

01421
300



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

"Inmunoexpresión del Receptor de Factor de Crecimiento
Epidérmico Tipo 1 y 2 en Glándulas Salivales de Ratonas
Alcohólicas"

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

KARINA RUIZ VERGARA

TUTOR Y DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN CARLOS CUAUHEMOC HERNANDEZ
GUERRERO

J. C. Cuauhemoc Hernandez Guerrero

ASESORES:
C.D. MARIA DOLORES JIMENEZ FARFAN
DR. CONSTANTINO LEDESMA MONTES
M.C. LUCIA DEL CARMEN MARQUEZ ALONZO



CIUDAD UNIVERSITARIA OCTUBRE DEL 2003.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1



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.

AGRADECIMIENTOS

***A la Universidad:
Por convertirse durante éstos 5 años
en mi casa, permitiendo desarrollarme
profesional y personalmente.***

***A mis papás:
Sin su ayuda éste, nuestro éxito,
no hubiese sido posible,
mil gracias.***

***A mis abuelitos:
Por enseñarme con el ejemplo
que el que querer, es poder.***

***A mis tíos:
Por encontrarse allí
cuando los necesitaba.***

***A Alejandro:
Porque eres la persona
más valiosa a mi lado, y
ejemplo palpable de que es
fácil lograr las metas
con disciplina y coraje.***

***A mis amigos:
Sandra, Ana, Karla, Alejandra,
Miguel, Ceci, Lulu gracias a cada uno
por estar juntos en los sabores y
sinsabores de la carrera.***

**Al Dr. Manuel Arteaga M:
Por ser la primer persona que me
enseñó y guió en la investigación
sembrando en mi esta inquietud.**

**Al Dr. Mario Hernández Ch. :
Por ser quien me adentró en la
práctica odontológica con
responsabilidad y conocimiento.**

**A mis profesores:
Todos aquellos quienes pusieron un
granito de arena y también a quienes
pusieron grandes piedras en el camino,
porque de todo se puede aprender.**

**Al Dr. Constantino Ledesma M
A la Mtra. Carmen Márquez
Al Dr. Malagón:
Por ser una guía importantísima para
el desarrollo de éste trabajo.**

**A Dolores: Gracias por tu ayuda
y enseñanza durante todo este tiempo.**

**Al Dr. Juan Carlos C. H:
Por permitirme desarrollar la
odontología desde el punto de vista
de la investigación. Gracias por su apoyo.**

Autizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Rafael Verónica Korneu

FECHA: 29/Sep/2003

FIRMA: [Firma]

CONTENIDO

RESUMEN.	I
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES .	
2.1. ESTRUCTURA GLANDULAR DE RATÓN.	2
2.2. ALCOHOL.	5
2.2.1. FARMACOLOGÍA Y METABOLISMO.	6
2.2.2. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA ABSORCIÓN Y METABOLISMO.	9
2.2.3. DIETA Y ALCOHOLISMO.	10
2.2.4. MECANISMO DE ACCIÓN.	11
2.2.5. TOXICIDAD Y CONSECUENCIAS METABÓLICAS DEL CONSUMO DE ALCOHOL.	12
2.2.6. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE ALCOHOL EN EL ORGANISMO.	14
2.3. FACTORES DE CRECIMIENTO.	16
2.3.1 RECEPTORES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.	17
2.3.2 RECEPTOR DEL HER-1.	19
2.3.3 RECEPTOR DEL HER-2.	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	22
4. JUSTIFICACIÓN.	23
5. HIPÓTESIS.	25
6. OBJETIVOS.	
6.1. GENERAL.	25
6.2. ESPECÍFICO.	25
7. METODOLOGÍA.	
7.1. MATERIAL Y MÉTODOS.	26
7.2. MUESTRA.	31
7.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.	31
7.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.	32

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.5. VARIABLES.	
7.5.1 INDEPENDIENTES.	32
7.5.2 DEPENDIENTES.	32
7.6. ESCALA DE MEDICIÓN.	32
7.6.1 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.	33
7.6.2 RECURSOS.	
7.6.2.1. MATERIALES.	33
7.6.2.2. HUMANOS.	35
7.6.2.3. FINANCIEROS.	35
7.7. DISEÑO DEL ESTUDIO.	36
8. RESULTADOS.	36
9. DISCUSIÓN.	45
10. CONCLUSIONES.	48
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	49
12. ANEXO I SOLUCION PARA INMUNOTINCIÓN.	55
13. GLOSARIO.	56
14. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.	57

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA 1 Consumo promedio de alcohol por ratona.	36
TABLA 2 Alcohol en suero, Cromatografía de gases.	38

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE GRAFICAS

	PÁGINA
GRAFICA 1 Consumo promedio de alcohol.	37
GRAFICA 2 Alcohol en sangre.	38

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE FIGURAS.

		PAGINA.
FIG. 1	ESTRUCTURA DE GLÁNDULA SALIVAL.	2
FIG. 2	ESTRUCTURA DE GLANDULA SALIVAL EN TRES DIMENSIONES	3
FIG. 3	LOCALIZACION EN RATON DEL GLANDULAS SALIVALES	4
FIG. 4	ESTRUCTURA DEL ALCOHOL ETILICO	5
FIG. 5	ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO	17
FIG. 6	FORMACIÓN DE DÍMEROS	18

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE FOTOS.

	PÁGINA.
FOTO 1. H/E 100X SEROSA CONTROL	40
FOTO 2. H/E 100x MUCOSA CONTROL	40
FOTO 3. H/E 100x SEROSA 5%	40
FOTO 4. H/E 100X MUCOSA 5%	40
FOTO 5. H/E 100x SEROSA 10%	40
FOTO 6. H/E 100x MUCOSA 10%	40
FOTO 7. H/E 100x SEROSA 15%	41
FOTO 8. H/E 100x MUCOSA 15%	41
FOTO 9. H/E 100x SEROSA 24%	41
FOTO 10. H/E 100x MUCOSA 24%	41
FOTO 11. HER-1 SEROSA CONROL	42
FOTO 12. HER-1 MUCOSA CONTROL	42
FOTO 13. HER-2 SEROSA CONROL	43
FOTO 14. HER-2 MUCOSA CONTROL	43
FOTO 15. HER-1 SEROSA 15%	43
FOTO 16. HER-1 MUCOSA 15%	43
FOTO 17. HER-1 SEROSA 24%	43
FOTO 18. HER-1 MUCOSA 24%	43
FOTO 19. HER-2 SEROSA 15%	44
FOTO 20. HER-2 MUCOSA 15%	44
FOTO 21. HER-2 SEROSA 24%	44
FOTO 22. HER-2 MUCOSA 24%	44

I. RESUMEN

El Alcohol es la droga de la cual se abusa más comúnmente el mundo, se han reportado los efectos de deterioro que provoca en el organismo, sin embargo sobre su acción en glándulas salivales poco se sabe; el objetivo de este trabajo es conocer sus efectos en glándulas salivales submandibulares. Un grupo experimental de 20 ratonas de 8 semanas de edad, divididas en 4 subgrupos de 5 hembras se alcoholizaron mediante soluciones administradas *ad libitum* 5%, 10%, 15% y 24%. El grupo control de 5 hembras consumió agua de garrafón, durante 27 semanas. Se diseccionaron las glándulas salivales, se fijaron en formalina y fueron embebidas en parafina, se cortaron a 5 μm y se tiñeron con H/E. Resultados observados: Células serosas con pérdida de límites celulares, vacuolización citoplásmica y estallamiento celular. En las células mucosas pérdida de límites celulares, granulación citoplásmica con degeneración vacuolar e incremento del tamaño celular. Estos resultados sugieren que bajo nuestras condiciones experimentales, el alcohol provoca intensa degeneración del parénquima glandular salival. Observamos incremento en la inmunexpresión del HER-1 y HER-2, relacionado al incremento de las concentraciones de alcohol y a la magnitud de los hallazgos histológicos. El incremento con HER-2 en el subgrupo alcoholizado al 15 y 24% fue marcado, mientras que con HER-1 hubo incremento ligero desde la concentración mas baja. El alcoholismo puede producir aumento en síntesis de HER-1 y HER-2 o que el mecanismo que los endocita y recicla se altere, permitiendo mayor permanencia o número de ellos en la superficie celular, reflejándose en un incremento de la inmunexpresión.

1. INTRODUCCIÓN

En las sociedades actuales, las drogas y los medios de comunicación cumplen con el objetivo de fugar al individuo de la realidad, por lo tanto pueden influir en el abuso de sustancias adictivas, ya que son parte sustancial del modo de producción capitalista, cuya finalidad es el consumo masivo y creciente de productos no relacionados a las necesidades básicas de los individuos.

El alcoholismo es un problema de salud pública extendido a nivel mundial que capta rápidamente la atención de la población joven, debido a su gran popularidad, facilidad de acceso y aceptabilidad social. Su abuso provoca una serie de problemas físicos, sociales y psicológicos, tanto al individuo como a la sociedad en la que se desenvuelve.

Para estudiar las alteraciones sistémicas que por hábito éste provoca, se han desarrollado numerosos estudios que tratan de comprender sus efectos. A nivel de cavidad bucal se han reportado cambios fisiopatológicos, lo que sugiere que al ser ésta el primer sitio de contacto con el alcohol debe ejercer múltiples efectos sobre sus tejidos. En este trabajo se analizó el efecto que causa el alcoholismo a nivel del parénquima de glándulas submandibulares de ratonas alcoholizadas, así como la existencia de alteraciones en la inmunoexpresión de los receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico tipos 1 y 2 en estas glándulas.

2. ANTECEDENTES

2.1 ESTRUCTURA GLANDULAR SALIVAL DE RATON

Las glándulas salivales son invaginaciones del epitelio bucal hacia la lámina propia submucosa. Según el tamaño, la localización y la proximidad con la cavidad bucal, las glándulas salivales se clasifican como principales o menores. Las glándulas salivales principales en ratón (parótida, submandibular, sublingual) son grandes, se sitúan a cierta distancia de su sitio de drenaje, por lo que sus conductos excretores son largos.¹

Las glándulas salivales principales se clasifican en: compuestas y tubuloalveolares; presentan estructuras únicas que son alveolos, conductos intercalados y conductos estriados. Estos últimos también se llaman túbulos secretores y son intralobulillares.

La vía de secreción de las glándulas salivales va del alveolo al conducto intercalado, al conducto intralobulillar; de aquí al conducto lobulillar, al conducto intralobular, al conducto lobular y por último al conducto excretor.¹ Ver fig. 1.

