

Sialosis Parotídea Alcohólica: Estudio Estructural y Ultraestructural

Carmen Carda ⁽¹⁾, **Maria Elsa Gomez de Ferraris** ⁽²⁾, **Adriana Arriaga** ⁽³⁾, **Miriam Carranza** ⁽³⁾, **Amando Peydró** ⁽⁴⁾

(1) Profesora Titular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, España

(2) Catedrática de Histología y Embriología, Directora del Departamento de Biología Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

(3) Docente de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

(4) Catedrático, Departamento de Patología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, España

Correspondencia:

Dra. Carmen Carda:

Departamento de Patología, Facultad de Medicina y Odontología;

Universidad de Valencia. Avda. Blasco Ibañez, 17 46010 Valencia, España.

Email: carmen.carda@uv.es

Recibido: 26-10-2002 Aceptado: 12-01-2003

Carda C, Gomez de Ferraris ME, Arriaga A, Carranza M, Peydró A.
Sialosis Parotídea Alcohólica: Estudio Estructural y Ultraestructural .
Med Oral 2004;9:24-32.
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1137 - 2834

RESUMEN

Objetivos: El propósito del presente trabajo fue establecer posibles diferencias histopatológicas entre los estadios iniciales y terminales de la sialosis alcohólica, patología que generalmente involucra hipertrofia parotídea y afecta estructuralmente en diverso grado a las demás glándulas salivales.

Diseño del estudio: se analizaron y compararon las modificaciones estructurales y ultraestructurales de glándulas parótidas provenientes de: A) biopsias de alcohólicos crónicos con diagnóstico clínico de cirrosis hepática, de las que una fracción fue procesada para microscopía óptica (MO) y otra fracción fue fijada en glutaraldehído y procesada para microscopía electrónica de transmisión (MET) Jeol JEM 1010 B) autopsias de individuos fallecidos por cirrosis hepática alcohólica, procesadas para MO y re-procesadas posteriormente para MET. Una porción de glándula normal obtenida de material quirúrgico fue usada como control.

Resultados: Las alteraciones encontradas en las biopsias son considerablemente comparables a las modificaciones encontradas en las autopsias de alcohólicos, especialmente debido a la acumulación de gránulos secretorios de diferente tamaño, forma y electrodensidad, generalmente ocupando todo el citoplasma de las células acinares. En ambos tipos de muestras los ductos excretores se encontraban dilatados y el epitelio de los conductos estriados presentaba células claras y oscuras, con núcleos de aspecto y disposición irregular. Se observó asimismo moderada infiltración grasa en el estroma y leve edema periacinar. En las biopsias se observaron al MO y MET inclusiones lipídicas en las células acinares y ductales del parénquima glandular.

Conclusiones: Los resultados estructurales y ultraestructurales

encontrados en biopsias y autopsias de parótidas, ponen de manifiesto que las alteraciones ya están presentes en las glándulas salivales de alcohólicos crónicos antes de la etapa terminal de la cirrosis hepática. La dilatación de los lúmenes del sistema ductal podría ser la principal responsable de la hipertrofia glandular.

Palabras clave: *Parótida, modificaciones estructurales y ultraestructurales, sialosis, alcoholismo*

INTRODUCCION

El alcoholismo crónico es una de las causas etiológicas de sialosis, patología generalmente caracterizada por un agrandamiento bilateral, no neoplásico ni inflamatorio, de la glándula parotídea (1-3). La sialosis, sin embargo, puede tener diferentes orígenes, habiéndose descrito como consecuencia de trastornos hormonales, nutricionales o metabólicos, medicamentosos y neurohumorales (4- 6). Además el proceso no es exclusivo de la parótida sino que también afecta en diverso grado a las demás glándulas salivales mayores y menores (7-10).

La sialosis alcohólica generalmente involucra hipertrofia glandular producida bien por infiltración grasa o por hipertrofia acinar, existiendo autores que admiten la coexistencia de ambas modificaciones, mientras que otros niegan tal posibilidad (11, 12). El hecho es que no siempre en la sialosis se presenta la hipertrofia acinar, por lo que algunos autores centran su atención en la disfunción glandular. Esta se traduce por lo general en hipofunción salivar y xerostomía (5), sin embargo con sialoquímica se ha demostrado un mayor flujo de saliva parotídea estimulada en el grupo de pacientes cirróticos con

respecto a los controles, sin que existan diferencias entre los cirróticos alcohólicos y los otros tipos de cirrosis de etiología no alcohólica (13).

En las sialosis de origen alcohólico, un 60 % de los pacientes con daño hepático (cirrosis) presentan parotidomegalia (14, 15), observándose el agrandamiento glandular ya en las fases de pre-cirrosis, en un 12% de casos (16, 17).

En estudios previos de glándulas parótidas de individuos fallecidos por cirrosis hepática alcohólica (7, 8), describimos acúmulos heterogéneos de gránulos secretorios, de distintos tamaños, distribuidos irregularmente en todo el citoplasma de las células acinares, a diferencia de las glándulas serosas de von Ebner donde los gránulos eran más pequeños, homogéneos y de localización preferentemente en la región apical. Asimismo fueron muy evidentes las alteraciones a nivel del epitelio del sistema ductal. Los conductos estriados exhibían un epitelio de apariencia pseudoestratificada, con núcleos alargados de cromatina densa, junto a otros redondeados de cromatina laxa. En los conductos excretores se destacó el agrandamiento del calibre ductal, éstasis de material secretorio con células descamadas y una atrofia epitelial inmunohistoquímicamente heterogénea para las citoqueratinas.

La mayoría de los estudios histopatológicos referidos a la sialosis de parótida se han efectuado en muestras provenientes de autopsias humanas, donde los cambios estructurales descritos corresponden a la etapa terminal de esta patología, siendo muy escasos los que utilizaron biopsias (11). Con el propósito de establecer posibles diferencias histopatológicas en los estadios iniciales y terminales de la sialosis alcohólica, en el presente trabajo se analizaron y compararon las modificaciones estructurales y ultraestructurales de glándulas parótidas, tanto en biopsias de alcohólicos crónicos con cirrosis hepática, como en autopsias de individuos fallecidos por cirrosis hepática alcohólica.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó utilizando material biopsico de los archivos del Departamento de Patología de la Universidad de Valencia (España) y muestras de autopsias provenientes del Instituto Médico Forense de la Provincia de Córdoba (Argentina).

