la cápsula pericelular de los condroidocitos y el componente colágeno de las matrices territorial e interterritorial (Figuras 2A y B; 3A y B).

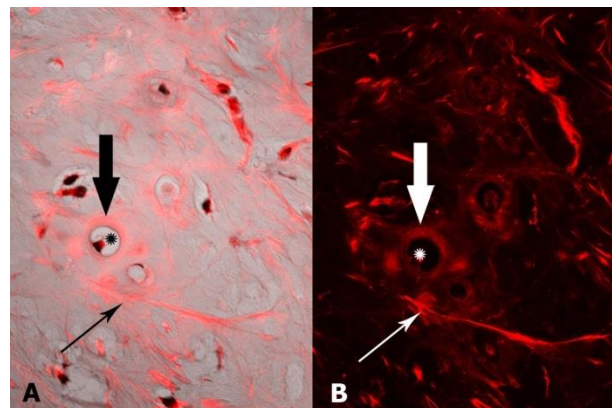


Figura 2: Adenoma pleomórfico. Estroma condroide. A: Superposición de la imagen de transmisión y de la imagen de fluorescencia. Figura B: Imagen de fluorescencia. Condroidocitos (asterisco). Componente colágeno de las matrices territorial (flecha gruesa) e interterritorial (flecha fina). H/E. Microscopio laser confocal fv1000 de barrido. Objetivo 20x

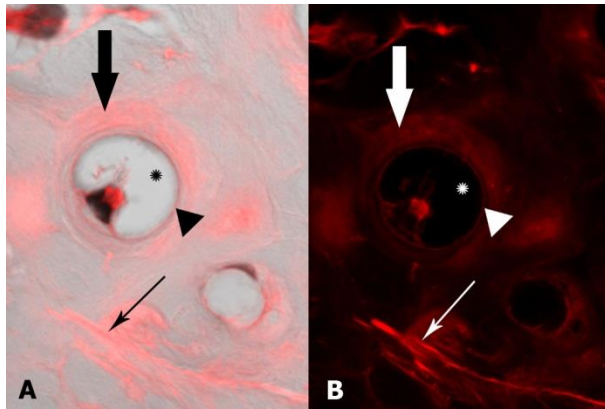


Figura 3: Adenoma pleomórfico. Estroma condroide. **A:** Superposición de la imagen de transmisión y de la imagen de fluorescencia. **B:** Imagen de fluorescencia (Imágenes a mayor aumento de las Figuras 2A y B). Condroidocitos (asterisco). Cápsula pericelular (cabeza de flecha). Componente colágeno de las matrices territorial (flecha gruesa) e interterritorial (flecha fina). H/E. Microscopio laser confocal fv1000 de barrido. Objetivo 60x.

Discusión

Sobre las bases de su apariencia histológica y la proporción relativa entre el componente epitelial y el estroma, Seifert et al clasificaron al adenoma pleomórfico en cuatro subtipos: Subtipo I, con 30 a 50% de estroma tumoral; Subtipo II, con 80% de estroma tumoral; Subtipo III, con 20 a 30% de estroma tumoral y Subtipo IV con escaso desarrollo estromal pero con mayor desarrollo de diferenciación epitelial⁹.

El estroma puede presentar gran diversidad morfológica, con elementos mixomatosos o mixocondroides, condroides, adiposos, osteoides o hialinizados⁹⁻¹⁰. El estroma condroide presenta características de un cartílago hialino atípico por lo que se considera como una metaplasia condroide. El estroma mixoide es semejante al tejido conectivo mucoide del cordón umbilical en tanto que el estroma mixocondroide está constituido por áreas condroides y mixoides. Por último, el estroma mucoide contiene glucosaminoglucanos ácidos y proteínas⁴.

Las preparaciones histológicas de este trabajo, coloreadas con H/E Y, se estudiaron con microscopio óptico fotónico y microscopio laser confocal. En las imágenes histológicas observadas en el microscopio fotónico pueden aparecer por

debajo y por arriba del plano del foco, estructuras desenfocadas cuyos contornos interfieren con la imagen obtenida. El microscopio confocal nos permite eliminar a través de uno de sus diafragmas la luz que proviene de los planos superior e inferior, aumentando la claridad y definición de la imagen, con una resolución 30% superior a la del microscopio común.