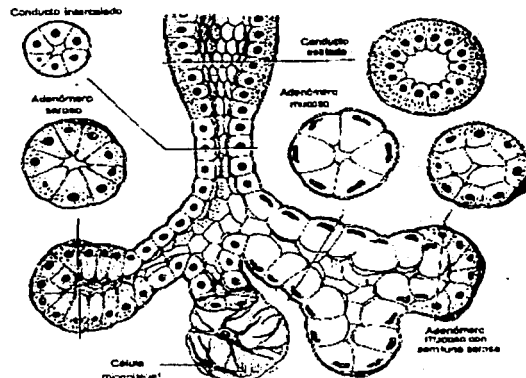


Fig. 1 Estructura Glándula salival.¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

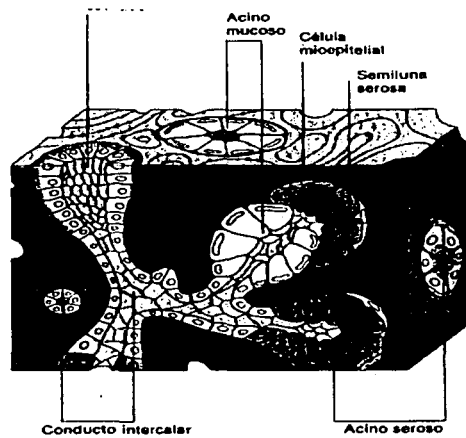
Los conductos intercalados son pequeños túbulos revestidos por epitelio cúbico bajo. Son conductos no secretores que conectan el alveolo con los conductos estriados; éstos se hallan revestidos por epitelio cilíndrico y reciben su nombre de las estriaciones infranucleares que son resultado de acumulaciones de mitocondrias y pliegues internos del plasma basal de las células de revestimiento.¹

El epitelio cilíndrico biestratificado o cúbico biestratificado puede observarse en puntos de transición entre conductos intralobulillares y lobulares.

El epitelio escamoso estratificado puede observarse en puntos de transición entre conductos intralobulillares e intralobulares.

El epitelio escamoso estratificado es característico de los conductos excretores y se continúa con la cavidad bucal.

El epitelio de la glándula salival se separa del tejido conjuntivo circundante por medio de una membrana basal.¹



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Estructura Glándula salival 3D.²

Las glándulas salivales mayores son:

Parótidas: Se extienden ventrodorsalmente por detrás de la oreja hacia la clavícula del ratón. Por lo general son serosas en animales domésticos, seres humanos y roedores, se observan pocas células mucosas o adenómeros en carnívoros.^{1,2}

Submaxilares o submandibulares: Se encuentran en la porción ventral, entre las mandíbulas y la unión torácica en equinos, algunos roedores; seres humanos y rumiantes;^{2,3} tienen dos tipos de gránulos secretores: serosos y mucosos, unos de las células serosas y los otros de las células mucosas, por lo cual se denominan glándulas mixtas. (Ver fig.2.) Muestran dimorfismo sexual de los conductos, ya que su diámetro es mayor en machos.³

Su epitelio deriva de una pequeña región del epitelio bucal que comienza a invaginarse en la mesénquima mandibular alrededor del día 11 embrional.

Sublinguales: Son las más pequeñas y de tipo predominantemente mucoso en rumiantes, porcinos y roedores, y mixtas en carnívoros pequeños.^{1,2}

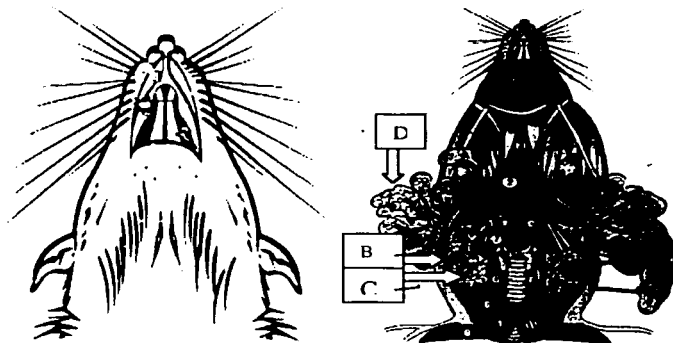


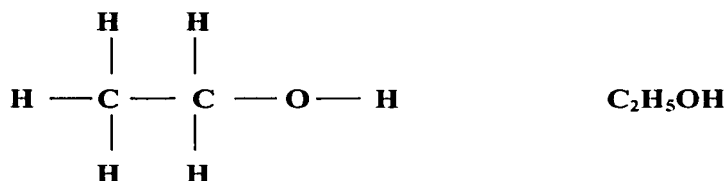
Fig. 3 B. Glándula salival sublingual. C. Glándula salival submandibular.
D. Glándula salival parótida.²

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2 ALCOHOL

Los alcoholes pertenecen a los hidrocarburos alifáticos; se producen por la sustitución de un hidrógeno de su fórmula por un grupo hidroxilo (OH). El alcohol etílico es un líquido incoloro, volátil e inflamable producto de la fermentación de almidones y azúcares. Es un supresor del sistema nervioso central y tóxico en grandes cantidades; a dosis bajas es un ansiolítico, pero a altas dosis produce problemas individuales y sociales puesto que se asocia a accidentes y hechos violentos. ⁴

Fig. 4 Estructura molecular del alcohol etílico (compuesto por carbono, hidrógeno y oxígeno).



El alcohol etílico se obtiene por fermentación de los hidratos de carbono a través de levaduras, o de manera industrial por destilación a partir de la melaza (solución impura del azúcar). A través del primer método, la máxima concentración de alcohol que se obtiene es del 16% v/v, ya que a una concentración mayor las levaduras se inhiben, mientras que con el segundo método se pueden obtener concentraciones de hasta un 50%.⁵

El contenido de alcohol de las bebidas elaboradas se mide en términos de porcentaje de alcohol (peso/ volumen), mientras que el de las bebidas destiladas se mide en grados Gay Lussac. ⁶ El porcentaje de concentración de alcohol de una bebida también puede ser medida en grados o Proff. Estos últimos representan el doble de los primeros, ejemplo: 40° GL = 80° Proff. ⁷

2.2.1 FARMACOLOGÍA Y METABOLISMO

Es una sustancia de bajo peso molecular y sin carga, razones por las cuales atraviesa fácilmente las membranas. Su absorción comienza a nivel de la boca, esófago y estómago, aunque principalmente se da en el intestino (duodeno y yeyuno) donde se encuentra la mayor superficie de contacto. La absorción depende de una cinética de primer orden donde a mayor cantidad de consumo, mayor absorción. ⁶ Penetra en la circulación portal, se distribuye en la sangre arterial, no se fija a proteínas plasmáticas y se distribuye rápidamente a través de membranas capilares⁸ por difusión hacia los tejidos del cuerpo, en proporción casi igual a su contenido acuoso y a la solubilidad del alcohol en agua. Del total de etanol ingerido, la gran mayoría se diluye en los líquidos del cuerpo en relación al peso en agua del sujeto. Por ejemplo: 29.5 ml de Whisky de 40% contiene 11.8 ml de etanol, en un sujeto de 75 kg produce una concentración alcohólica en sangre de alrededor del 0.02%. La cantidad de alcohol presente en sangre se expresa en gramos por litro (g/L) y alcanza su punto máximo entre los 30 y 45 minutos después de su ingesta. ⁴ El alcohol atraviesa fácilmente la barrera placentaria y la hemato-encefálica. ⁶

La enzima encargada de la principal vía de biotransformación del alcohol es la deshidrogenasa alcohólica que es de tipo citosólica, trabaja con un cofactor NAD (nicotín-adenín- dinucleótido) y lo convierte a NADH (nicotín-adenín-dinucleótido reducido); sin embargo, con una ingesta alta o crónica de alcohol este sistema se ve saturado rápidamente, por lo que el organismo debe recurrir a una segunda vía de menor importancia, que es a través del sistema microsomal (MEOS), el cual necesita NADPH (nicotín- adenín- inucleótido fosfato reducido) que se transforma

a NADP (nicotinaminadeninucleótido fosfatado) con consumo de oxígeno. Finalmente en caso de ingesta extremadamente alta es activado un tercer sistema: el de la catalasa.

A través de estas tres vías se obtiene un solo producto, el primer metabolito del alcohol que es el acetaldehído, el cual se oxida por medio de la enzima aldehído deshidrogenasa resultando como metabolito de éste, el acetato, que sale a la circulación y se transforma en los tejidos periféricos a CO_2 y H_2O . Sin embargo cuando se ingiere alcohol, prácticamente no se encuentra acetaldehído en la sangre debido a la eficiencia de la enzima aldehído deshidrogenasa.^{8,9}

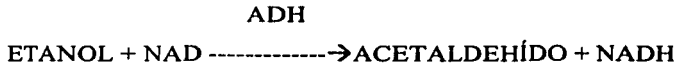
La oxidación es uno de los procesos del metabolismo que se lleva a cabo en el hígado, donde el alcohol es eliminado de la sangre a una velocidad de 100 mg por kilogramo de peso corporal por hora, lo cual evita que éste se acumule y destruya células y órganos.⁴ Ejemplo: un hombre sano de 70 kg puede consumir hasta 7g de alcohol por hora.

Dichos valores difieren en los animales con respecto al hombre ya que tanto la rata como el ratón son capaces de metabolizar el alcohol en un rango de 300 a 550 mg /kg /hr respectivamente.¹⁰

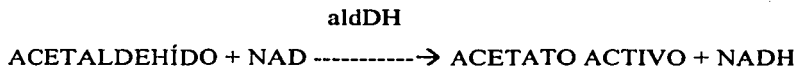
El alcohol se elimina en razón de 0.12g/kg por hora,¹¹ tras una biotransformación en el hígado del 90% y el resto a nivel de los tejidos que tienen mayor cantidad de agua como el corazón, cerebro y pulmón. El resto del alcohol no metabolizado en el hígado se excreta como tal en orina y en el aire exhalado, heces, leche y una porción mínima se encuentra en sudor, lágrimas y saliva.^{6,8,5}

Metabolismo del alcohol en el hígado

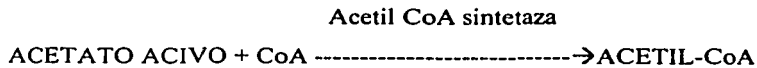
1. El alcohol etílico se convierte en acetaldehído por medio de la enzima Deshidrogenasa Alcohólica.



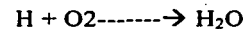
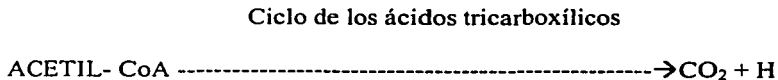
2. El Acetaldehído se transforma en acetato por efecto de la Deshidrogenasa Aldehídica.



3. El acetato por la acción de la enzima Acetil Colina A sintetasa, se convierte en Acetil Coenzima A.



4. Por oxidación esta se transforma en dióxido de carbono y agua.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dentro de los factores que influyen sobre la absorción y el metabolismo del alcohol se encuentran la comida y el género. La primera, debido a que el proceso de absorción del alcohol se ve influenciado por factores como la presencia de comida y el tipo de ésta dentro de las vías gastrointestinales. La velocidad a la cual se absorbe el alcohol depende de lo rápido que el estómago vacía su contenido al intestino. La solubilidad del alcohol en el agua es 30 veces mayor que en las grasas por lo cual cuanto más alto sea el contenido de grasas, más tarda el estómago en vaciarse y más largo es el proceso de absorción. ⁶ Con respecto al género. Las mujeres absorben y metabolizan el alcohol de manera diferente que los hombres. Dicha diferencia entre las concentraciones de alcohol en la sangre, se atribuye a la menor cantidad de agua del cuerpo femenino. Otro factor que contribuye a la diferencia de la concentración, puede ser que las mujeres tienen una actividad más baja de la enzima ADH en el estómago, lo cual hace que la sangre alcance una proporción más elevada del alcohol ingerido. La combinación de estos factores puede hacer a las mujeres más vulnerables que los hombres a los daños de hígado y corazón. ⁶y son más susceptibles a las enfermedades del hígado, del cerebro y del corazón.