Se usaron 12 biopsias de glándulas parótidas procedentes de pacientes con diagnóstico clínico y anatomopatológico de cirrosis hepática de etiología alcohólica, con signos clínicos de hipertrofia glandular parotídea no inflamatoria. Se trataba de ocho varones y cuatro mujeres entre 35 a 74 años de edad. Parte del material biopsico fue fijada en formol a pH 7 e incluida en parafina para los estudios con microscopía óptica; otra parte fue fijada en glutaraldehído, postfijada en ácido ósmico e incluida en resina acrílica (Epon) para el estudio con microscopía electrónica. Se realizaron cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, para control con microscopio óptico y selección de las áreas más representativas. Los cortes ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y el análisis ultraestructural se realizó mediante un microscopio electrónico de transmisión (Jeol JEM 1010).

Se utilizó como control una porción de glándula normal, pro-

cedente de una parótida extirpada por indicación oncológica a una paciente de 60 años, la cual fue fijada de forma inmediata y procesada de manera similar.

Para el estudio comparativo se utilizaron 6 muestras de parótidas fijadas en formol a pH 7, procedentes de autopsias de individuos de 35 a 65 años de edad, fallecidos por cirrosis hepática alcohólica. Este material se procesó para su inclusión en parafina y posterior realización de técnicas de coloración H/E, PAS y Azul de Toluidina pH 3,8. A partir de los bloques de parafina previamente seleccionados mediante la observación de los preparados histológicos, se obtuvieron pequeñas porciones de parótida que se reutilizaron para el estudio con microscopía electrónica, realizando desparafinización, re-inclusión en resina plástica y demás pasos del procesamiento indicado.

RESULTADOS

Estudio de las biopsias parotídeas:

La microscopía óptica mostró la organización estructural de las glándulas en general bien conservada. La mayor parte de los lobulillos estaban constituidos por acinos serosos típicos, sin embargo en ciertas áreas se evidenciaron signos de hipertrofia acinar, con grandes células repletas de gránulos secretorios ampliamente distribuidos por todo el citoplasma. Los cortes semifinos permitieron distinguir pequeñas gotas lipídicas intracitoplasmáticas en las células del parénquima, especialmente a nivel acinar (Fig. 1).

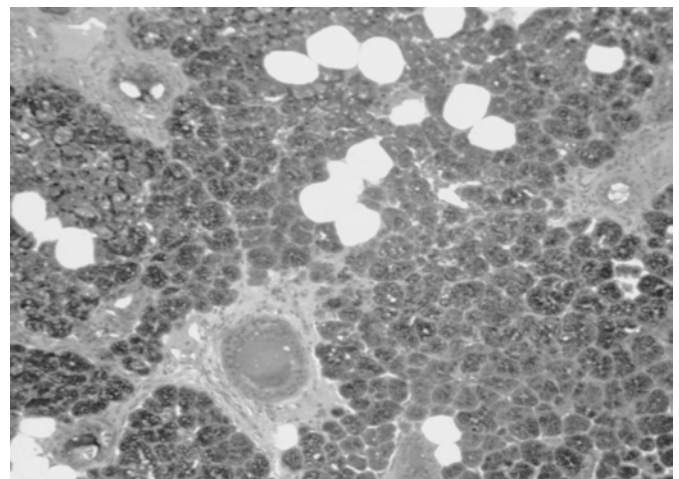


Fig. 1. Parénquima glandular que muestra infiltración grasa así como tabiques interlobulillares y conductos excretores (H-E 40X)

Glandular parenchyma showing adipose infiltration as well as interlobular walls and excretory ducts (H-E 40X).

En todas las glándulas estudiadas se observaron, en mayor o menor medida, células acinares de apariencia mucosa. Histoquímicamente el contenido de esas células presentó reacción positiva con PAS y leve metacromasia con Azul de Toluidina.

El sistema ductal estaba bien desarrollado, en algunos casos se identificó éstasis de material secretorio en el lumen de los conductos estriados y excretores.

El estroma presentaba una moderada infiltración grasa, representada por grandes adipocitos, y también existían focos linfocíticos aislados.

A nivel ultraestructural se observaron notorias modificaciones en el parénquima respecto a la normalidad, particularmente en las células acinares. Estas en general se caracterizaron por la acumulación de gránulos intracitoplasmáticos de diversa tipología en cuanto a forma, tamaño y electrodensidad (Fig. 2). Las células de los acinos serosos típicos mostraban su citoplasma cargado de gránulos electrodensos, de contorno circular o poliédrico debido a su agrupamiento, ocupando la totalidad del citoplasma, incluso la región basal donde el retículo endoplásmico aparecía bien desarrollado (Fig. 3 a). También en algunos acinos se identificaron gránulos con aspecto de grandes vesículas pálidas y con un centro de mayor electrodensidad. Asimismo se observó un tercer tipo de gránulos más grandes con contenido electrolúcido finamente fibrilar, con tendencia a coalescer y cuya apariencia era semejante a vesículas de tipo mucoso (Fig. 3b). En algunas muestras, ciertos acinos estaban totalmente constituídos por células de estas características.

Respecto al resto de las organelas se destacó la presencia de amplias cisternas del Golgi así como de lisosomas.