Como se describe en la introducción, la eosina Y es un colorante xanténico con autofluorescencia espontánea que colorea los tejidos en la gama del rojo al rosado. Difunde con facilidad en las estructuras tisulares y por su carácter ácido este colorante es atraído hacia los radicales básicos presentes en las proteínas citoplasmáticas y tisulares¹¹.

Cuando se observa con microscopio óptico fotónico la matriz extracelular del cartílago hialino en preparaciones histológicas coloreadas con H/E, la misma tiene una apariencia amorfa ya que la sustancia fundamental y las fibrillas de colágeno que la constituyen poseen índices de refracción semejantes. Por lo tanto, las fibras quedan enmascaradas⁴. Por el contrario, se hacen evidentes en el microscopio confocal debido a las propiedades fluorescentes de la eosina Y¹¹.

Los resultados obtenidos confirman que con el microscopio laser confocal de barrido se pueden visualizar estructuras eosinofílicas en el estroma condroide del adenoma pleomórfico no visibles con microscopía fotónica o de campo claro. Además debemos reafirmar la utilidad de la H/E Y en histopatología tanto en microscopía fotónica como confocal de barrido.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado bajo el apoyo de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (proyecto SECYT-UNC Resolución 411/18).

Todos los autores declaran que no existen conflictos potenciales de interés con respecto a la autoría y / o publicación de este artículo.

All authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Referencias

1. Chan JKC. The wonderful colors of the Hematoxylin-Eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol* 2014; 22/1: 12-32.
2. Samar ME, Avila RE, Esteban Ruiz F. Técnicas histológicas. Fundamentos y aplicaciones. Córdoba: Editorial SeisC. 2004.
3. Lahiani A, Klaiman E, Grimm O. Enabling histopathological annotations on immunofluorescent images through virtualization of Hematoxylin and Eosin. *J Pathol Inform* 2018; 9: doi:10.4103/jpi.jpi_61_17.
4. Samar ME, Avila RE, Histología humana clínicamente orientada. Tejidos y sistemas. 5ª edición. Córdoba: Samar ediciones. 2016.
5. Hamid A, Saldar A, Maryam M, Amjard A, Azra J, Abid A. Eosin fluorescence: A diagnostic tool for quantification of liver injury. *Photodiag Photodynam Therapy* 2017; 19: 37-44.
6. Sánchez González J, Trejo Bahena NI, Vázquez Moctezul I, Martínez Martínez CM, Ortega Rangel JA. Fluorescencia de la eosina captada por microscopía confocal en cortes histológicos de piel. *Actas Dermatol* 2008; 7: 41-47.
7. Ellis GL, Auclair PL. Tumors of salivary glands. Washington, DC: American Registry of Pathology Armed Forces Institute of Pathology. 2008.
8. Organización Mundial de la Salud. WHO/IARC. Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. WHO. Lyon: Edited by El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Sliotweg PJ. 2017.
9. Samar ME, Avila RE. Tumores Epiteliales de Glándulas Salivales. Saarbrücken. Alemania: Editorial Académica Española. 2013.
10. Satpathy Y, Spadigam AE, Duphar A, Syed S. Epithelial and stromal patterns of pleomorphic adenoma of minor salivary glands: A histopathological and histochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol* 2014; 18: 379-385.
11. Amaina systems. La Eosina Y. <https://www.amaina.com/tinturas-y-compuestos/2179-tintura-eosina-y-25-ml-euromex-pb5283.html> (último acceso: 7 de agosto de 2019).

Corresponding to/Correspondencia a:

Dr. María Elena Samar.

Universidad Nacional de Córdoba,

Facultad de Odontología, Departamento de Biología Bucal

Haya de La Torre s/n Ciudad Universitaria, CP 5000,

Córdoba, Argentina.

Tel.: +54 351 4333032.

E-mail/Correo electrónico:samarcongreso@gmail.com