El alcohol se considera un micronutriente, ya que suministra energía (medida en calorías) aportando 7.1 Kcal por gramo; generalmente aporta pocas o nulas vitaminas, proteínas, minerales y otros nutrientes. Por ejemplo, 12 onzas de una bebida de 86° G.L contiene aproximadamente 1200 calorías. ^{8, 12}

El efecto dual del alcoholismo sobre los estados nutricionales hace referencia a que el alcohólico que toma 1200 o más calorías diarias de etanol, las cuales representan aproximadamente la mitad de la ingesta diaria recomendada de energía alimenticia, tiene proporcionalmente menos oportunidad de consumir los nutrientes adicionales que necesita para una dieta balanceada, por lo cual se genera una malnutrición secundaria por la afectación de la absorción de nutrientes. Además, a medida que progresa el alcoholismo las funciones digestivas y hepáticas se alteran y pueden dar como resultado deficiencias específicas de tiamina y folato.^{12, 13}

El grado alcohólico es el contenido de alcohol en licores destilados y dicho contenido en porcentaje, se obtiene dividiendo entre 2 el grado de alcohol.

Por ejemplo 100 grados de alcohol = 50% de alcohol

En tanto, el contenido de alcohol en el vino se indica en porcentajes.

En promedio, los vinos blancos contienen 12% de alcohol y los vinos tintos 14%.

Una cerveza contiene entre 3 y 8%, mientras que los licores dulces contiene entre 40 y 50% de alcohol, por lo que aportan mayores calorías.⁹

2.2.2 MECANISMO DE ACCION

El transporte del alcohol a través de las membranas se favorece debido a que la molécula del alcohol es relativamente pequeña y no posee carga, además de ser soluble en agua y parcialmente soluble en gases.⁶

La rapidez con la que el alcohol atraviesa la membrana depende de su gradiente de concentración a ambos lados de la misma. El único mecanismo que interviene es la difusión a favor del gradiente de concentración.⁶

Muchos de los efectos del etanol están mediados por diversos receptores que se ven afectados en su función a bajas concentraciones, como la de algunos canales, receptores y enzimas de membrana, pero dichos efectos no dependen de la unión a receptores específicos.

El etanol altera la fluidez de los iones hacia las membranas neuronales, lo que produce intoxicación y daño celular que está relacionado con la modificación en la sensibilidad y tolerancia neuronal ante la actividad eléctrica.¹⁴

El equilibrio entre el interior y el exterior celular se alcanza por difusión simple, por ello su acción es rápida y de corta duración. La ingestión moderada de alcohol conlleva a la desaparición del etanol en sangre normalmente en una hora.¹⁴

La edad de los humanos y animales está generalmente relacionada con la capacidad para responder al etanol *in vivo*.

2.2.5 TOXICIDAD Y CONSECUENCIAS METABÓLICAS DEL CONSUMO DE ALCOHOL

El alcohol es una sustancia depresiva que disminuye el funcionamiento del Sistema Nervioso Central (SNC), comenzando a afectar al cuerpo rápidamente. Los centros superiores son los que se deprimen primero (el habla, el pensamiento, la cognición y el juicio) y posteriormente los centros inferiores, incluyendo la respiración y los reflejos espinales, pudiendo llegar con una intoxicación severa, hasta un estado de coma y muerte.⁶

El alcoholismo reduce la esperanza de vida entre 10 y 12 años.¹⁵

La adicción al alcohol se caracteriza por una alta tolerancia a su consumo sin manifestar alteraciones del comportamiento.¹⁵ Por ejemplo, en un hombre de 180 libras, el consumo de 150mg/dl de alcohol en sangre sin signos clínicos de intoxicación, y sin síntomas que limiten su ingesta, como el delirio, convulsiones, temperatura elevada, indica adicción.^{4, 11}

El consumo de alcohol ocasiona que aumente el volumen del hepatocito por acumulación de grasa, colágena y otras proteínas, aminoácidos, agua y electrolitos, sin que aumente paralelamente el número de células.^{12, 16}

Aumenta el metabolismo basal y la producción de calor en el organismo.^{15, 17}

Produce alteraciones en el sistema inmune que se manifiestan por susceptibilidad aumentada a las infecciones, como consecuencia de la influencia directa del alcohol sobre las células del sistema inmunológico, deficiencias nutricionales secundarias y al estrés oxidativo o la disfunción de neutrófilos.^{18, 19}

Las alteraciones metabólicas en el alcoholismo se traducen en aumento en el riesgo de carcinogénesis, ^{20, 15} incidencia de bajo peso al nacer y complicaciones postoperatorias. ^{21,22}

El daño hepático provocado por el alcoholismo se acompaña frecuentemente por una nefropatía secundaria parecida a la producida por la inmunoglobulina A. Las miopatías de los músculos esqueléticos y las neuropatías periféricas son las secuelas más frecuentes del alcoholismo, incluso que la cirrosis o las cardiomiopatías. ¹⁶ La neuropatía periférica que se presenta en los alcohólicos se atribuye a distintos grados de malnutrición y deficiencias vitamínicas, especialmente de tiamina. ^{15, 22}

Debido a que la cavidad bucal es la primera porción del organismo que entra en contacto con el etanol y a que éste se absorbe a través del epitelio bucal, las consecuencias del abuso en el consumo de etanol son variadas y pueden ir desde una disminución en la secreción salival, acompañada de inflamación de la mucosa bucal y alta susceptibilidad por presentar enfermedades periodontales e infecciones fúngicas, hasta una alta incidencia en la manifestación de alteraciones leucoplásicas asociadas o no a displasias y en algunos casos con desarrollo de carcinomas bucales, faríngeos, laríngeos, esofágicos o estomacales. ²³

2.2.7 METODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE ALCOHOL EN EL ORGANISMO

El diagnóstico de consumo de alcohol se basa particularmente en la determinación del etanol y sus metabolitos en distintos líquidos corporales así como en la evaluación del daño originado por el producto sobre hígado y páncreas. Actualmente, los métodos que se utilizan para determinar la concentración de etanol en los líquidos corporales son la cromatografía de gases y los métodos enzimáticos; ²⁴ el primero de ellos es el procedimiento estándar. Estas técnicas son muy sensibles y permiten detectar niveles tan bajos como de 10^{-7} M y 10^{-8} M. Además, la cromatografía puede diferenciar el etanol de otras sustancias, como otros alcoholes, cetonas e hidrocarburos. Asimismo, la cromatografía de gases parece el método más adecuado desde el punto de vista legal. La concentración de alcohol en sangre (y otros tejidos), está regulada constantemente por mecanismos de absorción y eliminación. Siempre que la velocidad de absorción sanguínea supere la velocidad de eliminación, aumentará la concentración plasmática. ²⁶ La concentración de etanol en sangre es ligeramente menor a la concentración plasmática, y ésta es menor que la urinaria.⁶ La cuantificación de etanol en saliva con tiras especiales tiene la ventaja de la facilidad de obtención de la muestra, fundamentalmente cuando el enfermo está inconsciente. Se ha visto que las concentraciones de etanol en el flujo salival son mayores que los niveles en sangre, ²³ a pesar de que el flujo de saliva se encuentra disminuido en la mayoría de los alcohólicos. ²⁶

CÁLCULOS DE ALCOHOL EN SANGRE.

La densidad del etanol es de 0.789g/ml.

En promedio, su volumen de distribución es de 0.54 L/kg de peso corporal.

Se elimina en razón de 0.12g/kg/h.

El cálculo aproximado de los niveles de alcohol en sangre necesita que el promedio de alcohol consumido se exprese en mililitros, multiplicado por el porcentaje de intensidad y por la densidad del etanol, y así determinar los gramos de alcohol consumidos.

Por ejemplo: si se consume una botella de 40 oz. de licor de malta, la cantidad de etanol se calcula como $40\text{oz} \times 29.5 \text{ ml/oz} \times 5.5\% \times 0.789\text{g/ml} = 51.2 \text{ g}$ de etanol puro.

El resultado representa el porcentaje de alcohol distribuido en el cuerpo. Este número se divide entre el volumen de distribución (0.541/kg) resultando en g de alcohol /L. ²⁷

El volumen de distribución puede aumentarse ligeramente en hombres comparado a mujeres y puede aumentar en personas delgadas y viceversa en sujetos obesos.

La eliminación puede verse incrementada alrededor de un 20% en personas bebedoras experimentadas como consecuencia de la inducción de las enzimas hepáticas metabolizadoras de alcohol. ²⁷

2.3 FACTORES DE CRECIMIENTO

Los Factores de Crecimiento representan un grupo de polipéptidos que tienen la propiedad común de inducir la multiplicación celular *in vivo* e *in vitro* ²⁸, además de regular el crecimiento y diferenciación celular ²⁹. Son una clase de mediadores biológicos naturales que regulan la proliferación, diferenciación, motilidad y síntesis de matriz prácticamente en todos los tipos celulares.³⁰ Pueden agruparse en familias de moléculas con estructuras y secuencias relacionadas. Todos los factores de crecimiento expresan sus efectos biológicos en la multiplicación celular a bajas concentraciones. Se sintetizan en muchos tipos celulares y tejidos en el organismo, y actúan localmente en el tejido en que son sintetizados. La diversidad de factores de crecimiento refleja el hecho de que ellos presentan especificidad en sus acciones hacia determinados tipos celulares. Los factores de crecimiento tienen el potencial para inducir transformación celular si actúan en el tiempo o lugar equivocado, además por la variedad de receptores que algunas células poseen para diferentes factores de crecimiento, la exposición a más de uno de éstos puede provocar su interacción y respuestas celulares impredecibles. ³¹

2.3.1 RECEPTORES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

El factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) fue el primero en obtenerse en forma pura y lo describió Cohen en 1962 a partir de glándulas salivales de ratón.^{28, 32}

Los receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico se agrupan en una familia del mismo nombre, llamada así debido a que poseen homología estructural.³³

La familia de nombre HER consta de cuatro receptores celulares de superficie:

HER-1 o erbB1,

HER-2, erbB2 o Neu,

HER-3 o erbB3 y

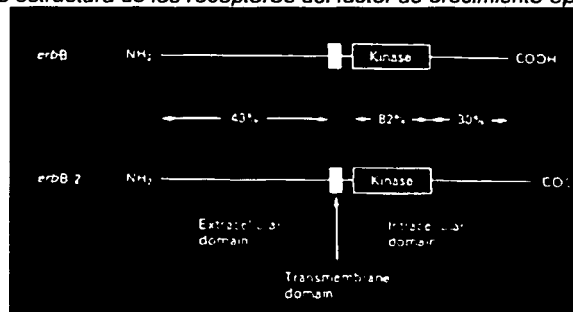
HER-4 o erbB4.^{34, 35, 36}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Todos ellos presentan arquitectura molecular común, que consiste en:^{34, 35, 36}

1. Un dominio extracelular glicosilado resguardado por dos regiones ricas en cisterna.
2. Un dominio transmembranal.
3. Una región intracelular que contiene el dominio catalítico de tirosina cinasa, la cual se activa y fosforila los residuos de tirosina de las proteínas generando una respuesta celular.