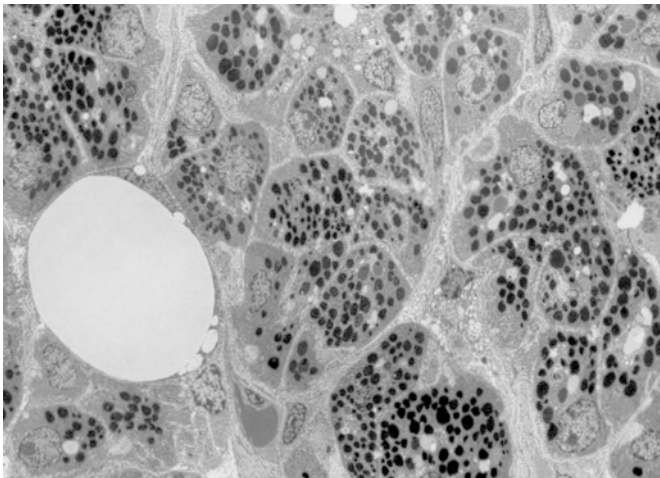


Fig. 2. Imagen ultraestructural en donde observamos la conservación general de la arquitectura de los acinos parotídeos y la existencia de adipocitos entre ellos (800X).

Ultrastructural image showing the general conservation of the structure of the parotid acini and the existence of adipocytes between them (800X).

Se encontraron además células acinares que exhibían núcleos de contorno irregular, con distinto grado de contenido heterocromático, mientras que otras células mostraban evidencias de alteración estructural, con núcleos picnóticos o en degeneración y citoplasma de mayor electrodensidad, con cisternas del retículo endoplásmico dilatadas y escasa o nula cantidad de gránulos.

Las inclusiones de lípidos, dispuestas en distintas regiones del citoplasma, se observaron prácticamente en la totalidad de las células acinares, identificándose acinos cuyas células estaban totalmente ocupadas por gotas lipídicas (Fig. 4).

Entre las células acinares eran frecuentes los canalículos

intercelulares extensos, con abundantes interdigitaciones. En algunos acinos eran particularmente llamativas las uniones desmosómicas en cremallera.

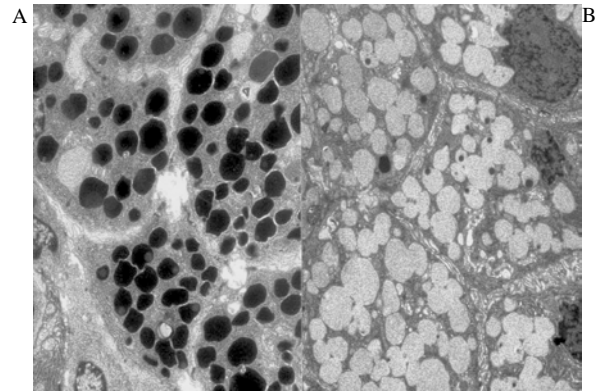


Fig. 3. A- Gránulos secretores de carácter seroso, ocupando la mayor parte del citoplasma celular (1500x) B- Gránulos secretores de baja electrodensidad compatibles con mucosecreción (1500X).

A Serosa type secretory granules, occupying the greater part of the cellular cytoplasm (1500X) B - Secretory granules of low electrodensity compatible with mucosecretion (1500X).

En la región basal de ciertos acinos se distinguieron células de aspecto indiferenciado, unidas por desmosomas a las células acinares vecinas, que se caracterizaron por su citoplasma más claro y escaso, con pocos orgánulos y sin gránulos de secreción. No se encontraron en ellas figuras mitóticas. En las áreas basales, tanto de los acinos como del inicio del sistema ductal, se destacaron por su notable grado de desarrollo las células mioepiteliales.

En algunas regiones glandulares existían acinos pequeños con aspecto infuncional de tipo atrófico. Asimismo de forma aislada se observaron células con evidente transformación oncocítica. En los ductos estriados se destacó la alternancia de células claras y oscuras, con núcleos atípicos, heterocromáticos, de contornos irregulares, ubicados a diferentes alturas.

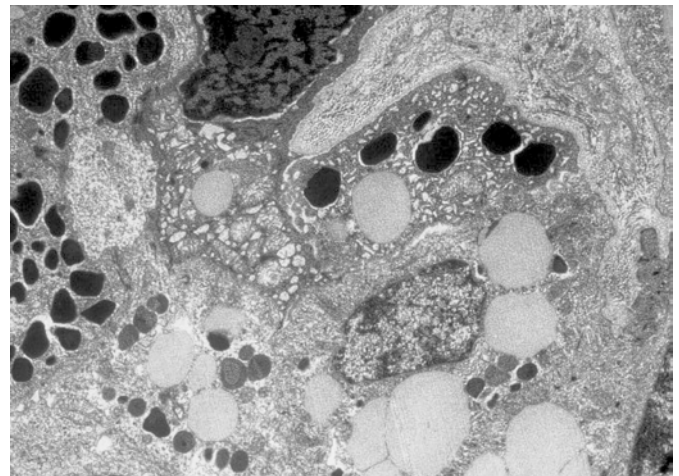


Fig. 4. Acumulo intracitoplásmico en una célula secretora de vacuolas de grasa (3000X).

Intracytoplasmic accumulation in the adipose vacuoles of a secretory cell (3000X).

Estas células contenían abundantes mitocondrias y algunas presentaban grandes cuerpos lisosomales heterogéneos, así como inclusiones lipídicas.

Las células de los conductos intercalares exhibían también algunas gotitas lipídicas.

El aspecto del estroma era normal en algunas regiones, apareciendo en otras un ligero edema, más llamativo en el área periacinar, además de cierto grado de fibrosis e infiltración grasa. Estudio del material procedente de autopsias:

A nivel de microscopía óptica la glándula parotídea presentaba acinos con acumulación de gránulos atípicos en cuanto a su tamaño y localización. Algunos sectores exhibían acinos de aspecto mucoso.

El epitelio de los ductos estriados mostraba una evidente heterogeneidad nuclear y pseudoestratificación (Fig. 4), mientras que en los conductos excretores se observaba una disposición epitelial biestratificada con moderada atrofia y acumulación de material secretorio en su amplia luz. En el estroma existía una moderada infiltración grasa y un leve edema periacinar.