Fig. 5 estructura de los receptores del factor de crecimiento epidérmico.³⁷



En células normales, la actividad de los receptores se encuentra estrictamente controlada, especialmente la del receptor HER-2.³⁴ Los receptores del EGF existen como monómeros, pero con la acción de un ligando pueden formar dímeros, los cuales pueden ser homodímeros con el mismo tipo de receptor o heterodímeros formados por diferentes tipos de receptores. La formación de dímeros está guiada por una alta estabilidad del complejo formado entre el ligando y los dos receptores, en comparación a la que presenta el receptor monomérico.

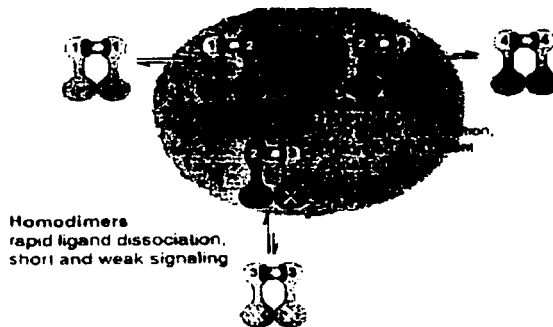


Fig. 6 Formación de dímeros.³⁵

El EGF una vez ligado a los receptores de membrana es capaz de estimular mitogénicamente diversos tejidos adultos regular la función gástrica y el metabolismo y sobre tejidos en desarrollo estimular la queratinización del ectodermo. A nivel craneofacial acelera la erupción de los incisivos, la apertura prematura de párpados, además de regular la proliferación celular y maduración del epitelio palatal estimulando tanto su crecimiento como su fusión.³⁴

Muchas moléculas proteicas de señalización, entre ellas receptores de los Factores de Crecimiento una vez que llevaron a cabo su función de señalización penetran en las células diana por medio de una endocitosis, para luego ser degradados por los lisosomas.³⁷

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3.2 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO TIPO 1

El HER-1 es una fosfoproteína que contiene de 2.5 a 3.5 mol de fosfato por mol de receptor in vivo. ³⁸

El receptor HER-1 tiene influencia en el desarrollo del hígado, dientes, paladar, tracto digestivo y glándulas salivales ²³. Lo activan seis ligandos, siendo los principales el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el Factor de Crecimiento Transformante alfa (TGF- α)³⁶

El HER-1 es activado por la inducción de dimerización del receptor, provocando una fosforilación cruzada entre las dos moléculas del receptor. ³⁸

La sobreexpresión del receptor del HER-1 puede ser consecuencia de un incremento en la transcripción, incremento en la amplificación del gen o probablemente de ambos. La amplificación de genes en células normales es un evento sumamente raro, mientras que en células cancerígenas esto ocurre muy comúnmente, como en el cáncer de mama y el de ovario ³⁸

En Glándulas salivales el HER-1 se expresa en células epiteliales y conductos de las glándulas en desarrollo. En ratones adultos el HER-1 ha sido reportado sobre células epiteliales. ³⁹ Existe una relación cuantitativa entre el número de HER-1 expresado en la superficie celular y la respuesta proliferativa de las células tumorales. ³⁸ Ya que la presencia de HER-1 en las superficies celulares sugiere que los Factores de Crecimiento están siendo sintetizados por las células y pueden generar una estimulación autócrina o parácrina. ³⁸ De hecho se sabe que la sobreexpresión de el EGF se encuentra ligada a la del HER-1. ⁴⁰

2.3.3 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO TIPO 2

La proteína receptora del factor de crecimiento epidérmico tipo 2 (HER-2), es una glicoproteína de la superficie celular de 185KD formada con estructura de receptor del Factor de Crecimiento Epidermal.⁴² Está codificada por el gen *neu*, este proto-oncogen está mapeado en el cromosoma 17q21 y presenta homología del 82% con su receptor.⁴¹ Este gen fue originalmente identificado en tumores neuroectodérmicos de rata y posteriormente se ubicó su similar en humano.³⁶ El HER-2 es un co-receptor de muchos ligandos, por lo cual se dice que es capaz de participar en la transducción de señales en ausencia de un ligando específico. Lo activan ligandos similares al EGF dando como resultado la formación de heterodímeros.³⁶ Sin embargo, ningún ligando puede promover la formación de un homodímero de HER-2.

La amplificación del gen HER-2 y/o, la sobreexpresión del receptor se detecta en cáncer de mama, ovario, estómago y glándulas salivales humanas,^{43,44} y se relaciona con un pronóstico pobre, ya que está asociado con la agresividad del tumor y su actividad metastásica.^{34, 36} Una amplia variedad de tumores humanos derivados de la línea epitelial han mostrado tener amplificación o sobreexpresión de su gen.(Semba et-al 1985).⁴¹

La amplificación del gen HER-2 se puede deber a un aumento en la transcripción del gen que codifica la proteína,^{34 . 41} lo cual da como consecuencia un incremento de los niveles de RNAm HER-2 y por lo tanto se incrementa la síntesis de la proteína HER-2. Esta proteína es entonces sobreexpresada en la superficie celular y esa sobreexpresión conduce probablemente a la formación de dímeros.

Generando un incremento en el crecimiento celular sin regulación y su transformación oncogénica.

La familia de receptores tirosina cinasa incluyendo HER-1, HER-2 y HER-3 han sido reconocidos con importancia particular en muchos procesos malignos humanos. Shinanis et-al 1995, reporto un patrón de sobreexpresión del HER-2 y HER-3 en relación a la diferenciación e invasión de carcinoma adenoideo quístico en humanos, mientras que HER-1 no se detectó.⁴⁵

Hellquist et-al reportó 9 casos de carcinoma de conductos salivales y en todos ellos encontró un patrón constante de sobreexpresión del HER-2 y acentuada tinción de la membrana además de actividad proliferativa alta.⁴⁶

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo continuo de alcohol provoca deterioro en el organismo, que va desde hipertensión, problemas hepáticos o pancreáticos, gota, malestar estomacal, problemas emocionales, estrés, ansiedad o depresión en casos de abuso.⁴⁷ De acuerdo a los datos del Instituto Mexicano de Psiquiatría, doce millones de mexicanos presentan patrones de abuso de alcohol.⁴⁸ La SSA reportó en 1992 que los accidentes ocuparon el tercer lugar entre las causas de muerte a nivel nacional. La cirrosis hepática y otras enfermedades hepáticas ocuparon el séptimo lugar (frecuentemente asociadas al consumo de alcohol).⁴⁹

Existen factores que se consideran promotores de los procesos cancerígenos cuando son combinados por el individuo como son la desnutrición, el tabaquismo y el alcoholismo, los dos últimos es frecuente observarlos juntos e ingresan en el organismo a través de la cavidad bucal y la desnutrición se asocia al alcoholismo por lo cual todos se encuentran en estrecha relación. Razón por la cual las lesiones premalignas y malignas en boca se ven incrementadas en la población. Además las causas de muerte asociadas al alcohol representan 4 de las 20 más frecuentes a nivel nacional y tres de ellas se ubican entre las 10 primeras.⁴⁹ Existe información proporcionada por diversos autores quienes observaron que una ingesta alcohólica constante provoca alteraciones a nivel de glándula salival, en la cantidad y calidad del flujo salival, lo cual a su vez repercute en una lubricación inadecuada, mientras que las prostaglandinas aumentan la producción mucosa y se traduce en inflamación de la mucosa bucal, lo que puede propiciar la aparición de lesiones que van desde ulceraciones hasta la aparición de lesiones malignas.³⁶

4. JUSTIFICACIÓN

El alcoholismo no ha sido considerado una causa de cáncer, sin embargo se ha relacionado como factor promotor cuando está asociado a otros agentes como tabaquismo o desnutrición.³⁶ Tales factores de riesgo y los atributos inherentes de cada persona, le confieren un grado variable de susceptibilidad comúnmente asociados al consumo de alcohol. Whorman⁴² comprobó que por lo general los bebedores son fumadores y ambos factores coinciden en la boca, razón por la cual aparecen con mayor frecuencia alteraciones premalignas y malignas con una incidencia tres veces mayor.

La cavidad bucal es la primera parte del organismo que entra en contacto con el alcohol cuando éste es ingerido y a pesar de que es poco el tiempo que éste permanece en la boca, su absorción comienza a nivel del epitelio de la mucosa. Las Glándulas Salivales son estructuras de origen epitelial, por lo cual podríamos suponer que dichas estructuras pudieran presentar alteraciones histomorfológicas relacionadas al etanol. Sin embargo no se ha reportado ampliamente el efecto del alcohol directamente sobre las estructuras glandulares salivales y su relación con la inmunoexpresión de los factores de crecimiento epidérmicos tipo 1 y 2.

Existen investigaciones en el ámbito de la inmunohistoquímica que han tratado de aclarar la función de los factores de crecimiento como inductores de la reproducción celular en los procesos cancerígenos.^{21, 26, 29} Específicamente las glándulas salivales se han considerado un reservorio de muchos factores de crecimiento en ratón y recientemente se han detectado algunos de ellos en glándulas salivales humanas, como es el caso de EGF y el FGF.⁵⁰ Los receptores de los Factores de Crecimiento pueden ser identificados en las membranas de las

estructuras epiteliales como las glándulas salivales. Se ha encontrado una sobreexpresión de los receptores tipo 1 y2 del Factor de Crecimiento Epidérmico en ratón y en biopsias humanas con relación a procesos tumorales y cancerígenos en diversos tejidos y algunos en glándulas salivales. ⁵¹

4. HIPÓTESIS

La ingesta crónica de alcohol produce alteraciones histomorfológicas en el parénquima de la glándula salival submandibular de ratones.

La ingesta crónica de Alcohol produce cambios en la expresión del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico tipo 1 (HER-1) y en el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico tipo 2 (HER-2) en glándulas salivales submandibulares de ratones.

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Observar los cambios histomorfológicos en el parénquima de las glándulas salivales submandibulares de ratones que fueron alcoholizados crónicamente.

Determinar la inmunoexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico tipo 1 (HER-1) y tipo 2 (HER-2) en glándulas salivales submandibulares obtenidas de ratones alcoholizados crónicamente.

6.2 ESPECÍFICO

Correlacionar los cambios histomorfológicos e inmunohistoquímicos en la expresión de los Receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico tipo I y II con respecto al porcentaje de etanol en ratones alcoholizados crónicamente.

7. METODOLOGÍA

7.1 MATERIAL Y MÉTODOS.

En el presente estudio se utilizaron 25 ratonas hembras adultas de 8 semanas de edad, de la cepa Balb/C que se dividieron en 4 subgrupos experimentales (n=20) y un grupo control (n=5).

Al grupo control se le administró *ad libitum* agua de garrafón durante el tiempo del estudio. A los subgrupos experimentales inicialmente se les suministraron concentraciones de alcohol al 2% y se fue incrementando la concentración cada 2 días hasta alcanzar la concentración destinada para cada subgrupo experimental, siendo las concentraciones finales las siguientes:

Subgrupo 1: Ingesta diaria de alcohol *ad libitum* al 5% (5 ratones)

Subgrupo 2: Ingesta diaria de alcohol *ad libitum* al 10% (5 ratones)

Subgrupo 3: Ingesta diaria de alcohol *ad libitum* al 15% (5 ratones)

Subgrupo 4: Ingesta diaria de alcohol *ad libitum* al 24% (5 ratones)

Ambos grupos se mantuvieron en el Bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en cajas de poliestileno para ratón y en grupos de 5 ratones por caja, bajo un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad, a temperatura ambiente y se alimentaron con alimento comercial duro *ad libitum*.

Diariamente se midió el consumo de líquido en ambos grupos y se calculó el consumo promedio individual por ratón por día.

Al término de la semana 27 se sacrificaron los ratones, obteniéndose tanto las muestras de sangre como las glándulas salivales submandibulares de la siguiente forma:

OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS:

1. Sedación del ratón por medio de éter inhalado.
2. Punción cardíaca para la obtención de muestras de sangre.
3. Vaciado de la muestra en el ependorf y sellado con Parafilm.
4. Centrifugado durante dos ciclos a 3000 rpm por 10 min.
5. Obtención del plasma
6. Congelación de la muestra

TÉCNICA DE ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.

Las muestras séricas obtenidas y congeladas se trasladaron al Instituto de Química de la UNAM para determinar la concentración de alcohol etílico, por medio de un Cromatógrafo de Gases Marca ALIGENT 6890 (CH-LCR-IQUI).

La determinación por cromatografía la realizó la Mtra Carmen Marquez en el Laboratorio de Cromatografía del mismo Instituto.

TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE GLÁNDULAS SALIVALES:

- 1. Sedación del ratón con éter y dislocación cervical.**
- 2. Colocación del ratón en posición supina, con las extremidades, cabeza y cola sujetas.**
- 3. Corte longitudinal en la porción ventral entre las mandíbulas del ratón y la porción torácica para la disección y obtención de ambas glándulas salivales submandibulares,**
- 4. Pesaje y colocación en frascos con solución formalina al 10% y etiquetados.**
- 5. Procesado de los especímenes en forma rutinaria utilizando un Histoquinet.**
- 6. Corte de las muestras embebidas en parafina a 5 micra.**
- 7. Teñido de las laminillas de acuerdo al manual de las Fuerzas Armadas. 47**

Se emplearon 3 laminillas de cada espécimen con diferentes tinciones, como sigue:

- **Primer laminilla: Tinción de Hematoxilina y Eosina**
 - **Segunda laminilla: Procesado inmunohistoquímico con el anticuerpo policlonal EGF-R.***
 - **Tercer laminilla: Proceso de inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal NEU.***
- 8. Observación y análisis de laminillas al microscopio de luz marca Olympus CX31, observando en aumentos de 40 y 100X.**

***Ambos procedimientos se realizaron siguiendo la técnica descrita a continuación:**

TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA:

1. *Desparafinado y rehidratación de los cortes del tejido.*
 - ❖ *Xilol por 10 minutos.*
 - ❖ *Xilol por 10 minutos.*
 - ❖ *Xilol/Alcohol (100% o 96%) por 10 minutos (1:1)*
 - ❖ *Alcohol 100% por 3 minutos.*
 - ❖ *Alcohol 100% por 3 minutos*
 - ❖ *Alcohol 96% por 3 minutos*
 - ❖ *Alcohol 96% por 3 minutos*
 - ❖ *Agua (máximo 5 minutos)*
2. *Enjuague con PBS 0.1 M, ph 7.4*
3. *Recuperación antigénica.con un horno de microondas.*
 - *Se deja hervir durante 3'30".*
4. *Enjuague con PBS 0.1 M.*
5. *Eliminación de la actividad de peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% durante 10 minutos.*
6. *Enjuague con PBS 0.1 M.*
7. *Inmersión en solución de albúmina 2% para bloqueo de sitios de unión inespecíficos del anticuerpo durante 20 minutos.*
8. *Enjuague con PBS 0.1 M.*
9. *Inmersión en solución de Tritón 0.2% durante 10 minutos.*
10. *Enjuague con PBS 0.1 M.*

11. Incubación con Anticuerpo Primario (dilución en PBS) HER-1 y HER-2.

- o Tiempo de reacción: toda la noche en refrigeración a 4°C.

Diluciones utilizadas de cada uno de los anticuerpos:

ANTICUERPO(Anti -)*	ORIGEN	ESPECIFICIDAD	DILUCIÓN
EGF-R	POLICLONAL (conejo)	EGF-R de ratón, rata y humano	1:300
Neu (EGF-R2, HER2, ErbB-2)	MONOCLONAL (ratón)	Neu gp185 de ratón, rata y humano	1:200

*Todos los anticuerpos utilizados son de la marca Santa Cruz Biotechnology. Inc.

12. Enjuague con PBS 0.1 M.

13. Incubación con el anticuerpo secundario (dilución en PBS) durante 1 hora.

- o anti-conejo a dilución de 1:100 para laminillas que recibieron EGF-R
- o anti-ratón a dilución de 1:100 para laminillas que recibieron HER2

14. Enjuague con PBS 0.1 M.

15. Revelado con kit de Diaminobencidina (DAB) como cromógeno, siguiendo las instrucciones del fabricante.

16. Deshidratación y contratinción con hematoxilina de Gill.

- o Lavar laminillas con agua corriente durante 5 minutos.
- o Colocar laminillas en un coplin con hematoxilina de Gill (para contraste de núcleos) 1 o 2 baños.
- o Enjuagar con agua limpia dentro de un coplin (mínimo dos veces).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Deshidratación:
 - ❖ *Alcohol 96% por 3 minutos*
 - ❖ *Alcohol 96% por 3 minutos*
 - ❖ *Alcohol 100% por 3 minutos.*
 - ❖ *Alcohol 100% por 3 minutos*
 - ❖ *Xilol/Alcohol (100% o 96%) por 5 minutos (1:1).*
 - ❖ *Xilol por 5 minutos (primer lavado).*
 - ❖ *Xilol por 10 minutos (segundo lavado).*
- Montaje con resina.

Todos los procedimientos de inmunohistoquímica fueron realizados con controles positivos (adenocarcinoma) para garantizar la efectividad y buen manejo de la técnica.

7.2 MUESTRA.

25 ratones hembras de la cepa Balb/c.

7.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Ratones hembras, sanas y vírgenes.

Ratonas de 8 semanas de edad.

Ratonas de 19-21 g de peso al inicio del estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Ratones hembras enfermas durante el periodo del estudio.

7.5 VARIABLES.

7.5.1 INDEPENDIENTES

Cambios histológicos en el parénquima de las glándulas submandibulares.

Inmunoexpresión del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico tipo1 (HER-1).

Inmunoexpresión del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico tipo2 (HER-2).

7.5.2 DEPENDIENTES

Concentraciones de alcohol al 5%, 10%, 15% y 24%, edad y peso.

7.6 ESCALA DE MEDICIÓN.

En el caso de las laminillas para inmunohistoquímica se utilizó una escala ordinal de medición como sigue:

INMUNOEXPRESIÓN	
Presencia de inmunoexpresión	(+)
Ausencia de inmunoexpresión	(-)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

7.6.1 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

El análisis de resultados histológicos fue de tipo cualitativo, por lo que no se utilizó ningún paquete estadístico de análisis. Los resultados inmunohistoquímicos y los de Cromatografía fueron analizados con estadística descriptiva, mediante el paquete EXCEL Microsoft Office 2000 para P.C.

7.6.2 RECURSOS.

7.6.2.1 MATERIALES

- o Bioterio del Posgrado de Odontología e Investigación UNAM
- o Cajas para ratón con sus tapas.
- o Botes dispensadores de agua.
- o Alcohol etílico anhidro al 95% marca J. T. BAKER ACS. 9000-03 México
- o Agua destilada embotellada THEISSIER WATER. MR. México
- o Aserrín para cambio de camas.
- o Un estuche de disección Hu-Friedy Alemania.
- o Una balanza granataria electrónica marca CHYO M P-3000 cap. 3100g
- o Formaldehído marca J. T. Baker ACS México.
- o Parafina PARAPLAST 1Kg OXFORD 8889-502004 St. Luis M.o. U.S.A.
- o Microtomo American Optical 820
- o Portaobjetos 25x75 mm esmerilados MADESA
- o Cubreobjetos 24x40 mm MADESA
- o Tren de tinción Hematoxilina Eosina
- o Anticuerpo monoclonal específico para NEU marca Santa Cruz Biotechnology. Inc. U.S.A

- Anticuerpo policlonal para EGF-R marca Santa Cruz Biotecology. Inc. U.S.A.
- Set 3,3'- Diaminobencidina líquida marca SIGMA 122K1332 Alemania
- Peróxido de hidrógeno al 30% 500 ml marca J.T BAKER 2186-01 México.
- Albumina Bovina Libre de IgG 25g SIGMA 50K09151 Alemania
- Imm Edge Pen VECTOR H-4000 Burlingame, CA
- Acido cítrico Monohidrato Polvo 500g J.T. BAKER 0118-01 México
- Citrato de sodio dihidrato Granular 500g J.T. BAKER 3646-01 México
- Fosfato Monosódico $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ J. T. BAKER 21343 México
- Fosfato Disódico Na_2HPO_4 FISHER Scientific company S-374 E.U.A.
- Cloruro de Potasio Cristal J. T. BAKER 3330400-01 México
- Cloruro de Sodio Cristal J. T. BAKER 3624-01 México
- Microscopio de luz OLYMPUS CX31.
- Microondas MAGIC CHEF 900W MCD790SW.
- Jeringas de insulina desechables.
- Ependorf plástico desechables 0.5ml SIGMA-ALDRICH T5149
- Centrífuga marca EPPENDORF 5415C
- Cromatógrafo de Gases marca ALIGENT 6890 (CG-LCR-IQUI) del Instituto de Química UNAM.
- Computadora personal marca LG52X Max
- Cámara digital OLYMPUS C-3040 ZOOM
- Impresora Hewlett Packard Lasser Jet 1100

7.6.2.2 HUMANOS

- Dr. Juan Carlos Hernández Guerrero. *Tutor de tesis* (Titular Laboratorio de Inmunología del la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología UNAM)
- Dr. Constantino Ledesma Montes. *Análisis Histológico* (Patólogo División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología UNAM)
- M.C. Carmen Marquez. *Análisis Cromatográfico* (Investigadora del laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la UNAM)
- C.D. Ma. Dolores Jiménez Farfán. *Análisis inmunohistoquímico* (Profesor, Facultad de Odontología UNAM)
- MVZ. Héctor Alfonso Malagón Rivero. *Asesoría en manejo de animales* (Bioterio del Instituto de Fisiología Celular UNAM)
- Sr. Teodomiro Pérez Salazar. *Procesado de muestras* (Técnico en Histopatología del la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología UNAM)
- Sr. Juan Manuel Trejo Ramírez *Cuidado de Animales* (Ayudante de Bioterio del la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología UNAM)

7.6.2.3 FINANCIEROS

El estudio fue financiado por el Laboratorio de Inmunología del la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología UNAM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.7 DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental.