El material analizado tras reinclusión para microscopía electrónica, mostró notables semejanzas con el material procedente de las biopsias, aunque con defectos de fijación debido a la utilización inicial de formol y al procesado previo de inclusión en parafina.

En las células acinares se encontraron acúmulos de gránulos electrodensos de distinto tamaño y dispuestos al azar por todo el citoplasma (Fig. 5). En ciertas áreas coexistían células glandulares cargadas de gránulos de baja electrodensidad, compatibles con material mucoso.

Las principales similitudes estructurales y ultraestructurales en biopsias y autopsias de parotídea alcohólica, se resumen en la Tabla 1.

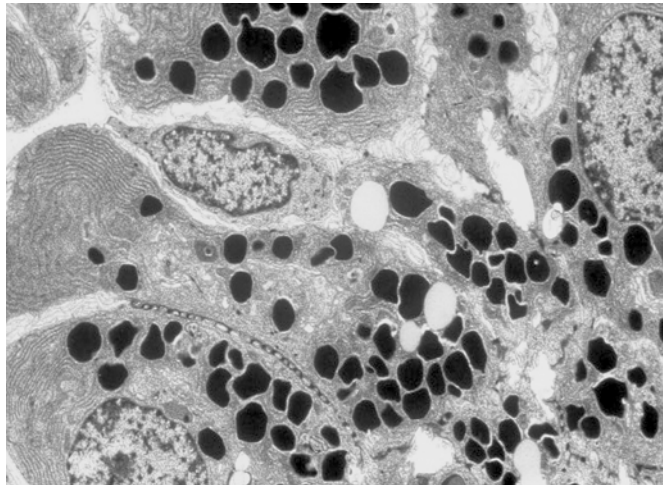


Fig. 5. Fotografía de campo del parénquima de una glándula parotídea procedente de autopsia y reincluida para estudio ultraestructural. En ella observamos la coexistencia en vecindad de secreción serosa, de alta densidad, y mucosa (800X). En detalle una típica célula serosa (1200X).

Photograph of the parenchymal field of a parotid gland from an autopsy, re-embedded for ultrastructural study. In this photo we can see the coexistence in proximity of high-density serosa secretion and mucosa (800X) In detail, a typical serosa cell (1200X).

	MUESTRAS DE BIOPSIAS	MUESTRAS DE AUTOPSIAS
<i>Células acinares: variedades</i>	Algunas con núcleos irregulares, otras con núcleos picnóticos o en degeneración. Citoplasmas de mayor electrodensidad. Células de aspecto mucoso. Células oncócicas aisladas	Células de aspecto mucoso
<i>Granulaciones</i>	Abundantes, de distintas formas, tamaños y electrodensidad. Gránulos electrodensos, electrolúcidos y con material finamente fibrilar	Abundantes, atípicos y heterogéneos. Acumulación de gránulos electrodensos de distinto tamaño y dispuestos al azar. Otros de baja electrodensidad, compatibles con material mucoso
<i>Ductos</i>	Dilatados con estasis de material secretorio	Ductos muy dilatados con estasis de material secretorio
<i>Epitelio ductal</i>	Células claras y oscuras. Núcleos atípicos, heterocromáticos, irregulares	Heterogeneidad nuclear. Pseudoestratificado. Moderada atrofia
<i>Estroma</i>	Moderada infiltración grasa, fibrosis y leve edema periacinar	Moderada infiltración grasa, fibrosis y leve edema periacinar

Tabla 1. Similitudes Estructurales y Ultraestructurales de la Parotídea Alcohólica en Biopsias y Autopsias.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La existencia de un incremento de tamaño en las glándulas salivares de origen no inflamatorio ni neoplásico, ha sido ampliamente estudiado y discutido tanto en relación a su patogenia estructural, como a la terminología a utilizar: sialosis o sialoadenosis. En este trabajo empleamos el término de sialosis para referirnos a esta patología, en concordancia con lo señalado por Marco et al. (12).

El hallazgo de sialosis parotídea en nuestros pacientes cirróticos alcohólicos, fue coherente con lo descrito por otros autores en cuanto a la edad de aparición, cincuenta años promedio, y a su distribución por igual en ambos sexos (18). Se ha sugerido que el tamaño de la parotidomegalia sería proporcional a la cantidad de consumo de alcohol (19).

Las alteraciones ultraestructurales observadas a nivel del parénquima glandular en el material de biopsias, fueron comparables a las modificaciones estructurales encontradas previamente en las glándulas parotídeas provenientes de autopsias de alcohólicos crónicos (7, 8), particularmente en lo que se refiere a acumulación de gránulos intracitoplasmáticos de forma y tamaño diverso, de distinta electrodensidad y ocupando en general la totalidad del citoplasma. Estos hallazgos se diferenciaron de lo citado por Gorlin y Goldman (19), quienes describen que los gránulos sólo se observan en las fases iniciales de esta patología y postulan que la acumulación se produciría por una alteración de la membrana, que inhibe la exocitosis. Por otra parte Neville (3) al igual que otros autores (6, 18) sugieren que el acúmulo de gránulos intracitoplasmáticos tendría lugar por una deficiencia funcional de la innervación autónoma de la glándula.

Con respecto a la existencia de acinos aislados de tipo mucoso que encontramos tanto en las fases preliminares como finales de la hepatopatía cirrótica, coincide con lo descrito por Rodrigo et al. (11) en biopsias de parotídea, quienes opinan que se produ-

ciría una transformación mucosa de esta glándula serosa pura en los pacientes con diagnóstico de cirrosis hepática. Gorlin y Goldman (19) citan que en biopsias de parótida con sialosis cirrótica las células acinares presentan citoplasmas "de claridad casi acuosa", característica que consideran como típica en esta variedad de patología.

Los hallazgos de dilataciones del sistema Golgiano y el acúmulo de lisosomas en las células acinares de biopsias de parótidas de alcohólicos, son compatibles con las descripciones de Tirapelli (16) en animales de experimentación, de la misma manera que las uniones desmosómicas en cremallera y las dilataciones del espacio intercelular a modo de canalículos con interdigitaciones. Las células acinares con evidentes muestras de alteración morfofuncional, así como los oncocitos en acinos y conductos pequeños, también han sido mencionados por Banderas et al. en parótidas de ratas sometidas al efecto del etanol (20).