8. RESULTADOS.

CONSUMO DE ALCOHOL:

Observamos que al incrementar las concentraciones de alcohol, hubo una disminución en los mililitros consumidos. El subgrupo alcoholizado al 5% consumió un promedio de 3.1 ml \pm SD 0.5, los que estuvieron al 10% consumieron en promedio 2.9 ml \pm SD 0.3, los que se encontraban al 15% consumieron 2.3 ml \pm SD 0.7 y el subgrupo 4 alcoholizados al 24% consumió 1.6 ml \pm SD 0.6. Ver Tabla 1. Ver Gráfica 1.

Tabla 1.		
CONSUMO PROMEDIO DE ALCOHOL POR RATON		
% OH	Consumo Prom.	X \pm SD
5%	3.19727273	0.51865385
10%	2.93363636	0.33100673
15%	2.39454545	0.79595683
24%	1.69818182	0.66315636

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



CROMATOGRAFÍA:

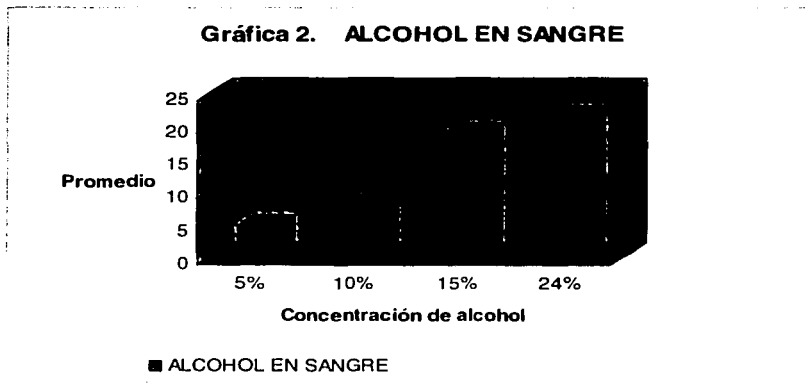
Mediante la Cromatografía observamos que en los subgrupos experimentales se encontró etanol en la sangre de los ratones alcoholizados y éste aumenta de acuerdo con las concentraciones administradas. Dicho incremento no fue constante para todos los animales del mismo subgrupo que se alcoholizaron a la misma concentración. Tabla 2. Ver Gráfica 2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2.

**ALCOHOL EN SUERO
CROMATOGRAFÍA
DE GASES.**

% OH	[] Prom. Alcohol	X̄ ± SD
5%	5.11286649	2.87218709
10%	8.15334447	3.58238999
15%	19.118494	1.27188602
24%	21.7361659	5.59476143



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HISTOPATOLOGÍA:

Controles: Se observa buena arquitectura celular y conductal en ambos tipos celulares (foto No. 1 y 2).

Los cambios que se presentaron en las glándulas submaxilares de los grupos experimentales fueron: En el subgrupo alcoholizado al 5% en células serosas se observaron zonas intracelulares con vacuolización citoplásmica (foto No. 3) mientras que en células mucosas no se apreciaron cambios significativos. (foto No. 4) En el subgrupo alcoholizado al 10% se apreció que en las células serosas hubo un aumento en la relación núcleo- citoplasma, vacuolización citoplásmica (foto No.5), en tanto que en la porción mucosa apreciamos pérdida de arquitectura de los conductos estriados, aumento de la relación núcleo- citoplasma y rechazo periférico de los núcleos (foto 6). Con respecto al subgrupo al 15% encontramos en células serosas vacuolización citoplásmica abundante, pérdida de límites celulares y granulación citoplásmica difusa (foto No.7). En células mucosas límites celulares difusos granulación citoplásmica difusa, vacuolización citoplásmica e incremento del tamaño celular. (foto No.8). Al 24% en células serosas los conductos estriados presentaron pérdida de arquitectura generalizada y límites difusos, abundante vacuolización citoplásmica y granulación citoplásmica difusa (foto No.9). En células mucosas los conductos estriados presentaron límites difusos, pérdida de arquitectura tanto en acini como en conductos estriados, disminución en el número de gránulos de cimógeno, abundante vacuolización citoplásmica, además de pérdida de núcleos celulares (foto No.10).

GRUPO CONTROL



Foto 1. Zona serosa grupo control H/E 100X Buena arquitectura celular y límites definidos. Núcleos con forma y disposición regular.



Foto 2. Zona mucosa grupo control H/E 100X. Arquitectura celular y límites definidos. Arquitectura ductal conservada.

GRUPO EXPERIMENTAL 5%

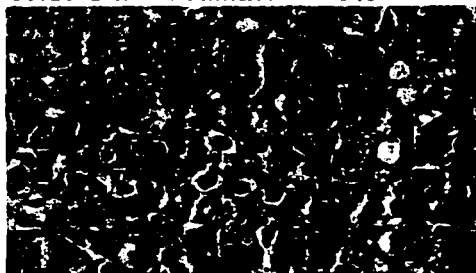


Foto 3. Zona serosa grupo alcoholizado al 5% H/E 100X Flecha señala vacuolización citoplásmica.

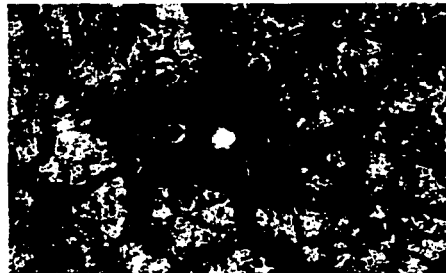


Foto 4. Zona mucosa grupo alcoholizado al 5% H/E 100X Flecha señala conducto estriado sin cambios.

GRUPO EXPERIMENTAL 10%

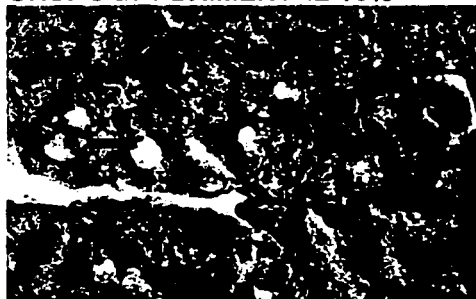


Foto 5. Zona serosa grupo experimental 10% H/E 100X Aumento de la relación núcleo-citoplasma. Flecha señala vacuolización citoplásmica.



Foto 6. Zona mucosa grupo experimental 10% H/E 100X Aumento de la relación núcleo-citoplasma y rechazo periférico de núcleos (flecha). Arquitectura conductal difusa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRUPO EXPERIMENTAL 15%

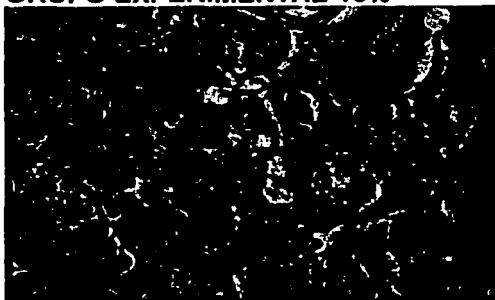


Foto 7. Zona serosa grupo experimental 15%
100X H/E células y conductos estriados, con
vacuolización citoplásmica (flecha).



Foto 8. Zona mucosa grupo experimental 15%
100X H/E con límites intracelulares difusos
(flecha)

GRUPO EXPERIMENTAL 24%

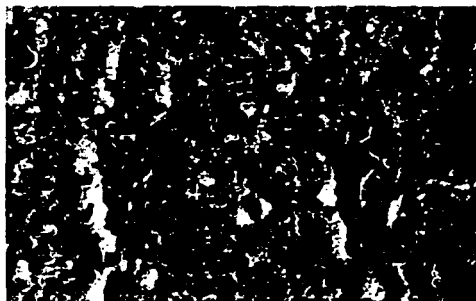


Foto 9. Zona serosa grupo experimental 24%
H/E 100X Pérdida de arquitectura generalizada
y límites celulares difusos, flecha.



Foto 10. Zona mucosa grupo experimental 24%
H/E 100X Pérdida de arquitectura acinar y
ductal, abundante vacuolización citoplásmica
flecha.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INMUNOHISTOQUÍMICA:

En las glándulas submandibulares del grupo control, la inmunoexpresión del HER-1 y HER-2 se presentó en vasos, conductos interlobulares y estriados, tanto en áreas serosas como en zonas mucosas. (foto No.11 a 14)

En los subgrupos de 15 y 24% tanto las zonas serosas como las mucosas ambos receptores incrementaron su inmunoreactividad, con relación al incremento de las concentraciones de alcohol y a la magnitud de los hallazgos histológicos (cambios degenerativos). (fotos No.15 a 18) El incremento de la Inmunoexpresión fue más marcado con HER-2 al 15 y 24%, en glándulas serosas, mientras que con el HER-1 se presentó un incremento en la inmunoreactividad ligeramente apreciable desde el subgrupo alcoholizado al 5%, hasta el subgrupo alcoholizado al 24%. Se apreciaron mayores cambios en glándulas mucosas al 15 y 24% con HER-1 (fotos No.16 y 18) que con HER-2 (fotos No. 20 y 22)

GRUPOS CONTROL HER-1

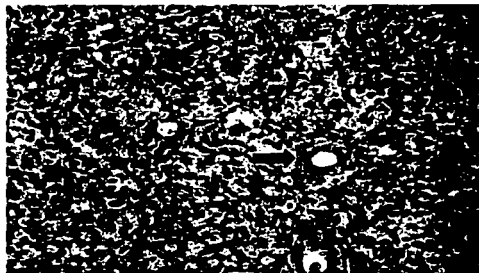


Foto 11. Zona serosa control inmunotinción HER-1 40X Flecha señala conducto estriado con marcaje.

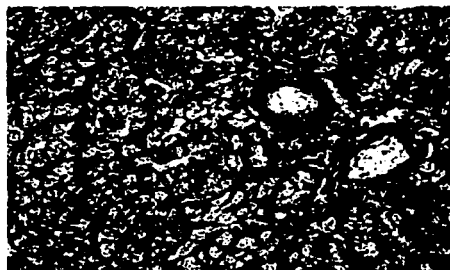


Foto 12. Zona mucosa control inmunotinción HER-1 40X Flecha señala capilar sanguíneo con marcaje.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRUPOS CONTROL HER-2

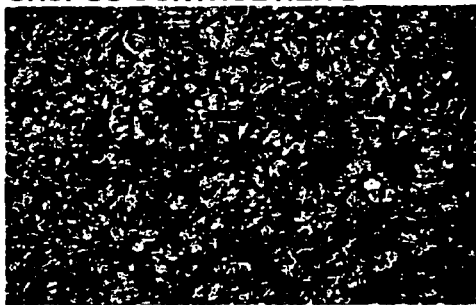


Foto 13. Zona serosa control. Inmunotinción HER-2 40X Flecha señala conducto estriado con marcaje.

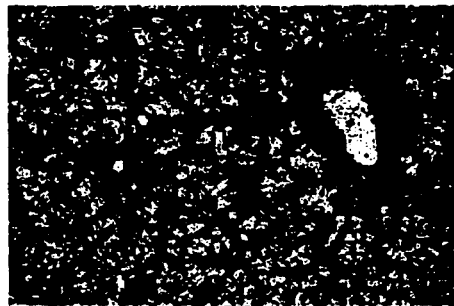


Foto 14. Zona mucosa control inmunotinción HER-2 40X Flecha señala conducto estriado con marcaje.