Por otra parte, los estadios iniciales de la esteatosis hepática alcohólica se caracterizan por la presencia de inclusiones lipídicas en los hepatocitos, donde la acumulación de lípidos se produce por un trastorno del metabolismo de los ácidos grasos y de la liberación de lipoproteínas debido a una interferencia con la síntesis proteica por efecto del alcohol. La esteatosis hepática y la hepatitis alcohólica aguda o persistente, a menudo coexisten con la cirrosis (21). En este sentido, consideramos que el alcohol o sus metabolitos habrían provocado la formación de inclusiones lipídicas en las células acinares y ductales, observadas al MO y MET en las biopsias de parótida alcohólica, coincidiendo con lo señalado por Rodrigo et al. (11).

A diferencia de otros autores (11) que no encontraron alteraciones en el sistema ductal de las parótidas de pacientes cirróticos alcohólicos, observamos modificaciones en los conductos estriados de biopsias y autopsias, evidenciados a nivel de la microscopía electrónica y óptica, respectivamente. Además, estas muestras se caracterizaron principalmente por presentar conductos excretores muy dilatados y con éstasis de material secretorio.

Scott et al. (10) en sus estudios estructurales sobre glándulas salivares de pacientes cirróticos, no detectaron agrandamiento glandular ni hipertrofia acinar, a pesar de encontrar abundante infiltración adiposa en el estroma. Por el contrario, otros autores (1, 3, 22) citan que los acinos de las parótidas de alcohólicos están aumentados por la hipertrofia e incremento de la función acinar.

De acuerdo a nuestros resultados, el principal responsable del aumento de tamaño glandular sería la notable dilatación del lumen del sistema ductal y no el leve edema intersticial ni la mínima hipertrofia acinar encontrada. Tampoco se encontraron evidencias de procesos inflamatorios que pudieran justificar la hipertrofia parotídea.

Las modificaciones morfológicas en la parótida de alcohólicos crónicos podrían extrapolarse a la porción serosa de las glándulas salivales menores, ya que éstas muestran alteraciones en grado diverso, incluyendo cambios en la actividad transcripcional de sus células acinares y ductales, en los individuos fallecidos por cirrosis hepática alcohólica (7, 8, 23).

Estos hallazgos ponen de manifiesto que:

*Las alteraciones estructurales y ultraestructurales a nivel acinar y ductal están presentes en las glándulas parótidas de alcohólicos crónicos aún antes de la etapa terminal de cirrosis hepática alcohólica.

*El aspecto mucoso de algunas áreas de las parótidas a nivel ultraestructural, explicaría la heterogeneidad tintorial e histoquímica de las muestras observadas con microscopía óptica, y evidenciaría alteraciones morfofuncionales de las glándulas.

*Las modificaciones ultraestructurales nucleares de forma, tamaño y aspecto cromático de las células ductales, se corresponderían con los cambios estructurales observados previamente en parótidas de individuos fallecidos por cirrosis alcohólica.

ENGLISH

Alcoholic Parotid Sialosis: A Structural and Ultrastructural Study

CARDA C, GOMEZ DE FERRARIS ME, ARRIAGA A, CARRANZA M, PEYDRÓ A. ALCOHOLIC PAROTID SIALOSIS: A STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDY. *MED ORAL* 2004;9:24-32.

SUMMARY

Objectives: The purpose of this study is to demonstrate the histopathological differences between the initial and advanced stages of Alcoholic Sialosis, a pathology that generally involves parotid hypertrophy and structurally affects, to diverse degrees, the other salivary glands.

Study design: An analysis and comparison was carried out of the structural and ultrastructural modifications of the parotid glands from the hepatic biopsies of chronic alcoholics with clinical diagnosis of cirrhosis and from autopsies on individuals who had died from alcoholic hepatic cirrhosis. Various samples of normal gland obtained from surgical material were used as a control.

Results: The alterations found in the biopsies corresponded to the modifications discovered in the autopsies of alcoholics. Notable in both cases was the massive accumulation of secretory granules of different size, shape and electrodensity, which occupied the cytoplasm of the acinar cells. In both sample types the excretory ducts were enlarged and the epithelium of the striate ducts presented cells with nuclei and cytoplasm of irregular appearance and arrangement. A moderate adipose infiltration in the stroma and slight periacinar edema was also observed. The biopsies revealed, both at optical and electron microscopical levels, lipid inclusions in the acinar cells and the glandular parenchymal ducts.

Conclusions: The structural and ultrastructural findings of the

parotid biopsies and autopsies, clearly show that alterations are already present in the salivary glands of chronic alcoholics before the terminal phase of hepatic cirrhosis. The enlargement of the ductal system lumens could be the principal cause of glandular hypertrophy.

Key words: *Parotid, structural and ultrastructural modifications, sialosis, alcoholism.*

INTRODUCTION

Chronic alcoholism is one of the etiological causes of sialosis, a pathology generally characterised by a bilateral enlargement, neither neoplastic nor inflammatory, of the parotid gland (1-3). Sialosis, however, can have different origins, having been described as a consequence of hormonal, nutritional or metabolic disturbances, medicamentous or neurohumoral alterations (4-6). Furthermore, the process is not exclusive to the parotid, but also affects, to diverse degrees, the other larger and smaller salivary glands (7-10).

Alcoholic sialosis generally involves glandular hypertrophy, produced either by adipose infiltration or by acinar hypertrophy. There are authors who accept the coexistence of both modifications, while others deny such a possibility (11, 12). In fact acinar hypertrophy is not always present in sialosis, as a consequence some authors centre their attention on the glandular dysfunction. This dysfunction is generally manifested as salivary hypofunction and xerostomia (5), however, a greater flow of stimulated parotid saliva has been demonstrated by sialochemistry in the group of cirrhotic patients with respect to the controls, with no differences existing between the cirrhotic alcoholics and other types of cirrhosis of non-alcoholic etiology (13).

In sialosis of alcoholic origin, 60% of the patients with hepatic damage (cirrhosis) present parotidomegaly (14, 15), the glandular enlargement being observed already in the pre-cirrhotic phases in 12% of cases (16, 17).

In previous studies of parotid glands from individuals who had died of alcoholic hepatic cirrhosis (7, 8), we described heterogeneous accumulations of secretory granules of different sizes, irregularly distributed throughout the cytoplasm of the acinar cells, unlike the Von Ebner serosa glands, where the granules were smaller, homogeneous and preferentially located in the apical region. Likewise, the alterations at the epithelial level of the ductal system were highly evident. The striate ducts exhibited an epithelium of pseudostriated appearance, with elongated nuclei of dense chromatin, together with other nuclei surrounded by loose chromatin. In the excretory ducts, of note, was the increase in ductal diameter, the stasis of the secretory material with desquamated cells, and epithelial atrophy, immunohistochemically heterogeneous for cytokeratins.

The majority of histopathological studies referring to parotid sialosis have been undertaken using samples from human autopsies, where the structural changes described correspond to the terminal phase of this pathology. Cases in which biopsies have been used are very rare. With the aim of establishing possible histopathological differences between the initial and

terminal phases of alcoholic sialosis, the structural and ultrastructural modifications of the parotid gland were analysed and compared using both biopsies of chronic alcoholics with hepatic cirrhosis and autopsies of individuals who had died from alcoholic hepatic cirrhosis.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out with material from the archives of the Departamento de Patología de la Universidad de Valencia (España), and samples obtained from autopsies from the Instituto Médico Forense de la Provincia de Córdoba (Argentina). 12 biopsies of parotid glands were used from patients with clinical and anatomicopathological diagnosis of hepatic cirrhosis of alcoholic etiology, with clinical signs of non-inflammatory parotid gland hypertrophy. The cases consisted of 8 men and 4 women between 36 and 74 years of age. Part of the biopsy material was fixed in formol of pH 7 and embedded in paraffin for the optical microscope studies; another part was fixed in glutaraldehyde, post fixed in osmic acid and embedded in acrylic resin (Epon) for the electron microscope study. Semi-fine cuts stained with blue toluidine were made for the control and selection of the most representative areas. Ultrafine cuts were contrasted with uranyl acetate and lead citrate, the ultrastructural analysis being carried out with an electron transmission microscope (Joel JEM 1010).

As a control, a portion of normal gland from a parotid removed for oncological reasons from a 60-year-old patient was used. This sample was fixed immediately and processed in a similar manner.

For the comparative study, 6 samples of parotid gland fixed in formal at pH 7 were used, coming from autopsies of individuals of 35 to 65 years of age, who had died of alcoholic hepatic cirrhosis. This material was processed for embedding in paraffin and later processing with the coloration techniques H-E, PAS and blue toluidine pH 3.8. Small portions of parotid were obtained from the previously selected paraffin blocks, which were then reutilized for the study with electron microscope, carrying out deparaffinisation, re-embedding in acrylic resin and the other steps of the above described processes.

RESULTS

Study of the parotid biopsies:

The optical microscopy revealed the structural organisation of the glands to be generally well preserved. The majority of the lobulets were composed of typical serous acini; however, in certain areas signs of acinar hypertrophy were evident, with large cells full of secretory granules widely distributed throughout the cytoplasm. We were able to distinguish large infiltrated adipocytes as well as small intracytoplasmatic lipid drops in the parenchymal cells, especially at acinar level.

In all the glands studied, acinar cells of mucosal appearance were observed, combined, to a greater or lesser degree, with typical serous secretory cells of high electron density. Histochemically, the content of these cells presented a positive reaction to PAS, and light metachromasia with blue toluidine. The ductal system was well developed, in some cases stasis of

secretory material was identified in the lumen of the striate and secretory ducts.

The stroma presented a moderate adipose infiltration, represented by large adipocytes with the presence also of isolated lymphocytic foci (Fig 1).

At ultrastructural level, noticeable modifications with respect to the norm were observed in the parenchyma, particularly in the acinar cells. In general these were characterised by the accumulation of intracytoplasmic granules of diverse typology in shape, size and electrodensity.

The cytoplasm of the typical acinar cells was shown to be full of electrodense granules of circular or polyhedral contour owing to their grouping, occupying the full extent of the cytoplasm, including the basal region where the endoplasmic reticule appeared well developed (Fig 2). Also, in some acini, granules of large, pale, vesicular appearance and with a centre of greater electrodensity were identified. Likewise, a third type of larger granule was observed having a finely fibrillar and low electrodensity content, with a tendency to coalesce and whose appearance was similar to the mucosal type vesicles (Fig.3A-B). In some samples, certain acini were totally constituted of cells with these characteristics.

With respect to the rest of the organelles large Golgi cisterns as well as lisosomes were notable.

Other acinar cells were found which exhibited nuclei of irregular shape, with a different degree of heterochromatic content, while other cells showed evidence of structural alteration, with either pycnotic or degenerating nuclei and a cytoplasm of greater electrodensity, with enlarged endoplasmic reticule cisterns and either scarce or no granular content.

The lipid inclusions arranged in different areas of the cytoplasm were observed in practically all the acinar cells, identifying acini whose cells were completely occupied by lipid drops (Fig. 4). Between the acinar cells, extensive intercellular caniculi with abundant interdigitations were frequent. Particularly noticeable in some acini were the parallel desmosomic unions.

In the basal region of certain acini, cells of undifferentiated appearance were distinguished, joined by desmosomes to the neighbouring acinar cells that were characterised by their clearer and scarcer cytoplasm with few organelles and no secretory granules. No mitotic figures were found in these areas. In the basal areas of both the acini and the beginning of the ductal system, the degree of development of the mioepithelial cells was notable.