GRUPOS EXPERIMENTALES HER-1

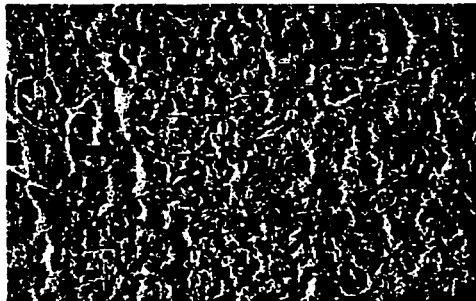


Foto 15. Zona serosa (15%) 40X. Conductos estriados con inmunoreactividad a HER-1 señalado por flecha.

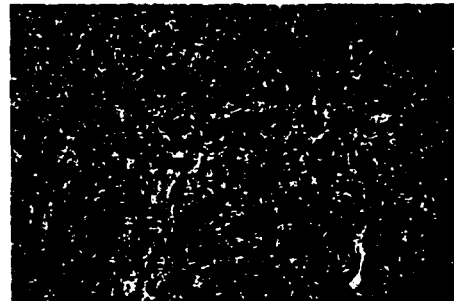


Foto 16. Zona mucosa (15%) 40X. Marcaje con HER-1 en conductos y células. Señalado por flecha.

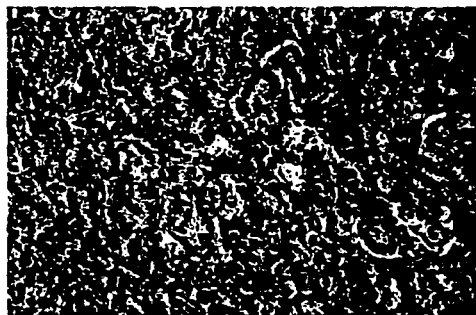


Foto 17. Zona serosa (24%) 40X marcaje con HER-1 en conductos estriados marcado con flecha.

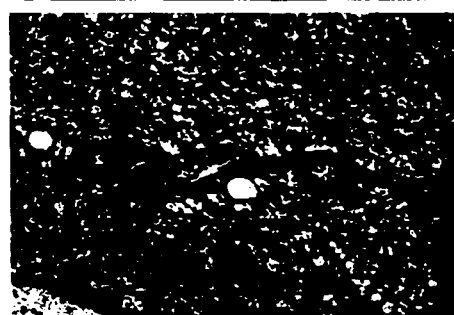


Foto 18. Zona mucosa (24%) 40X. Marcaje celular y en conductos con HER-1 señalado por flecha, relacionado a cambios

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRUPOS EXPERIMENTALES HER-2

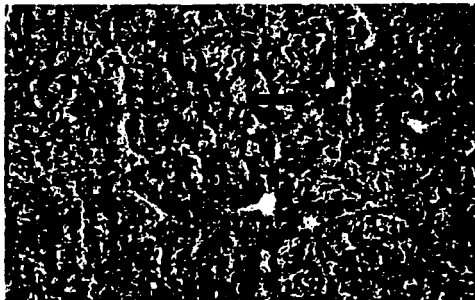


Foto 19. Zona serosa (15%) 40X marcaje con HER-2 en conductos y capilares sanguíneos. Señalado por flecha.



Foto 20. Zona mucosa (15%) 40X marcaje con HER-2 en conductos estriados. Señalado por flecha.

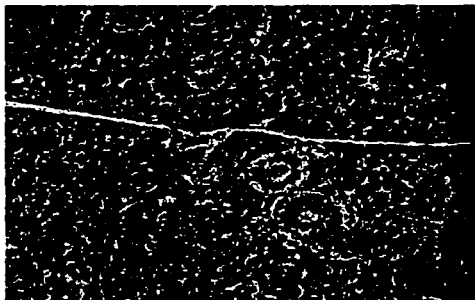


Foto 21. Zona serosa (24%) 40X marcaje con HER-2 limitado a conductos y capilares sanguíneos. Señalado por flecha.

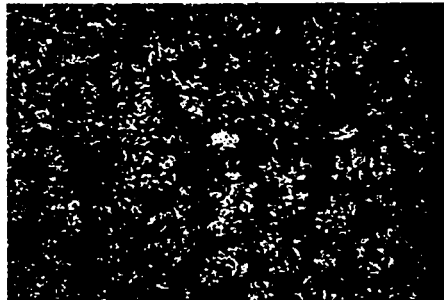


Foto 22. Zona mucosa (24%) 40X marcaje con HER-2 en conductos estriados y capilares sanguíneos. Señalado por flecha.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

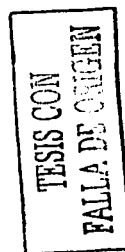
9. DISCUSIÓN.

El consumo crónico de etanol ha sido asociado con deterioro sistémico y local; en cavidad bucal diversos estudios han relacionado el consumo de etanol con alteraciones del epitelio de la mucosa bucal así como de la función de las glándulas salivales mayores y menores.^{8, 24}

Los niveles de alcohol en sangre son un dato importante para la extrapolación de los hallazgos de animales a humanos. En la mayoría de los estudios en animales la dosis de alcohol administrada, debe ser mayor para obtener resultados semejantes a los que puedan ocurrir en humano. Para poder explicar la razón por la cual los porcentajes de alcohol en los animales son muy altos, podemos decir que tanto la rata como el ratón son capaces de metabolizar el alcohol en un rango de 300 a 550 mg /kg /hr respectivamente, mientras que el humano metaboliza a razón de 100mg /kg/ h.¹⁰

En nuestros grupos experimentales, el consumo de líquido fue disminuyendo en relación al incremento de la concentración de alcohol. Estudios en animales han confirmado que el genotipo es una variable importante en la determinación de preferencias por un alto o bajo consumo de alcohol en determinadas cepas de ratas o ratones,⁵² lo cual podría confirmar las diferencias de ingesta de alcohol en nuestro estudio.

La cromatografía de gases es un método eficaz, reportado como procedimiento para la detección y determinación cuantitativa de una sustancia en una mezcla.⁵
^{52, 53} Para poder determinar un alcoholismo crónico es necesario saber los niveles de alcohol en sangre por lo cual se utilizó el método de cromatografía de gases, lo cual concuerda con otros estudios realizados en animales.^{53, 54}



La diferencia en la concentración de alcohol en sangre puede obedecer a diversos factores, entre ellos el tiempo de metabolismo y eliminación del etanol sanguíneo, así como a que la distribución del etanol en el organismo está en función de la cantidad de líquidos del organismo,^{4,6,8} así como a la talla y peso.

Histomorfológicamente en las células acinares y en algunas de los conductos estriados observamos vacuolización intracitoplásmica forma de pequeñas áreas vacías, lo cual concuerda con lo reportado por diversos autores a nivel glandular.^{55,56,57} Esto puede deberse al metabolismo del etanol por vía de la ADH, la cual da como resultado un incremento en la relación NADH/NAD, favoreciendo las reacciones de reducción, como son la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos e inhibiendo la degradación de ácidos grasos.^{5, 12, 56}

El hallazgo sobre los límites celulares difusos puede deberse a la disminución de la producción y síntesis de proteínas entre ellas las lipoproteínas, componente esencial de las membranas celulares, como efecto de la administración de etanol, hallazgo que ha sido reportados como efecto del alcohol por algunos autores.¹² Adicionalmente, encontramos una pérdida de arquitectura ductal con pérdida de límites en algunos casos.

La granulación citoplásmica difusa puede ser consecuencia de una disminución en la síntesis de mucopolisacáridos; el desarreglo de la arquitectura acinar, el rechazo periférico de núcleos y el aumento en la relación núcleo-citoplasma son datos que concuerdan con lo que ha sido reportado en investigaciones que relacionan el efecto del etanol a nivel de la morfología celular, sin dar opinión del porqué.^{55, 56}

FALLA DE ORIGEN

La familia de receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico tiene un papel importante en la red de señalización que controla el crecimiento y diferenciación celular. La inmunexpresión del HER-1 en condiciones normales ha sido estudiada, *in vivo e in vitro*, en células neonatales principalmente y en algunas células adultas.³⁸

El receptor HER-2 en condiciones de normalidad se ha reportado que su expresión es a nivel de la membrana celular de células epiteliales. Sin embargo bajo condiciones de alcoholización no existen reportes que determinen los parámetros de inmunexpresión de ambos receptores en glándulas salivales de ratones adultos.⁵⁸ En nuestro estudio encontramos que la inmunexpresión del HER-1 y HER-2 en el grupo control fue referida a vasos, conductos interlobulares y estriados en glándulas salivales de ratones alcoholizados.

Nuestros resultados demuestran que existe una variación en la inmunexpresión y se encuentra asociada a los cambios histológicos de las glándulas salivales. Esto puede ser consecuencia de una alteración en los receptores celulares, puesto que si el alcohol afecta las membranas celulares es posible que el número o la afinidad de los receptores HER-1 y HER-2 hayan sido modificados, ya que éstos se ubican en las membranas.³⁸ Un mecanismo propuesto para explicarlo consiste que el proceso de internalización y reciclaje de los receptores, haya sido alterado, con lo que se favorece la permanencia de éstos sobre la superficie celular.

10. CONCLUSIÓN.

En nuestro estudio se concluye que a medida que se aumenta la concentración de alcohol, se ve un incremento en los cambios histomorfológicos, así como en la inmunexpresión del receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico tipo 1 y 2 en las glándulas salivales de ratones alcoholizados. Ello puede estar ligado a un incremento de la síntesis de las proteínas de los receptores o bien a una alteración en el mecanismo que los endocita para su degradación, lo que a su vez generará señales diversas dentro de la estructura glandular.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Banks William J. Histología veterinaria aplicada. México: Manual Moderno; 1993: 513-518.
2. Shar P. Patrick, La Regina Marie. The Laboratory Rat. A volume in the Laboratory animal pocket reference series. USA: CRC Press; 1998: 3-5.
3. Gerg J. Krinke. The handbook of experimental animals. USA: Academic Press; 2000: 259, 308.
4. URL: <http://www.Intox.com/abuct.alcohol.sp.asp>
5. Taligaro F, Lubli G, Ghielmi S, Franchi D, Marigo M. Chromatographic methods for blood alcohol determination. Journal of Chromatography 1992, 580: 161-90.
6. Estes N.J. Alcoholismo: desarrollo, consecuencias y tratamiento. España, Interamericana, 1989: 97-210.
7. Eros KI. Alcohol en la alimentación. Afecta al organismo más de lo que creemos. Consumer [serial online] 2002. Dec. 61 (1) [4 screens] available from: URL: <http://www.revista.consumer.es/web/es>
8. J.A. Banderas y L.A: Gaitán. Las glándulas salivales parótidas y su relación con el alcoholismo crónico. P.O. 1992. Vol. 8, No. 1:14-16.
9. Gioranni Ruiz. El alcohol. La ventana [serial online] 2003 Feb. (1) [3 screens] available from URL: <http://www.laventana.info/articulo.php>
10. Abel, E. L.: Procedural considerations in evaluating prenatal effects of alcohol in animals. Neuobehav. Toxicol. 2: 167-174. 1980.
11. Litter Maqunel. Farmacología Experimental y Clínica. Argentina: El ateneo; 1975: 208,209.