In some glandular regions, small acini existed with a dysfunctional appearance of atrophic type. Likewise, cells with an obvious oncocyctic transformation were observed in isolation. In the striate ducts the alternation between dark and clear cells, with atypical, heterochromatic nuclei, of irregular contour and located at different levels was notable. These cells contained abundant mitochondria and some presented large heterogeneous lisosomic bodies, as well as lipidic inclusions.

The cells of the intercalary ducts also exhibited some lipidic drops.

The appearance of the stroma was normal in some regions, in others a slight edema appeared, more noticeably in the periacinal

area, in addition to a certain degree of fibrosis and adipose infiltration.

-Study of autopsy material:

At optical microscope level, the parotid gland presented acini with granular accumulation atypical in size and location while some sectors exhibited acini of mucosal appearance.

The epithelium of the striate ducts showed a clear nuclear heterogeneity and pseudostratification, while in the secretory ducts a bistratal epithelial arrangement was observed, with moderate atrophy and accumulation of secretory material. There was a moderate adipose infiltration and slight periacinal edema in the stroma.

The material analysed after re-embedding for electron microscopy showed notable similarities to the material from the biopsies, although with fixation defects owing to the initial use of formol and to the processing for embedding in paraffin. In the acinar cells, accumulations of electrodense granules of different size and distributed at random throughout the cytoplasm were found (Fig. 5). In certain areas, glandular cells charged with granules of low electrodensity coexisted with mucous material.

At ductal level the optical and ultrastructural findings were also alike, the cellular heterogeneity and the tendency to stratify being a finding in common with the studies on parotid biopsies.

The principal structural and ultrastructural similarities in alcoholic parotid biopsies and autopsies are summarised in Table 1

	<i>BIOPSY SAMPLES</i>	<i>AUTOPSY SAMPLES</i>
<i>Acinar cells: varieties</i>	Some with irregular nuclei, others with pycnotic or degenerating nuclei. Cytoplasm of greater electrodensity. Cells of mucosal appearance. Isolated oncocyctic cells.	Cells of mucosal appearance.
<i>Granulation</i>	Abundant, of different shape, size and electrodensity. Electrodense Granules. Low electrodense granules with fine fibrillar material	Abundant, atypical and heterogeneous. Accumulation of electrodense granules of different size and randomly distributed. Others of low electrodensity, compatible with mucosal material.
<i>Ducts</i>	Dilated with stasis of secretory material.	Very dilated ducts with stasis of secretory material.
<i>Ductal Epithelium</i>	Clear and dark cells. Atypical irregular, heterochromatic nuclei.	Nuclear heterogeneity. Pseudostratified. Moderate atrophy.
<i>Stroma</i>	Moderate adipose infiltration, fibrosis and slight periacinal edema.	Moderate adipose infiltration, fibrosis and slight periacinal edema.

Table 1. Structural and Ultrastructural Similarities of the Alcoholic Parotid in Biopsies and Autopsies.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The existence of an increase in size of the salivary glands of neither inflammatory nor neoplastic origin has been widely studied and discussed both in relation to its structural pathogenesis and the terminology to use: sialosis or sialadenosis. In this study we use the term sialosis to refer to this pathology, in concordance with that indicated by Marco and collaborators (12).

The finding of parotid sialosis in our alcoholic cirrhotic patients, was coherent with that described by other authors with respect to the age of appearance, 50 years of age on average, and gender distribution, being equal in both sexes (18). It has been suggested that the size of the parotidomegaly could be in proportion to the quantity of alcohol consumed (19).

The ultrastructural alterations observed at parenchymal glandular level in the biopsy material were comparable to the structural modifications previously found in the parotid glands from autopsies of chronic alcoholics (7, 8), particularly with reference to the accumulation of intracytoplasmic granules of diverse shape and size, of different electrodensity and occupying, in general, the whole of the cytoplasm. These findings are different from those cited by Gorlin and Goldman (19), who stated that the granules are only observed in the initial phases of this pathology and postulate that the accumulation could be produced by an alteration in the membrane which inhibits exocytosis. On the other hand, Neville (3), as other authors (6, 18), suggests that the accumulation of intracytoplasmic granules could take place through a functional deficiency in the autonomous innervation of the gland.

With respect to the existence of isolated acini of mucosal type that were found both in the preliminary and final phases of the cirrhotic hepatopathy, this coincides with that described by Rodrigo (11) in parotid biopsies, who is of the opinion that a mucosal transformation could be produced in the pure serosa gland in those patients with a diagnosis of hepatic cirrhosis. Gorlin and Goldman (19) state that in parotid biopsies with cirrhotic sialosis, the acinar cells present cytoplasm 'of almost water-like clarity', a characteristic that they consider as typical in this variety of pathology.

The finding of dilation in the Golgiano system and the accumulation of lisosomes in the acinar cells of alcoholic parotid biopsies, is compatible with the descriptions by Tirapelli (16) of animal experiments, the desmosomic unions in parallel and the enlargement of the intercellular space by way of canaliculi with interdigitations, occurring in the same fashion. The acinar cells, with evident signs of morphofunctional alteration, as well as the oncocytes in the acini and small ducts, have also been mentioned by Banderas in parotids from rats subjected to the effects of ethanol (20).

On the other hand, the initial studies of the alcoholic hepatic steatosis is characterised by the presence of lipid inclusions in the hepatocytes, where the accumulation of lipids is produced by an alteration in the metabolism of the fatty acids and the liberation of lipoproteins owing to an interference in the protein synthesis caused by the effect of alcohol. The hepatic steatosis

in acute or persistent alcoholic hepatitis often coexists with cirrhosis (21). In this sense, we consider that alcohol or its metabolites could have provoked the formation of lipid inclusions in the acinar and ductal cells, observed at electronic and optical level in the alcoholic parotid biopsies, coinciding with that indicated by Rodrigo (11).

Contrary to other authors (11), who did not find alterations in the ductal system of the parotids of alcoholic cirrhotic patients, we observed modifications in the striate ducts of biopsies and autopsies, evidenced at electron and optical microscope level respectively. Furthermore, these samples are characterised principally by the presence of very enlarged excretory ducts and with stasis of secretory material.

Scott (10), in their structural studies of salivary glands of cirrhotic patients, did not detect glandular dilation or acinar hypertrophy, in spite of finding abundant adipose infiltration in the stroma. On the other hand, other authors (1, 3, 22) state that the acini of alcoholic parotids are enlarged by hypertrophy and an increase in the acinar function.

In accordance with our results, we suggest that the principal cause of the increase in glandular size could be the notable enlargement of the lumen of the ductal system and not the slight interstitial edema nor the minimal acinar hypertrophy found. Neither was there evidence of inflammatory processes that could justify the parotid hypertrophy.

The morphological modifications in the parotid of chronic alcoholics could be extrapolated to the serosal portion of the minor salivary glands, given that these show alterations to diverse degrees, including changes in the transcriptional activity of the acinar and ductal cells of those individuals who have died of alcoholic hepatic cirrhosis (7, 8,23).

These findings clearly show that:

- * The structural and ultrastructural alterations at ductal and acinar level are present in the parotid glands of chronic alcoholics even before the terminal phase of alcoholic hepatic cirrhosis.
- * The mucosal appearance of some areas of the parotid at ultrastructural level, could explain the tinctorial and histochemical heterogeneity of the samples observed by optical microscope, and could be evidence of morphofunctional alterations in the glands.
- * The nuclear ultrastructural modifications in shape, size and chromatic appearance of the ductal cells could correspond to the structural changes previously observed in the parotids of individuals who have died of alcoholic cirrhosis.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

1. Abelson D, Mandel ID, Karmioli M. Salivary studies in alcoholic cirrhosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976;41:188-91.
2. Dutta SK, Dukehart M, Narang A, Latham PS. Functional and structural changes in parotid glands of alcoholic cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1989; 96:510-8.
3. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquet JE, eds. *Oral and maxillofacial pathology*. Philadelphia: Saunders Company Ed.; 2th ed. 2002. p. 404-5.
4. Bermejo Fenoll A, eds. *Medicina Bucal*. Vol I. Madrid: Síntesis SA Editores;1998. p. 372-4.
5. Ceballos Salobreña A, eds. *Medicina Bucal*. Granada: Gráficas Anel SA Editores;1993. p. 234-8.

6. Coll Daroca J, eds. Enfermedades localizadas de las glándulas salivales. En: Farreras P, Rozman C Medicina Interna. Vol I. Barcelona: Doyma Editores; 12° ed. 1992. p. 37-8.
 7. Ferraris ME, Carranza M, Ferraris R, Fili T. Variaciones estructurales en glándulas salivales de alcohólicos crónicos. *Rev Fac Odont UNC* 1995;20:59-68.
 8. Ferraris ME, Arriaga A, Busso C, Carranza M. Histological study of parotid, submaxillary and von Ebner salivary glands in chronic alcoholics. *Acta Odont Latinoamer.* 1999;12:97-102.
 9. Smith PF, Esguep AS. Estudio histopatológico de glándulas salivales menores en alcohólicos. *Rev Med Chile* 1995;123:1387-93.
 10. Scott J, Burns J, Flower E A. Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: a necropsy study. *J Clin Pathol* 1988;41:837-40.
 11. Rodrigo Gomez JM. La hipertrofia parotídea en la cirrosis hepática. *Rev Esp Enf Ap Digest.* 1973;XLI:751-70.
 12. Marco J. Patología de la Parótida, eds. En: Symposium sobre patología de la parótida. Dpto. de Otorrinolaringología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia: Fund. García Muñoz Editores; 1980. p. 82-6.
 13. Bagan JV, Alapont L, Sanz C, del Olmo JA, Morcillo E, Cortijo J et al. Alteraciones dentales y salivales en los pacientes con cirrosis hepática: estudio de 100 casos. *Med Clin (Barc)* 1998;111:125-8.
 14. Borsanyi SJ. Chronic asymptomatic enlargement of the parotid glands. *Ann Otol (St. Luis)* 1962;71:857-67.
 15. Bonnin H, Moretti G, Geyer A. Les grosses parotides des cirrhotiques alcooliques. *Presse Med* 1954;62:1449-52.
 16. Tirapelli LF, Tirapelli DPC, Schimming BC. Ultrastructural alterations of the parotid glands of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Rev Chil Anat* 2001;19:175-82.
 17. Wolfe SJ, Summerskill WHJ, Davidson C. Parotid swelling, alcoholism and cirrhosis. *New Engl J Med* 1957;256:491-9.
 18. Kim D, Uy C, Mandel L. Sialosis of unknown origin. *N Y State Dent J* 1998;64:38-40.
 19. Gorlin R, Goldman H, eds. *Patología Oral de Thoma*. Barcelona: Salvat S. A. Editores; 1973. p. 1085-99.
 20. Banderas J, Gaitán L, Portilla J, Aguirre A. Effects of chronic ethanol consumption on the rat parotid gland. *Arch Oral Biol* 1992; 37:69-72.
 21. Rubin E, Farber JL, eds. *Patología*. México: Ed. Médica Panamericana; 1990. p. 382-7.
 22. Mandel L, Hamele-Bena D. Alcoholic parotid sialadenosis. *JADA* 1997; 128:1411-5.
 23. Severgnini M, Ferraris ME, Carranza M. NORs evaluation of lingual salivary glands of chronic alcoholics. *J Oral Pathol & Med* 2002;32:585-9.
- Agradecimientos:**
Los autores agradecen a:
Prof. Dr. D. José Manuel Rodrigo, por la realización de las biopsias.
Srta. Dña. Elena Cancelen por el procesado de microscopía electrónica.
Sra. Dña. Cristina Bertoldi por el procesado de microscopía óptica de las autopsias.
Subsidio parcial SECyT UNC 062/03.
Ayuda ISCIII Red G03/122.
-