12. Triana M. H. Alteraciones metabólicas en el alcoholismo. *Revista Cubana Aliment Nutr* 1996; 10 (1):1-8.
13. Grant D. A. D.D. *Periodoncia*. México: Mundi; 1983:187-210.
14. Bravo F. A., Bravo J. M. Plasencia, Consumo moderado de bebidas alcohólicas: salud y civilización. Unas Curiosidades sobre etanol, químicos del principado. 1997; 34: 1-4.
15. Chandia Ramos Rolando. Estudio clínico del disulfam en suspensión inyectable como alternativa de tratamiento en alcoholismo [serial online] 2002 Jan [6 screens] available from URL: [http:// www.eradicaciones.org/revista/numero3/disulera.html](http://www.eradicaciones.org/revista/numero3/disulera.html).
16. Estruch R, Nicolas JM, Villegas E, Junque A, Urbano Marquez A. Relationship between etanol- related diseases and nutritional status in chronically alcoholic men. *Alcohol* 1993; 28: 543-50.
17. Klesges RC, Mealer CZ, Klesges LM. Effects of alcohol intake on resting energy expenditure in young women social drinkers. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 805-9.
18. Third Annual Meeting of the alcohol and Drug Abuse Immunology Symposium, Alcohol effects on the immune system. *Alcohol* 1993; 10: 335-42.
19. Wang Y, Watson RR. Ethanol, immune responses and murine AIDS: the role of vitamin E as an immunostimulant and antioxidant. *Alcohol* 1994; 11: 75-84.
20. Goldbohm RA, Van den Brandt PA, Van't Veer P, Dorant E, Strumans F, Hermus RJ. Prospective study on alcohol consumption and the risk of cancer of the colon and rectum in the Netherlands. *Cancer Causes Control* 1994; 5: 95-104.
21. Tonnensen H, Petersen KR, Hojgaard L, Stokholm KH, Nielsen HJ, Kingge UP, et al. Postoperative morbidity among alcohol abusers. *Ugeskr Laeger* 1994; 156: 287-90.

22. Hoyumpa. Alcohol and thiamine metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 1983; 7: 111-44.
23. Laposata M. Assesment of ethanol Intake. Current test and New assays on the horizon. *Am J Clin Pathol.* 1999.112:443-450.
24. Hessewl D.W., Ph. D. and Modgling F.R., M.D. The Quantitative Determination of Ethanol and Other Volatile Substances in Blood by Gas- Liquid Partition Chromatography. *J. Foresnsic Sci.* 1964; 9 (2): 255-264.
25. Parker K. D., Fontan Ch. R, Yee J.L. and Kirk P. L. Gas Chromatographic Determination of Ethil alcohol in Blood for Medicolegal Purposes. Separation blood other volatiles from Blood or aqueos Solution. *Analytical Chemstry.* 1962; 34(10): 1234-37.
26. Bendtsen P., Hultberg J., Carlsson M., and Jones A. W. Monitiring ethanol Exposure in a Clinical setting by Analisis of Blood, Breath, Saliva and Urine. *Alcohol Clin and Exp Res.* 1999; 23 (9): 1446-1451.
27. Glenn E. Rohrer Brian A. McMillen. "Calculation Of Blood Alcohol Concentrations in criminal Defendants"- Level & Effects East Carolina University p. 1-7
28. Heath J.K., Growth Factors, Ed. IRL Press, England, 1993.
29. Canalis E, McCarthyT, Centella M. Growth Factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest .*1998; 81:277-81.
30. Lynch SE, Williams RC, Polson AM, et al. A combination of platelet-derived and insuline-like growth factors enhances periodontal regeneration. *J. Clin Periodontol* 1989; 16:545-48.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

31. Bradshaw, R A, Ralph A, Steve P. Oncogenes and growth factors. England, Elsevier, 1987: 123-95.
32. Luger T, Shwarz T. Epidermal growth factors and cytokines. USA, Dekker, 1994.
33. Mc Kay Y, Leight Y. Growth factors. Great Britain, A Practical approach, 1993.
34. Neve R.M. Lane H.A. and. Hynes N.E. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol.* 2001;12 (suppl. 1): S9-S13.
35. Daly R. J.. Take Your Partners, Pease- Signal Diversification by the erbB Family of Receptor Tyrosine Kinases. *Growth Factor* 1999; 16: 255-263.
36. Rubin and Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol.* 2001;323 (Suppl. 1): S3-S8,
37. Bouguris P. and Elder J. B. Epidermal Growth Factor Receptor and Transformation.. *Surg Today.* 2002; 32: 667-671.
38. Gresik E. W. Kashimata M. Kadoya Y, Mathews R, Minami Yamashinas S. Expresion of Epidermal Growth Factor Receptor in Fetal Mouse Submandibular Gland Detected by Biotinylytyramide- based catalized Signal Amplificaton Method. *J. Histochem Cytochem* 1997;45 (12): 1651-1657.
39. Yuan- Fang Chen, Zuo- Liang Xiao, Guo- Jun Lu, Hui- Xin Wang and liang- Won Cai. The role of EGF and its receptor in the Growth of Human Gastric Carcinoma Cell line (MG-C80): Evidence for an autocrine Mecanism. *Growth Factors Peptides and Receptors*, Edited by T.W. Moody Plenum Presss New York, 1993.
40. Stenaman G. Sandros J. Mordkvis A. Mark J. and Sahlin P. Expression of the ERBB2 protein in bening and malignant salivary gland tumors. *Genes, Chromosomes Cancer.*1991; 3 (2):128-135.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

41. K. Semba, N. Kamata, K. Toyoshima and T. Yamamoto. A v-erbB- related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/ epidermal growth factor-receptor genen and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. Proc. Natl. acad. Sci.1985; 82: 6497-6501.
42. Lupu R, Colomer R, Kannan B and Lippman M.E. Characterization of a Growth factor that binds exclusively to he erb B-2 receptor and induces cellular responses. Proc. Natl. Sci. 1992;89: 2287-91.
43. Bireck C. Lui E. Jordan R.C. and Dardick I. Análisis of c-erbB-2 Amplification in Salivary Gland Tumors by Differential Polimerase Chain Reaction. Oral Oncol, Eur J Cancer. 1994; 30B (1):47-50.
44. Shintani S, Funayama T, Yoshimata Y, Alcade R E, Otusukik, Terakado N, Matsumura I. Anticancer Res.1995; 15(6B): 2623-2626.
45. Hellquist HB, Karlsson MG, Nilsson C. Salivary Duct Carcinoma a Highly aggressive Salivary Gland Tumor with overxpression of c-erbB-2. J. Pathol. 1994; 172 (1) :35-44.
46. Peter Jatlow. M.D. Acute Toxicology of Ethanol Ingestion. Role of the Clinical Laboratory A.J.C.P. november p.p. 720-721. 1980.
47. Prophet B. E. Mills B. Métodos Histotecnológicos, Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Washington D.C. 1992. p. 55-59 y 156-157.
48. Medios Masivos, Publicidad y Adicciones. Janine Rodiles Hernández, Juventud y Adicción, p.26-27 Ago 2000.
49. Secretaría de Salud, Programa de Acción: Adicciones, Alcoholismo y Abuso de Bebidas Alcohólicas, México, 2001; 5-6.

50. Kagami H. Hiramatsu Y. Hishida S. Okazaki Y. Horie K. Oda Y. and Ueda M. Salivary Growth Factors in health and disease. *Adv. Dent. Res.* 2000; 14: 190-102.
51. R.M. Neve, H A Lane y N.E. Hyes The role of overexpressed HER_2 in transformation.. *Annals of oncology* 2001;12 (sup 1): S9-SH3,
52. Elmer G. I., Meisch R.A. And George F.R. Differential Concentration- Response Curves for Oral Ethanol Self-administration in C57BL/6J and BALB/cJ Mice. *Alcohol*, 1987;4: 63-68.
53. Hessel, D.W. and Modglin, F.R. The quantitative determination of ethanol and other volatile substances in blood by gas-liquid partition chromatography. *J. Forensic Sci.* 1964; 9: 255-264,
54. Hernandez J.C. Morphologic effects of maternal alcohol intake on skull, mandible and tooth of the offspring in mice. *Japanese Journal of Oral Biology.* 1990;32.4
55. Banderas J.A. Gaitán L.A. Portilla J. and Aguirre A. Effects of Chronic Ethanol Consumption on the Rat Parotid Gland. *Archs Oral Biol.* 1992; 37 (1): 69-72,
56. H. Mailer, I.A. Born, S. Vieth, D. Alder, and H. K. Seitz. The Effect of Chronic Ethanol Consumption on salivary Gland Morphology and Function in the Rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 1986.10 (4)
57. Severgnini M. Ferraris M.E. Carranza M. Nucleolar organizer regions (NORs) evaluation of lingual salivary glands of chronic alcoholic. *J Oral Pathol Med.* 2002.31: 585-9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

12. ANEXO 1.

SOLUCION PARA INMUNOTINCIÓN.

SOLUCIÓN BUFFER DE CITRATOS.

Amortiguador de citratos 10um pH 6.

SOLUCIÓN A stock ácido 0.1 M: Pesar 1.9213 g de ácido cítrico y aforarlo al 100 ml

SOLUCIÓN B stock base 0.1 M : Pesar 2.9411 g de citrato de sodio y aforarlo a 100 ml

SOLUCIÓN TRABAJO: Tomar 9 ml de sol. A y 41 ml de sol B y aforarlo a 500 ml con agua desionizada.

Almacenar en un recipiente de vidrio a 2 – 8 °C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

13. GLOSARIO.

ANTICUERPO: Es una glicoproteína del suero que se une específicamente y con alta afinidad al antígeno, formada por la exposición al antígeno. La producción de anticuerpos se genera como respuesta del cuerpo hacia un material extraño o antígeno, con el objeto de eliminarlo.

ANTICUERPOS MONOCLONALES: Son capaces de reaccionar selectivamente con un epítoto específico en el antígeno contra el cual fueron hechos, son secretados por inmunoglobulinas de progenie clonal de un plasma híbrido, teniendo identidad molecular, antigenicidad específica idéntica y afinidad de unión

ANTICUERPOS POLICLONALES: Son producto de la inmunización de animales, poseen múltiples especificidades y afinidades de unión. Debido a que los anticuerpos policlonales son generados por diferentes células, son inmunohistoquímicamente desiguales y reaccionan con varios epítopes sobre el antígeno contra el cual son creados.

ANTIGENO: Es una molécula generadora de una respuesta, al estimular la formación de anticuerpos específicos, mismos que a su vez pueden reaccionar con el anticuerpo producido. La porción del antígeno que reacciona con un anticuerpo es el determinante antigénico específico, o epítoto.

INMUNOHISTOQUÍMICA: Técnica empleada para detectar la presencia de un antígeno específico en cortes histológicos de tejido, utilizando un anticuerpo acoplado a una enzima específica al antígeno, permitiendo observar componentes celulares imperceptibles mediante los métodos rutinarios.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.

Este trabajo fue presentado en el Congreso de la IADR (International Association Dental Research) en Gotemburgo, Suecia, el 27 de Julio del 2003. Título: **Effects of Chronic Alcohol Consumption on mice Submandibular Salivary Glands.** **K. RUÍZ-VERGARA, D. JIMÉNEZ-FARFÁN, C. LEDESMA-MONTES AND J.C. HERNÁNDEZ-GUERRERO** (Facultad de Odontología. Universidad Nacional Autónoma de México)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN