



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PRUEBA ESCRITA DEL PROGRAMA DE TITULACIÓN POR ALTO PROMEDIO (TAP)

**DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDÉRMICO Y RECEPTOR DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO EPIDÉRMICO EN DIFERENTES
ETAPAS DEL DESARROLLO GLANDULAR.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A

JESICA PAMELA NAVA GONZÁLEZ

TUTORA: DRA. SANTA PONCE BRAVO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A las personas más importantes de mi vida, a mis papas por todo su apoyo incondicional que me han brindado, por todos sus sufrimientos y esfuerzos que han hecho para poder realizarme, y gracias a ustedes soy toda una profesionalista. Espero que se sientan orgullosos de mi así como yo estoy de ustedes. Los amo!!!

Mamá gracias por todo el amor y apoyo incondicional que me has dado y le doy gracias a Dios por tener la mejor mamá que alguien pudiera querer y sé que siempre estarás ahí apoyarme, te admiro muchísimo mamá, *"Te amo"*.

Papá gracias por ser una persona de respeto y admiración, aunque no lo creas he aprendido muchas cosas de ti. Gracias por todo tu apoyo y amor incondicional que me das y por todo lo que haces por nosotras, *"Te amo papi"*.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por haberme dejado existir y ser quien soy hasta ahorita.

Gracias a la UNAM por permitirme estudiar en la mayor casa de estudios y por todas las enseñanzas y amistades que me dejó.

Gracias a mis hermanas, Karla, Julia y Alma por su amor y apoyo incondicional que me han dado en todo este proceso de mi vida. Las quiero muchísimo hermanitas! En especial a mi hermana Karla por las enseñanzas y regaños que me brindó durante la carrera y en esta nueva etapa de la vida, te amo Kar.

Gracias a mis tías las González por preocuparse día con día por nosotras, así como también quiero agradecer a mi tío Liborio Ramírez y a mi primo Alfonso Ocampo por todo su apoyo.

Gracias a mi tía Yola Nava por todos sus cuidados y preocupaciones que me dedicó, eso nunca tendré con que pagárselo tía.

Gracias a Pakito por todo el cariño y apoyo que me ha brindado desde el momento que lo conocí, eres una persona especial en mi vida. Gracias por todo lo que has hecho por mí, t...

Gracias a la Dra. Santa Ponce Bravo y al MCD. Israel Morales Sánchez por todo las enseñanzas, regaños, consejos que me han brindado, no son solo mis tutores y profesores son en realidad unos verdaderos amigos que he encontrado. Gracias por todo lo que me han apoyado.

Gracias al C.D. Luis Vázquez por su paciencia y enseñanzas que me dio para la realización de este proyecto, que hubiera hecho sin ti Luisito.

Gracias a todos mis amigos de la carrera por sus alegrías, tristezas y aventuras que pasamos en este tiempo, en especial a Dennise, Tatiana y Mildred, las quiero niñas.

Gracias a mi amiga Sofía por toda la ayuda y apoyo que me brindo en estos 5 años, te quiero mucho amiga.

Gracias a mis amigos del servicio social, Emmanuel y Abraham, por todos aquellos momentos que pasamos por las tardes en el laboratorio y por su amistad. Los quiero amiguís.

ÍNDICE

	PÁGINA
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. MARCO TEÓRICO	4
A) ANTECEDENTES	4
B) GENERALIDADES	5
1. GLÁNDULAS SALIVALES MAYORES Y MENORES	5
1.1 Glándulas salivales mayores	5
1.2 Glándulas salivales menores	5
2. GLÁNDULAS SALIVALES SEROSAS, MUCOSAS Y MIXTAS	6
2.1 Serosas	6
2.2 Mucosas	6
2.3 Mixtas	7
C) ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR	8
1.1 Conducto submandibular	8
D) EMBRIOLOGÍA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES	10
E) ETAPAS DE DESARROLLO DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES	12
ETAPA 1	12
ETAPA 2	12
ETAPA 3	13
ETAPA 4	14
ETAPA 5	15
ETAPA 6	16



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

F) BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR	18
G) HISTOLOGÍA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES	19
1. PARÉNQUIMA GLANDULAR	19
1.1 Acinos serosos	19
1.2 Acinos mucosos	21
1.3 Acinos mixtos	22
2. SISTEMA DUCTAL	23
2.1 Conductos intercalares	
2.2 Conductos estriados	25
2.3 Conductos colectores	27
3. UNIDAD HISTOFISIOLÓGICA GLANDULAR	27
3.1 Estroma glandular	
H) GLÁNDULAS SALIVALES EN RATAS	29
1. EMBRIOLOGÍA Y DESARROLLO PERINATAL	29
2. ETAPAS DE DESARROLLO DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES	29
3. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR	31
4. FISIOLOGÍA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES	34
I) FACTORES DE CRECIMIENTO	36
1. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	36
2. RECEPTOR DEL FACTOR DE	

CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	37
3. INMUNOHISTOQUÍMICA	38
J) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
K) JUSTIFICACIÓN	40
L) HIPÓTESIS	40
M) OBJETIVOS	41
- GENERALES	41
- ESPECÍFICOS	41
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	42
1. TIPO DE ESTUDIO	42
2. VARIABLES	42
2.1 Variables independientes	42
2.2 Variables dependientes	42
2.3 Definición de variables	42
3. CRITERIOS	44
3.1 Criterios de inclusión	44
3.2 Criterios de exclusión	44
4. METODOLOGÍA	44
1. INMUNOHISTOQUÍMICA	46
2. ANÁLISIS POR DENSIDAD ÓPTICA	47
V. RESULTADOS	49
1. UN DÍA POSTNATAL	49
1.1 TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA	49
1.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	50
1.2.1 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	50

1.2.2 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	51
2. QUINTO DÍA POSTNATAL	52
2.1 TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA	52
2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	53
2.2.1 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	53
2.2.2 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	54
3. DÉCIMO DÍA POSTNATAL	55
3.1 TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA	55
3.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	56
3.2.1 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	56
3.2.2 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	58
4. DECIMOSEXTO DÍA POSTNATAL	59
4.1 TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA	59
4.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	60
4.2.1 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	60
4.2.2 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	61

5. DECIMOCTAVO DÍA POSTNATAL	62
5.1 TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA	62
5.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	63
5.2.1 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	63
5.2.2 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	64
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	65
6.1 ANÁLISIS DE EGF	65
6.2 ANÁLISIS DE EGFR	66
6.3 COMPARACIÓN DE EGF CONTRA EGFR	67
7. ANEXOS ESTADÍSTICOS	69
VI. DISCUSIÓN	71
VII. CONCLUSIONES	76
VIII. BIBLIOGRAFÍA	79

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN. Las glándulas salivales son importantes en la cavidad oral, están formadas por numerosas unidades secretoras individuales que drenan por un sistema de conductos que se conectan con el conducto excretor principal que desemboca a la cavidad oral. Por lo anterior, es necesario conocer los cambios histológicos que se generan durante las etapas de formación de la glándula submandibular (GSM), comprender los cambios histológicos, y las funciones que llevan a cabo las glándulas salivales.

OBJETIVOS. Establecer la presencia del factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés EGF, epidermal growth factor) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés EGFR, epidermal growth factor receptor) en las estructuras de las GSM en las diferentes etapas del desarrollo y correlacionarlas con el día de observación. Establecer las estructuras histológicas que poseen las glándulas submandibulares en los días 1, 5, 10, 16 y 18 del desarrollo posnatal.

METODOLOGÍA. Estudio: Experimental, transversal y descriptivo. Se aparearon ratas Wistar hembras (1/1), se sacrificaron los productos en los días 1, 5, 10, 16 y 18 postnatales, se separó la cabeza del cuerpo y se realizó un corte longitudinal céfalo-caudal, para conservar la glándula y se fijó en paraformaldehído al 4%. Se disecó la glándula submandibular y se fijó. Las muestras se procesaron y tiñeron con H&E. La inmunohistoquímica fue Avidin-Biotin Estreptavidina con los factores EGF y EGFR (Santa Cruz). Para identificar el factor y el receptor se realizó la recuperación antigénica, se eliminó la peroxidasa tisular, se reveló con DAB, la contratinción y el montaje de los tejidos. Se realizó densidad óptica (DO) con gama de grises para determinar niveles de respuesta.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RESULTADOS. El EGF se presentó en los días 1, 5, 10, 16 y 18, aumentando la DO en todos los días de desarrollo. EGFR también se presentó en los días 1, 5, 10, 16 y 18 pero con menor DO que con el factor en todos los días de desarrollo postnatal.

CONCLUSIÓN. Hubo mayor inmunexpresión con EGF que con EGFR en el modelo experimental en todos los días de desarrollo glandular, ya que dicho factor tiene una acción directa en el crecimiento y desarrollo de los acinos de la glándula submandibular y el EGF está involucrado en la renovación del epitelio y el correcto funcionamiento de las estructuras de la cavidad bucal, por lo que se encuentra con mayor expresión en los últimos días de desarrollo glandular.

II. INTRODUCCIÓN

Las glándulas salivales son órganos de gran importancia en la cavidad oral, están formadas por un gran número de unidades secretoras individuales que drenan por un sistema de conductos hasta el conducto excretor principal y éste hacia la cavidad oral. Por lo anterior, es importante conocer los diversos cambios histológicos que se generan durante las etapas de formación de las glándulas salivales, en concreto con las glándulas submandibulares, para poder comprender desde un punto de vista histológico las diferentes funciones que llevan a cabo, así como los procesos patológicos que se pueden presentar.

Cohen y cols, en 1960, identificaron el factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés EGF) como un componente activo en la síntesis de la glándula submandibular de ratones machos que causaron la erupción precoz de dientes incisivos y la apertura de los párpados en ratones recién nacidos. En diversos estudios se ha encontrado que el EGF y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) estimulan la actividad de las células acinares y puede influir en el desarrollo y diferenciación de los órganos glandulares.

Por lo que en la actualidad dicho estudio ha sido deficiente y surge la necesidad de realizar una investigación que nos proporcione mayor información acerca de si el factor y el receptor se localizan en las diversas etapas de desarrollo de la glándula submandibular, ya que es la única glándula salival que secreta dichos factores. El propósito de este trabajo de investigación es proporcionarle al profesional la importancia que tiene el EGF en la cavidad bucal, ya que este factor además de estimular el desarrollo de las glándulas salivales tiene la función de la renovación epitelial para una correcta regeneración de la mucosa bucal y el buen funcionamiento de las estructuras de la cavidad bucal. Seleccionando aquellos hallazgos, histológicos y estadísticos que nos proporcionen mayor información acerca si el EGF y EGFR se presentan en el desarrollo y regulan la proliferación celular de la glándula submandibular.



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.

III. MARCO TEÓRICO

A. ANTECEDENTES.

Cohen y cols.¹ identificaron el factor de crecimiento epidérmico (EGF) como un componente activo en el extracto de la glándula submandibular de ratones machos que causaron la erupción precoz de dientes incisivos y la apertura de los párpados en ratones recién nacidos.

Gresik² reportó que el EGF se encontró, por medio de la técnica de inmunohistoquímica, exclusivamente en las células granulares de los túbulos contorneados de la glándula submandibular en ratones; el cual es sintetizado, almacenado y secretado por dichas células. La concentración del factor en la glándula está relacionada con el desarrollo y diferenciación de dichas células.

Carpenter³ menciona que la existencia del EGF se definió hace más de 20 años, comprobando que en extractos de la glándula submandibular del ratón inyectados en animales recién nacidos, inducían la erupción de los incisivos gracias a la estimulación directa del crecimiento epidermal y la queratinización.

Arquero⁴ refiere que el EGF fue el primero en descubrirse y se denomina así debido a su capacidad de inducir la proliferación celular en cultivos de células de la epidermis.

Tucker⁵ señala que el EGF tiene efecto en la estimulación de la ramificación en la glándula submandibular de ratones y posee un alto grado de expresión en los conductos durante su desarrollo.

B. GENERALIDADES.



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.

Las glándulas son células o conjunto de células cuya función principal es la secreción; las glándulas salivales son glándulas exocrinas, liberando su producto de secreción en la cavidad oral por medio de un sistema de conductos (Fig. 1). Por el tipo de secreción y su mecanismo son consideradas de secreción merócrina (el producto de secreción es liberado sin pérdida de sustancia intercelular).⁶⁻⁹

Se clasifican de acuerdo a:

- Su tamaño e importancia funcional en: mayores y menores.
- Su secreción en: serosas, mucosas y mixtas.⁶⁻⁹

1. GLÁNDULAS SALIVALES MAYORES Y MENORES.

1.1 Glándulas salivales mayores.

También conocidas como principales, son las más voluminosas y se consideran como verdaderos órganos secretores. Están representadas por tres pares de glándulas: glándulas sublinguales (que se localizan profundamente en el tejido conectivo de la cavidad oral), glándulas parótidas y glándulas submandibulares (que se ubican fuera de la cavidad bucal y están relacionadas con la mucosa por medio de conductos excretores).⁸⁻⁹

1.2 Glándulas salivales menores.

Comúnmente conocidas como accesorias o secundarias, se localizan en la mucosa y submucosa de los órganos de la cavidad oral; se encuentran en los labios, mejillas, lengua y paladar y se designan según sus disposiciones en labiales, genianas, palatinas y linguales.⁸⁻⁹

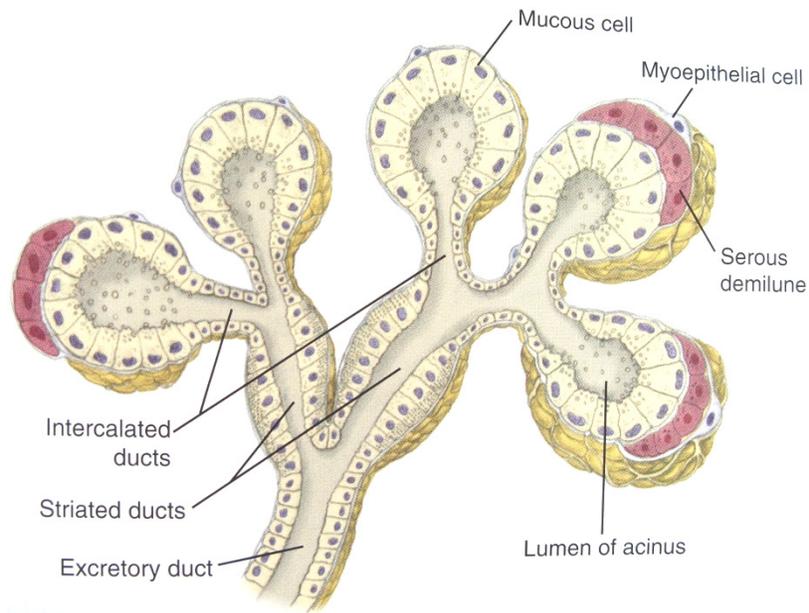


Fig.1. Porción terminal de una glándula con las diversas estructuras histológicas.¹⁰

2. GLÁNDULAS SALIVALES SEROSAS, MUCOSAS Y MIXTAS.

2.1. Serosas.

Poseen únicamente acinos serosos que secretan la saliva fluida con contenido de ptialina pero sin mucina y a menudo contiene enzimas. En sus terminales el citoplasma basal es fuertemente basófilo, mientras que en su ápice es eosinófilo claro y rara vez con gránulos de secreción visibles, el núcleo redondeado se localiza en la mitad basal de las células. (Fig. 2)^{8, 11-12}

2.2. Mucosas.

Secretan mucina pura por lo que su producto es muy viscoso, cuya función es de lubricación y/o protectora. Poseen acinos glandulares mucosos, las células se encuentran llenas de gotas de mucina con un aspecto claro y vacuolizado; el núcleo se localiza en la zona basal de las células. (Fig. 2)^{8, 11-12}

2.3. Mixtas.

Contienen acinos serosos y mucosos, la secreción es viscosa por que contienen ptialina y mucina. Casi todas sus terminales están compuestas por células mucosas, mientras que las pocas células serosas son achatadas y forman estructuras semilunares llamadas “semilunas de Gianuzzi” (Fig. 2) que liberan su secreción por medio de capilares secretores intercelulares entre las células mucosas.^{8, 11-12}

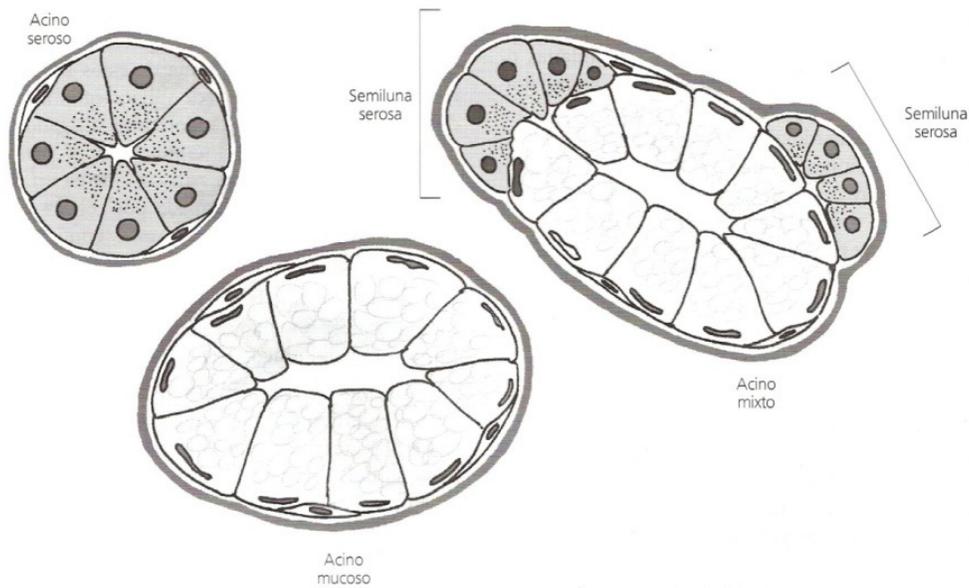


Fig. 2. Esquema de los diferentes tipos de acinos.⁶

C. ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR.

La glándula submandibular posee forma de garfio, se le compara con un prisma triangular irregular cuyo eje mayor se encuentra dirigido de atrás hacia adelante y de afuera a dentro, es paralelo al cuerpo de la mandíbula y tiene el volumen de una almendra y el peso oscila entre 8 y 15 gramos. Su coloración es gris amarillenta en el cadáver y rosado crema en la actividad funcional con secreción de tipo seromucosa (mixto).¹³⁻¹⁴

El brazo más largo del garfio se dirige directamente hacia delante en el plano horizontal, por debajo del músculo milohiideo y por lo tanto es la parte superficial más grande de la glándula; se apoya directamente contra una impresión poco profunda de la cara medial de la mandíbula (fosa mandibular), inferior a la línea milohiidea. El brazo más pequeño del garfio de la glándula, o parte profunda, da la vuelta alrededor del brote posterior del músculo milohiideo para entrar y colocarse dentro del piso de la cavidad bucal, donde se encuentra lateral a la raíz de la lengua sobre la superficie lateral del músculo hiogloso. (Fig. 3)¹³⁻¹⁴

1.1 Conducto Submandibular.

Anteriormente conocido como conducto de Wharton, posee de 4 a 5 cm. de longitud. Se origina por la unión de dos conductos colectores procedentes de la cara profunda de la glándula en la cavidad oral y se dirige hacia adelante para abrirse por arriba de la papila sublingual. El nervio lingual da vuelta por debajo del conducto submandibular, cruzando primero la cara lateral y posteriormente la cara medial del conducto; luego desciende anteromedialmente hacia el piso de la cavidad bucal y después asciende hasta la lengua.¹³⁻¹⁴

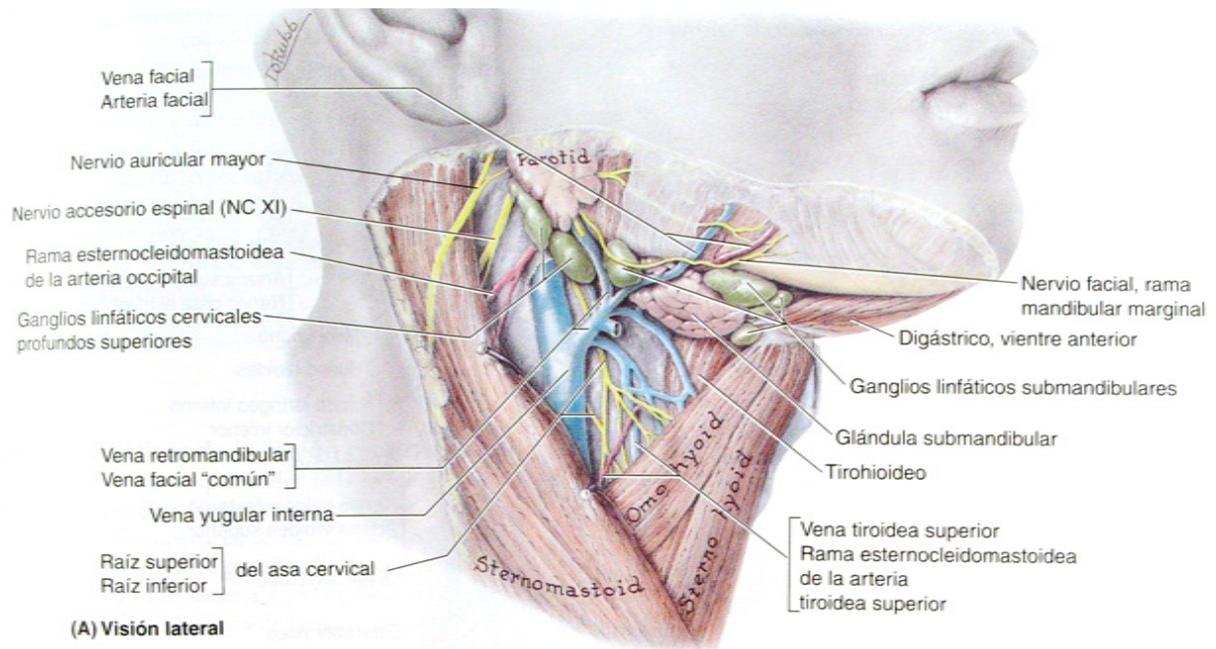


Fig. 3. Esquema de la localización de la glándula submandibular.¹⁵

D. EMBRIOLOGÍA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES.

Los componentes del epitelio de las glándulas salivales son derivados del epitelio bucal primitivo. El primer signo del crecimiento glandular es el engrosamiento del epitelio bucal, adyacente a la condensación de las células mesenquimatosas; el crecimiento glandular implica una interacción del epitelio con el mesénquima subyacente (interacción epitelio-ectomesénquima) para poder formar la parte funcional de la glándula ya que regula la iniciación, el crecimiento del tejido glandular y la diferenciación celular.^{5,7}

El ectomesénquima se encuentra constituido por células indiferenciadas pluripotenciales que pueden diferenciarse en células del tejido conjuntivo (fibroblastos, macrófagos y células cebadas) y la matriz extracelular; la matriz extracelular proporciona señales reguladoras para la proliferación, diferenciación y morfogénesis celular, los cuales son procesos indispensables para la formación de estructuras. Por lo que proporciona señales importantes para la morfogénesis y diferenciación del brote glandular, cada una de las glándulas salivales se origina en un lugar específico de la mucosa que tapiza el estomodeo. La región engrosada del epitelio experimenta un incremento en la proliferación e invade el mesénquima subyacente en forma de un cordón sólido de epitelio; este cordón primario será destinado para ser el conducto excretor principal.^{7, 10, 16}

La parte distal se ramifica para formar las partes del sistema de conductos y las unidades secretoras terminales; la ramificación requiere de coordinación de las funciones del citoesqueleto y de la matriz extracelular. El desarrollo de nuevos brotes epiteliales incluye la interacción de integrinas con sus ligandos de la matriz extracelular del ectomesénquima.

El proceso de ramificación requiere de la presencia del mesénquima y de la membrana basal, por lo que la ramificación de los cordones epiteliales va precedida de un incremento de mitosis en los cordones y del engrosamiento de la lámina basal; estabilizando el epitelio y mantiene e inicia la ramificación. La lámina basal (componente de la matriz extracelular) está constituida por colágeno tipo IV,

heparán sulfato y otros proteoglicanos, la cual regula los cambios morfogenéticos directamente.^{5, 10, 16}

El proceso de morfogénesis controla la distribución organizada y es responsable de las formas características de los tejidos y órganos; el proceso de ramificación glandular que ocurre en el desarrollo glandular es un ejemplo de la morfogénesis.

El tejido glandular funcional (parénquima), se desarrolla por la proliferación del epitelio bucal que invade el mesénquima subyacente de una forma ordenada. En el estroma se distribuyen vasos sanguíneos y linfáticos, los nervios simpáticos y parasimpáticos (que regulan la función glandular). En diversos estudios se han demostrado que los nervios se van extendiendo por el estroma glandular en desarrollo, que es un papel fundamental en la diferenciación funcional del parénquima salival. Se han encontrado haces nerviosos en la proximidad del primordio glandular.^{5, 10, 16}

Los diversos procesos de transformación que se generan en el parénquima de las glándulas salivales en desarrollo se encuentran regulados por diferentes tipos de crecimiento, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y sus receptores, que son liberados por el ectomesénquima. El EGF regula el proceso de bifurcación, mientras que el factor de crecimiento fibroblástico (por sus siglas en inglés FGF, fibroblast growth factor) controla la elongación de los tallos. Cuando la actividad de la tirosin-cinasa es bloqueada, la bifurcación decrece y el crecimiento glandular es detenido.^{5, 7, 17}

El origen del brote epitelial probablemente se deriva del ectodermo en la glándula parótida y glándulas salivales menores, y del endodermo las glándulas submandibular y sublingual.⁷

E. ETAPAS DE DESARROLLO DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES.

El desarrollo de las glándulas salivales está constituido por seis etapas: ⁷

ETAPA 1. Formación del brote epitelial.

En esta etapa el epitelio bucal es inducido por el mesénquima subyacente ejerciendo un efecto inductor sobre el epitelio bucal, en el cual se genera un pequeño brote. Este brote en crecimiento es separado del mesénquima condensado por la lámina basal (secretada por el mismo epitelio). (Fig. 4)^{5,7}

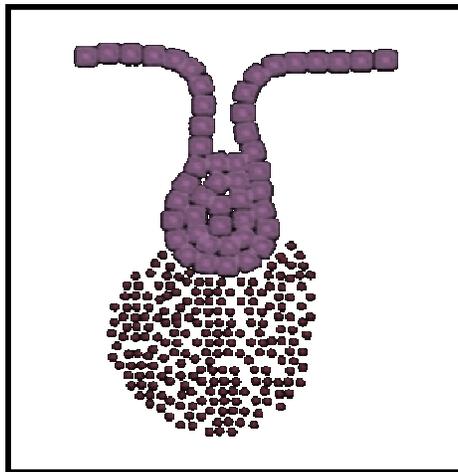


Fig. 4. Esquema de la etapa de formación de brote epitelial.¹⁸

ETAPA 2. Formación y crecimiento del cordón epitelial.

El brote epitelial se elonga, generando un cordón sólido de células gracias a la proliferación celular que se invagina en el mesénquima subyacente. La proliferación y la condensación ocurren en el mesénquima circundante, la cual se encuentra íntimamente asociada con el cordón epitelial. La lámina basal se localiza entre el cordón epitelial y el mesénquima; este último (mesénquima) se encuentra constituido por glicosaminoglucanos, colágeno, glicoproteínas y proteoglucanos. La lámina basal y el mesénquima circundante realizan un papel importante en la morfogénesis y diferenciación de las glándulas salivales durante su desarrollo glandular. (Fig. 5)^{5,7}

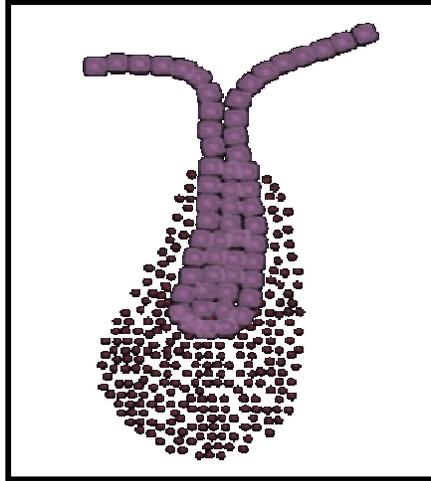


Fig. 5. Esquema de la etapa de formación y crecimiento del cordón epitelial.¹⁸

ETAPA 3. Iniciación de la ramificación de las partes terminales del cordón epitelial y continuación de la diferenciación.

La proliferación epitelial y la ramificación de las partes terminales del cordón se efectúan rápidamente, se continúa con la diferenciación glandular y se genera un crecimiento longitudinal del cordón epitelial. (Fig. 6)^{5,7}

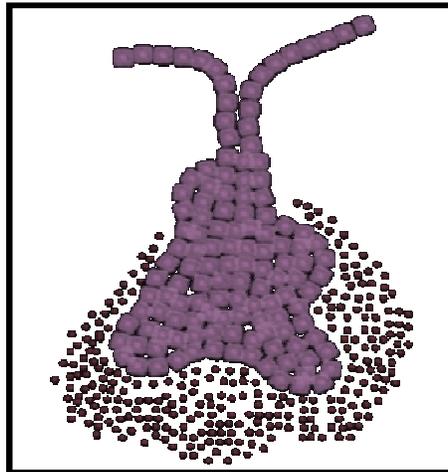


Fig. 6. Esquema de la etapa de iniciación de la ramificación de las partes terminales del cordón epitelial y continuación de la diferenciación.¹⁸

ETAPA 4. Continuación de la bifurcación del cordón epitelial y formación de lóbulos.

Continúa la ramificación en las porciones terminales del cordón epitelial, cada una de las ramas hijas continúan creciendo y ramificándose; a este proceso se le conoce como morfogénesis ramificante que nos lleva a la formación de una estructura arboriforme de cordones epiteliales sólidos con extremos redondeados, engrosados, con ramificaciones y brotes subsecuentes. Ha sido analizado en diversos estudios acerca del desarrollo *in vitro* de las glándulas salivales y han revelado que las porciones terminales de los cordones inician el proceso de ramificación, la cual es precedida por una proliferación epitelial. También se ha comprobado que este proceso necesita de la interacción entre el epitelio y el mesénquima, existiendo un incremento de la actividad mitótica que se localiza en la periferia de los cordones. (Fig. 7) ^{5, 7}

Se ha observado que el tratamiento con hialuronidasa desorganiza la lámina basal y por lo tanto interfiere en el proceso de ramificación. La lámina basal puede regular los cambios morfogenéticos directamente, por medio de la filtración selectiva o por los canales de materiales del epitelio. La regulación del flujo de los iones de calcio del epitelio pueden alterar las funciones de los microtúbulos y microfilamentos en su proliferación, migración y diferenciación celular. ²

La matriz extracelular en relación con los factores de crecimiento epidérmico (EGF) aparece para regular la morfogénesis durante el crecimiento de las glándulas salivales. ^{5, 7, 19}

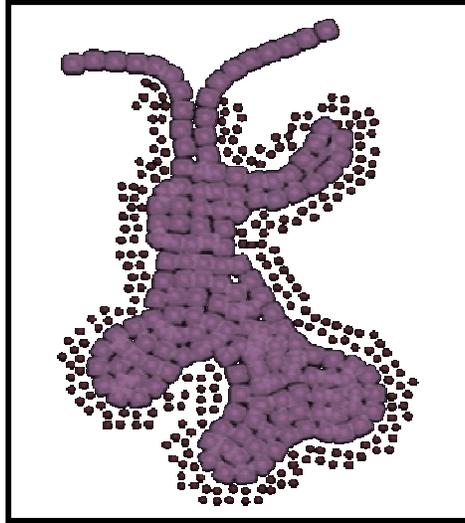


Fig. 7. Esquema de la etapa de continuación de la bifurcación del cordón epitelial y formación de lóbulos.¹⁸

ETAPA 5. Desarrollo de luz en los conductos.

Los cordones van desarrollando en su interior una luz, convirtiéndose en conductos. Algunos investigadores han propuesto ciertos mecanismos para la canalización de los cordones epiteliales en la formación de los conductos, los cuales son:

- 1) Por los diferentes grados de proliferación de las células que forman los cordones.
- 2) Por la secreción liberada por las células ductales la cual incrementa la presión hidrostática generando una apertura de la luz en el cordón.⁷

El desarrollo de la luz del conducto se inicia en el epitelio ramificado en el extremo distal del cordón principal, así como en sus divisiones y en la proximidad de este cordón. Además de la ramificación de los conductos, el desarrollo de la septa (capa delgada de tejido conjuntivo) continua en esta etapa. (Fig. 8)^{5,7}

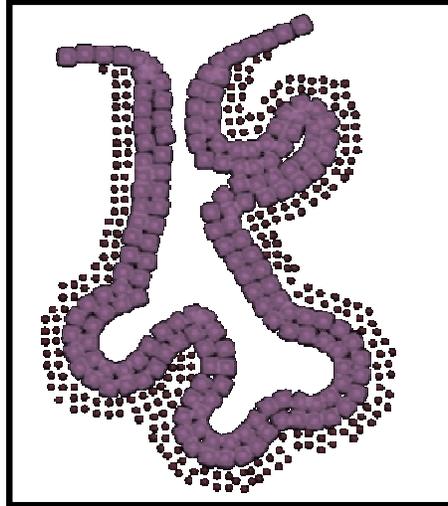


Fig. 8. Esquema de la etapa del desarrollo de luz en los conductos.¹⁸

ETAPA 6. Citodiferenciación.

El estadio final del desarrollo de las glándulas salivales es la histodiferenciación (citodiferenciación) de los acinos secretores y conductos intercalares. Durante este periodo, la actividad mitótica cambia de cordón epitelial a brote terminal; y el sistema se convierte en tubular el cual en un principio estaba formado por cordones compactos. Las células mioepiteliales probablemente surgen de la capa externa del epitelio de los túbulos terminales y en coordinación con la citodiferenciación de los acinos. (Fig. 9)⁷

La maduración de las células acinares ocurre de acuerdo a la morfología de los gránulos secretores y organelos celulares. Las células de la capa interna se diferencian en células secretoras de la glándula madura, las cuales pueden ser adenómeros mucosos o serosos que dependen de la glándula madura. El parénquima aumenta de tamaño y número mientras que el mesénquima disminuye, sin embargo una capa delgada rodea a cada unidad secretora llamada septa, que se continúa con la cápsula por la cual pasan los nervios y vasos sanguíneos de la glándula. Las células del túbulo terminal se diferencian en células de los conductos intercalares que se pueden observar en las glándulas maduras. Es importante y necesaria la interacción del epitelio-mesénquima para la

citodiferenciación y una parte de esta relación toma lugar para la diferenciación celular sin la presencia continua del mesénquima. Posteriormente aparece un acoplamiento parcial que se observa en los procesos independientes controlados por la morfogénesis y la histodiferenciación. La diferenciación no termina hasta que se inicia una dieta sólida y hasta que exista la presencia de los estímulos de la masticación.^{5, 7, 17}

El proceso de desarrollo postnatal incluye:

- Maduración de la relación del acoplamiento entre secreción-estímulos.
- Establecer las conexiones neurales en el sistema nervioso autónomo.^{7, 17}

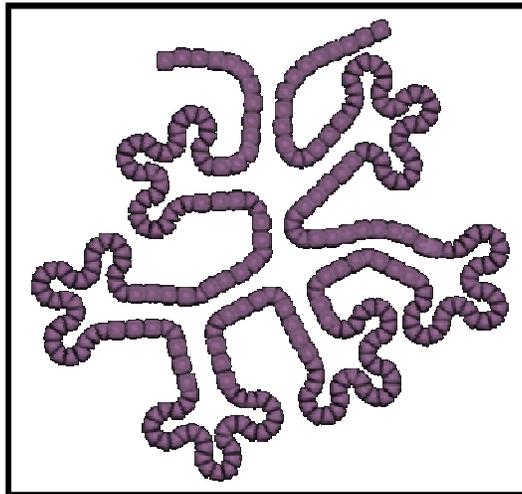


Fig. 9. Esquema de la etapa de la citodiferenciación.¹⁸

F. BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR.

Las glándulas submaxilares aparecen a finales de la sexta semana, se forman a partir de yemas endodérmicas en el suelo del estomodeo. En el sentido posterior crecen prolongaciones celulares sólidas, laterales a la lengua en desarrollo y más tarde se ramifican y diferencian. Se empiezan a formar acinos hacia las 12 semanas y la actividad secretora se inicia hacia las 16 semanas.²¹⁻²²

El crecimiento de las glándulas submandibulares continúa tras el nacimiento con la formación de acinos mucosos. En un lado de la lengua se forma un surco lineal que en poco tiempo se cierra por arriba y da lugar al conducto submandibular; los adenómeros que constituyen la glándula son de tipo seromucoso (mixto) con predominio seroso y el pedículo primario persiste como conducto submandibular (antes conducto de Wharton).²¹⁻²²

G. HISTOLOGÍA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES.

Una de las características más generales de las glándulas exocrinas es la relación entre el estroma de tejido conjuntivo y el parénquima, así como la división de la glándula en lóbulos y lobulillos.^{7, 11}

1. PARÉNQUIMA GLANDULAR.

Las unidades secretoras de las glándulas salivales se denominan “acinos” o “adenómeros”, las células con un aspecto piramidal vierten su secreción por su cara apical a la luz central del acino, a la cavidad oral por medio de un sistema de conductos excretores. A partir de cada acino se origina un “conducto” cuya pared se forma por células epiteliales de revestimiento y la luz es continuación del acino. Por lo que ambas estructuras (acinos y conductos) constituyen el “parénquima” o porción funcional de las glándulas.⁶⁻⁹

Existen tres tipos de acinos, de acuerdo a su organización y al tipo de secreción de sus células: ^{6, 8-9}

1.1. Acinos serosos.

Son pequeños y esferoidales, formados por células serosas que presentan una estructura típica de las células que sintetizan, almacenan y secretan proteínas. Sus núcleos son esféricos y se localizan en el tercio basal; el citoplasma en esta zona presenta una fuerte basofilia mientras que la región apical posee gránulos de secreción acidófilos y PAS positivos que comúnmente se denominan “gránulos de cimógeno”.^{6, 8-9}

En un corte histológico teñido con hematoxilina y eosina (H&E), los acinos presentan un contorno redondeado y una luz central muy pequeña (Fig. 10). Con el microscopio electrónico de transferencia (MET) podemos observar que en toda la región basal se encuentra ocupada por una extenso retículo endoplásmico rugoso (RER) con cisternas apiladas en forma paralela, el cual es responsable de

la basofilia. El complejo de Golgi que se localiza supranuclear y se encuentra muy desarrollado, surgiendo de estos pequeños gránulos inmaduros de contenido electrolúcido los gránulos secretores maduros (en la región apical). En el citoplasma se observan mitocondrias, lisosomas, tonofilamentos y microtúbulos.^{6,}

8-9

Las células se encuentran unidas lateralmente unas con otras por medio de los complejos que dependen de que si existen o no canalículos intercelulares. Las uniones estrechas u ocluyentes se localizan en el fondo de los canalículos, mientras que los complejos de unión entre las células acinares permiten la unión entre las células vecinas y delimitan dos dominios celulares diferentes:

- 1) El dominio apical, que se extiende en sentido lateral por medio de los canalículos intercelulares.
- 2) El dominio basolateral, a través de este se dan los diferentes tipos de intercambio entre las células y el estroma conjuntivo (permitiendo mantener la función específica de los elementos celulares).^{6, 11}

Su ritmo de secreción es discontinuo, por lo que el aspecto de las células serosas es diferente; según el estado funcional en el que se halla. Una célula que se encuentra en reposo posee gránulos de cimógeno, acidófilos, acumulación en la porción apical del citoplasma; por lo que en una célula estimulada tiene escasos gránulos o ninguno ya que por medio de la exocitosis los descargan. Este tipo de acinos produce una secreción líquida rica en proteínas, la mayoría de estas proteínas son del tipo de glicoproteínas. La proteína que más secretan los acinos serosos es la “amilasa salival” (o ptialina) que se encarga de degradar el almidón y el glucógeno; por lo que esta enzima inicia la digestión de los alimentos, pero su acción se lleva a cabo en poco tiempo. Las glándulas parótidas y submandibulares generan en mayor proporción la amilasa salival.^{6, 8-9}

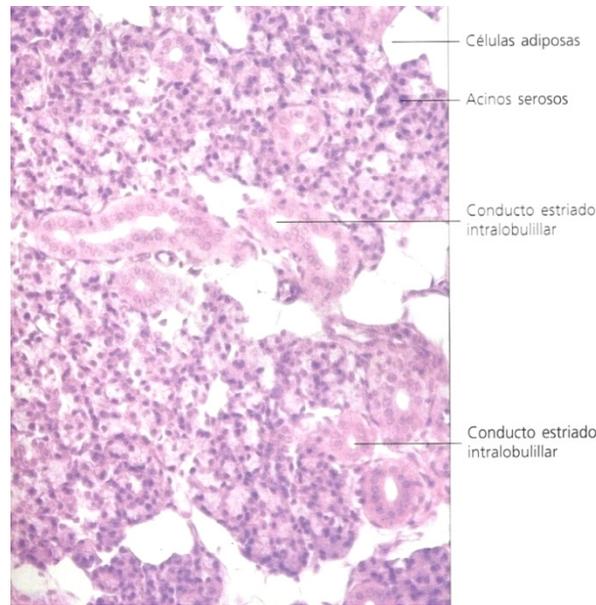


Fig. 10. Corte histológico de los acinos serosos, conductos estriados y células adiposas, en H&E de la glándula parótida.⁶

1.2. Acinos mucosos.

Son células globosas cargadas de grandes vesículas que poseen “mucinógeno”, esta secreción es rica en proteínas llamadas mucinas unidas a las porciones de los carbohidratos complejos. Las vesículas de secreción desplazan al núcleo, el cual es aplanado y comprimido contra la cara basal de las células.^{6, 8-9}

El mucinógeno no se tiñe con los colorantes de rutina, por lo que en los cortes con H&E el citoplasma se observa pálido y con poca basofilia (Fig. 11); sin embargo por medio de las técnicas citoquímicas específicas para la mucina se tiñe muy bien. Sus células se encuentran cargadas de vesículas de secreción pero con escaso RER, las mitocondrias se observan acompañando a las cisternas en la proximidad de las caras basales y laterales. El complejo de Golgi se encuentra dilatado por encima del núcleo. Las células mucosas son secretoras discontinuas que presentan una actividad cíclica que es evidente con el microscopio óptico (MO) y MET. Gracias al estímulo nervioso, las células llenas de secreción liberan su contenido de gránulos; posteriormente pasan por una etapa funcional de

reinicio de la producción secretora. Durante este periodo se desarrolla ampliamente el RER; el núcleo se vuelve esférico, posee una proporción de eucromatina y está localizado en la base. La región apical del citoplasma está ocupada por gránulos de secreción en abundancia, así como los canalículos intercelulares y las proyecciones de las membranas de las células basales son menos extensas que en las células serosas.^{6, 11-12}

A medida que se producen y acumulan la secreción, se van originando vesículas voluminosas hasta que vuelvan a adquirir el aspecto típico de dichas células y finalmente, por medio de la exocitosis descargan su secreción. La mucina actúa como lubricante, ayuda a la masticación, deglución, fonación y protege al epitelio bucal de traumatismos mecánicos y químicos.^{6, 8-9}

1.3. Acinos mixtos.

Formados por un acino mucoso y provistos por uno o más casquetes de células serosas, en los cortes histológicos se observan con un aspecto de media luna por lo que se les suele denominar semiluna serosa (o semiluna de Gianuzzi). Su secreción se realiza primero por medio de las células de los casquetes serosos que pasa a través de delgados canalículos intercelulares hasta llegar a la luz central del acino en donde se mezcla con la secreción serosa. (Fig.11)^{6, 8-9}

Todos los tipos de adenómeros (serosos, mucosos o mixtos) se encuentran rodeados por una lámina basal, por dentro de esta lámina se localiza otro tipo de células llamadas “células mioepiteliales” (o células de cesta o canasta) debido a su función principal parece ser la de contraerse para facilitar la secreción de las células acinares; además de que presenta numerosas ramificaciones las cuales abrazan a las células secretoras formando una canasta. Cuentan con riego sanguíneo, albergan al núcleo y a varias proyecciones citoplasmáticas formando contactos por uniones desmosómicas con las células acinares y ductales (ricos en actina y miosina), en MET estas proyecciones parecen células del músculo liso. El

cuerpo celular posee pequeños organitos y el núcleo; uniéndose a través de los hemidesmosomas a la membrana basal.^{6, 8-9}

De acuerdo al predominio de uno u otro tipo de acinos en la composición de las distintas glándulas salivales, se denominan: 1) *serosas puras* cuando están formadas solo por adenómeros de tipo seroso (como en la glándula parótida y en las glándulas linguales de Von Ebner), 2) *mucosas* si prevalecen adenómeros mucosos, y 3) *mixtos* si muestran adenómeros serosos, mucosos y mixtos en diferentes proporciones.^{6, 8-9}

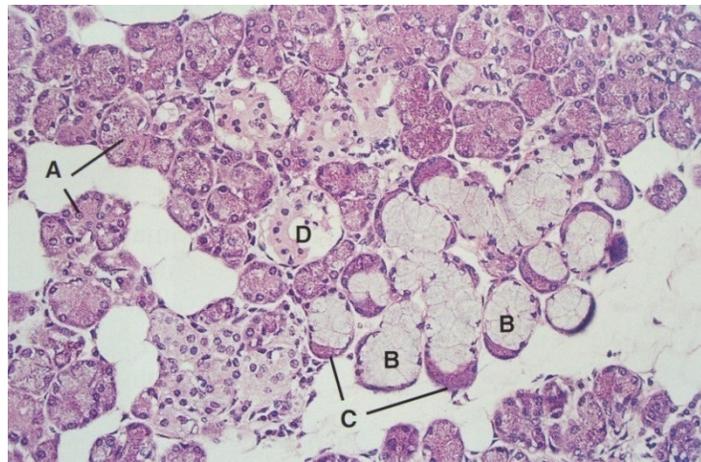


Fig. 11. Corte histológico de la glándula submandibular en donde se observan los acinos serosos (A), acinos mucosos (B), conducto estriado (D) y semilunas de Giannuzzi (C).¹⁶

2. SISTEMA DUCTAL.

Las porciones de los conductos de las glándulas salivales mayores son estructuras ramificadas, cuyos conductos excretores se unen continuamente hasta formar un conducto de mayor calibre que sale del lobulillo. Los conductos que se encuentran dentro del lobulillo se llaman “intralobulillares” y de estos existen dos tipos de conductos:

- 1) Conductos intercalares (o piezas intercalares de Boll).
- 2) Conductos estriados (o excretosecretorios o granuloso).

Los conductos que transitan por los tabiques de tejido conjuntivo fuera del lobulillo se denominan “conductos excretores terminales” (o colectores), que son los primeros tramos interlobulillares que a medida que convergen entre sí se llaman “interlobulares”. (Fig. 12)⁶⁻¹⁰

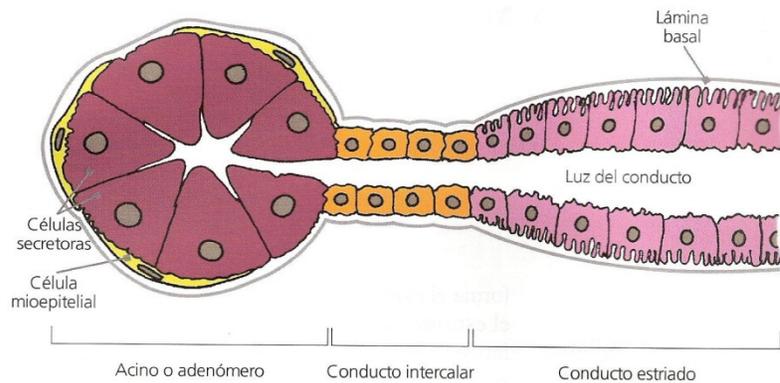


Fig. 12. Esquema de la organización del parénquima intralobulillar de las glándulas salivales.⁶

2.1. Conductos intercalares.

Se originan a partir de cada acino, se encuentran comprimidos por las unidades secretoras por lo tanto es difícil observarlas en MO; la pared está conformada por una sola capa de células cúbicas bajas rodeadas por células mioepiteliales y rodeadas por una membrana basal (Fig. 13). Al observarlas con el MET las células de las paredes presentan escaso desarrollo de los organelos como ejemplo se encuentran pequeños gránulos, un aparato de Golgi supranuclear y algunas cisternas de RER. Las células se unen entre sí y con las células mioepiteliales a través de desmosomas y otras estructuras de unión.^{8-9, 11-12} En las glándulas serosas estos conductos se muestran largos, a diferencia con las glándulas mucosas que presentan escaso desarrollo y se observan células mucosas intercaladas en la pared; los conductos intercalares desempeñan una función pasiva en el transporte de la saliva primaria formada por células acinares.^{6, 8-9}

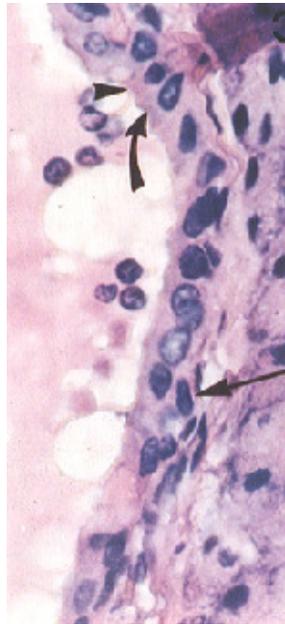


Fig. 13. Conducto intercalado (flecha curva).²³

2.2. Conductos estriados.

Se desarrollan por la unión de dos o más conductos intercalares y son de mayor diámetro y su luz es más amplia; se localizan revestidos por una hilera de células epiteliales cúbicas altas o cilíndricas con citoplasma acidófilo y núcleos esféricos en la parte central. En MO se observan una serie de estriaciones perpendiculares a la superficie basal de las células altas (Fig. 14); a diferencia de las observaciones de MET muestra estriaciones con una gran cantidad de mitocondrias filamentosas localizadas entre las invaginaciones o pliegues de la membrana plasmática de la cara basal de las células. Estos pliegues se interdigitan con las células vecinas constituyendo un laberinto basal ya que es un rasgo característico de los epitelios que intervienen en el transporte activo de los electrolitos. Presentan un RER y aparato de Golgi poco desarrollados, acompañados de un retículo endoplásmico liso (REL) en apical; existen lisosomas, peroxisomas, filamentos del citoesqueleto, ribosomas libres y glucógeno. Así como microvellosidades cortas circundan la luz de estos conductos sellada por medio de complejos de uniones intercelulares.^{6, 8-9, 11-12.}

Los conductos estriados transportan la saliva primaria (secreción acinar) y sus células intervienen activamente ejerciendo intercambios iónicos, de ahí el nombre de conductos excreto-secretorios, convirtiendo la saliva primaria en saliva secundaria. La saliva primaria es generada por las células acinares y se encuentra formada por productos de secreción, agua, iones y moléculas; a medida que la saliva primaria pasa a través de estos conductos, las células reabsorben activamente el Na^+ y secretan K^+ , por lo que la cantidad de K^+ secretado no equilibra la cantidad de Na^+ reabsorbido. La saliva se encuentra hipotónica y a esta saliva se le conoce como saliva secundaria, que presenta concentraciones bajas de Na^+ y Cl^- y altas concentraciones de K^+ .⁶⁻¹²

En las paredes de los conductos intralobulillares y entre las células acinares suelen encontrarse grandes células eosinófilas, con un citoplasma lleno de mitocondrias alteradas. A estas células se le denominan “oncocitos”, que aparecen aislados y formando acúmulos pequeños que se incrementan con la edad; estas células pueden originar tumores conocidos como oncocitomas o adenomas oxífilos (frecuentes en las glándulas parótidas).⁶⁻¹²

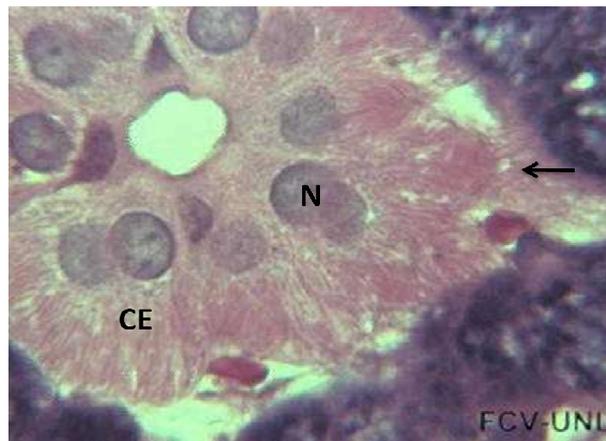


Fig. 14. Fotomicrografía de un conducto estriado, donde se observan las células epiteliales cúbicas altas (CE) con núcleo central (N), las estriaciones se encuentran perpendiculares a la superficie basal de las células epiteliales (flecha).²⁴

2.3. Conductos colectores.

También llamados conductos excretores, sus porciones iniciales son de ubicación interlobulillar que corren por los tabiques conjuntivos que separan los lobulillos glandulares; se caracterizan por un revestimiento de epitelio cilíndrico simple de citoplasma eosinófilo, con pocas estriaciones basales que desaparecen sucesivamente. En MET sus células son parecidas a las del conducto estriado pero con características menos marcadas, se cree que estos conductos participan en intercambios iónicos que modifican la saliva por medio de la reabsorción de los electrolitos (Na^+ y Cl^-); al ser impermeables al agua los conductos colectores ayudan a mantener la saliva hipotónica. A medida que se van anastomosando con otros conductos interlobulillares van creciendo de tamaño y el epitelio se convierte en pseudoestratificado; los amplios conductos interlobulares presentan epitelio pseudoestratificado o cilíndrico estratificado. El conducto principal que desemboca en la cavidad oral se encuentra revestido por epitelio plano estratificado.⁶⁻¹²

3. UNIDAD HISTOFISIOLÓGICA GLANDULAR.

La unidad fisiológica mínima del parénquima glandular salival se denomina “sialona”, que se conforma por un adenómero y las porciones ductales que modifican el producto sintetizado por en acino.^{6, 8-9}

3.1. Estroma glandular.

El parénquima glandular se localiza inmerso en un tejido conjuntivo que lo divide, sostiene y encapsula: a este tejido conjuntivo se le conoce como “estroma” ya que a través de este se realiza la irrigación e inervación de las glándulas salivales. (Fig. 15)^{6, 8-9}

En las glándulas parótidas y submandibulares la cápsula se encuentra bien desarrollada, de la cual se originan tabiques que delimitan los lobulillos y lóbulos del parénquima. En los tabiques de las glándulas habitualmente se localiza el

tejido conjuntivo semidenso, que es más celular en los tabiques finos. En el interior de cada lobulillo está representado por una delgada trama de tejido conjuntivo laxo, provista de abundantes fibras reticulares que sostienen los acinos y conductos; acompañan a los numerosos capilares periductales, periacinares y a las terminaciones nerviosas que llegan hasta las células secretoras.^{6, 8-9}

Las células que se encuentran en el estroma son: fibroblastos, plasmocitos, células cebadas, macrófagos y numerosos linfocitos. En las glándulas parótidas y submandibulares se observan abundantes adipocitos. Los plasmocitos producen localmente las inmunoglobulinas, especialmente la inmunoglobulina A (IgA) en forma de dímeros; el conjunto del dímero y el componente secretor conforman la inmunoglobulina A secretora (IgAs), denominada así porque es la forma completa del anticuerpo que se segrega mediante el mecanismo de transcitosis a la saliva. Por lo que cumple un papel importante en las funciones defensivas de la saliva ya que es la primera línea de defensa ante una infección, e interfieren en la adhesión de los microorganismos a la mucosa bucal.^{8-9, 11-12}

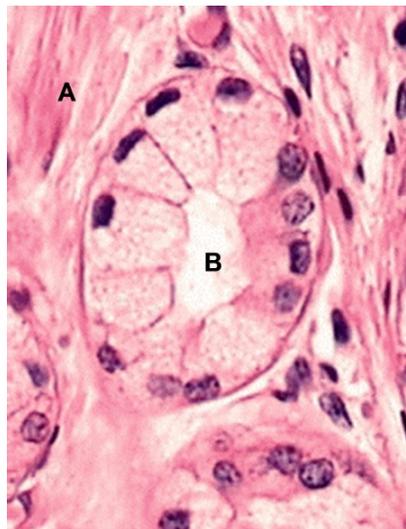


Fig. 15. Fotomicrografía donde se observa el parénquima (A) y el estroma (B).²⁴

H. GLÁNDULAS SALIVALES EN RATAS.

Las glándulas salivales en ratas incluyen tres pares de glándulas principales (o mayores) como en el humano que son: parótida, submandibular y sublingual, y varias glándulas menores, secundarias o accesorias de tamaño minúsculo y se encuentran distribuidas en la mucosa y submucosa que se designan de acuerdo a su ubicación: sublingual, bucal, palatinas y linguales. Estudios fisiológicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales del epitelio de los acinos y conductos salivales muestran importancia en la maduración y regulación funcional de otros tejidos por la producción y secreción de factores de crecimiento; solo las glándulas salivales mayores son examinadas rutinariamente en estudios toxicológicos.²⁵⁻²⁷

1. EMBIOLOGÍA Y DESARROLLO PERINATAL.

El primordio de las glándulas salivales mayores se observa en el día 14 de la gestación, estas glándulas surgen en pares fuera de la cavidad de revestimiento endodérmico del intestino del embrión, casi la mayoría de las glándulas salivales de la rata son estudiadas en su desarrollo postnatal, especialmente la submandibular. Al nacimiento estas glándulas están compuestas principalmente de lóbulos rudimentarios del mesénquima, con conductos de estructura lineal del epitelio columnar o cuboidal. El desarrollo acinar comienza al nacimiento y continua hasta las 6 semanas después del nacimiento, el desarrollo de los conductos y la maduración continua 4 meses después del nacimiento.^{5, 19, 26}

2. ETAPAS DE DESARROLLO DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES.

Etapa 1: Prebrote o formación del brote. El ectomesénquima subyacente ejerce un efecto inductor sobre el epitelio bucal, que causa un hinchamiento focal y la formación de un pequeño brote. (Fig. 16)^{5, 19}

Etapa 2: Brote inicial. El brote se invagina en el ectomesénquima subyacente y se une a la superficie bucal por un conducto, que continuará para formar el conducto principal de la glándula y es visible como un hoyuelo leve sobre la superficie bucal donde la formación del lumen inicia. (Fig. 16)^{5, 19}

Etapa 3: Pseudoglandular. El brote inicial sufre bifurcación para producir un racimo de ramas y yemas. La proliferación es alta en el epitelio y relativamente baja en el mesénquima en todas las etapas del desarrollo de la glándula, el epitelio crece y se ramifica repetidamente. Este proceso es denominado “morfogénesis ramificante”, ya que dichos brotes siguen bifurcándose produciendo una glándula multilobular. (Fig. 16)^{5, 19}

Etapa 4: Canalicular. Los cordones que al principio son sólidos desarrollan una luz en su interior, transformándose en conductos para permitir el acceso libre entre la saliva que genera el adenómero y la cavidad bucal. La canalización de los cordones epiteliales para formar los conductos se reduce por degeneración de las células centrales del cordón. (Fig.16)^{5, 19}

Etapa 5: Brote terminal. Los cordones desarrollan luz en su interior, transformándose en conductos, mientras que los extremos distales se diferencian en acinos o unidades secretoras terminales. La diferenciación de la glándula sigue después del nacimiento con la diferenciación de los conductos granulares hasta la pubertad. (Fig. 16)^{5, 19}

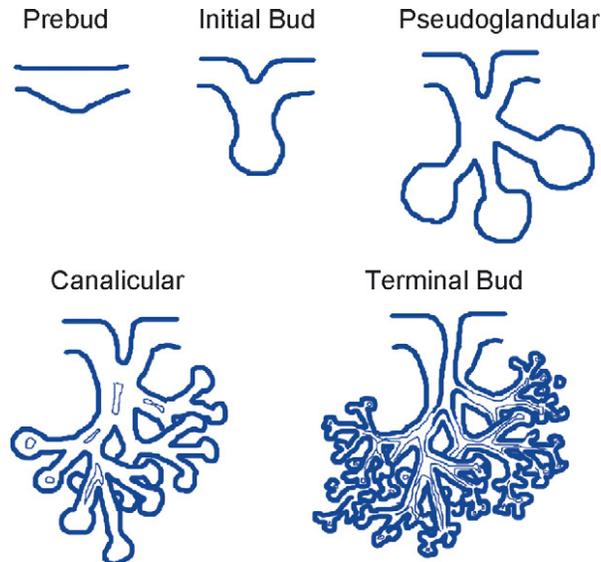


Fig. 16. Etapas del desarrollo glandular en ratas. Prebrote, Brote inicial, Pseudoglandular, Canalicular, Brote terminal.⁵

3. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR.

Se encuentra en la línea media anterior del cuello, se extiende desde los nódulos linfáticos mandibulares hasta cerca de la entrada torácica caudal, rodeada por una gran parte del lóbulo de la glándula parótida. La pequeña glándula sublingual está localizada en el lado frontolateral de la glándula submandibular, justo por debajo de los nódulos linfáticos mandibulares. La glándula submandibular tiene una superficie lisa incompleta, dividida en paquetes densos, de lóbulos ovals y comprimida dorsoventralmente con dimensiones aproximadas de 10mm de ancho y 15mm. de longitud y 5mm. de profundidad (Fig. 17).²⁵⁻²⁸

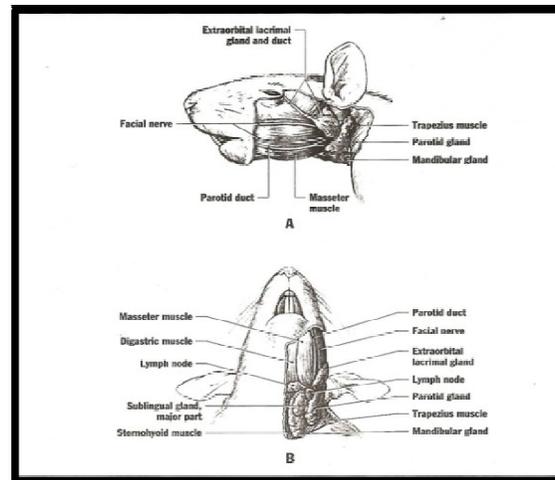


Fig. 17. Esquema de la localización anatómica de las glándulas salivales de rata.²⁸

Histológicamente existen 3 componentes del parénquima de la glándula submandibular: acinos y conductos intralobulillares ya que se ubican dentro del conducto del lobulillo, y de ellos se encuentran 2 tipos: a) *conductos intercalares* y b) *conductos estriados*. El sistema de conductos que corre por los tabiques del tejido conjuntivo, fuera del lobulillo son llamados conductos excretores terminales o colectores; estos conductos son en sus primeros tramos intralobulillares y a medida que confluyen entre si se denominan intralobulares. La unión de los últimos originan el conducto excretor principal, por dentro de la membrana basal se localizan las células mioepiteliales, que se encuentran rodeando a las células secretoras y a los conductos intercalares. Las células mioepiteliales se unen a las células acinares y entre sí por medio de desmosomas, y a la membrana basal por medio de los hemidesmosomas.^{5, 19, 25-26}

Existen dos variedades de adenómeros en la glándula submandibular de acuerdo a su organización y con el tipo de secreción de sus células: **serosas y mucosas**. Los adenómeros serosos, en un corte histológico teñido con H&E, se observa que presentan un contorno redondeado y una luz central muy pequeña; los núcleos de las células son esféricos y se encuentran ubicados en el tercio basal. El citoplasma muestra una fuerte basofilia por el extenso RER, contienen una cantidad moderada de mitocondrias. En diferentes estudios se ha demostrado que algunos gránulos contienen peroxidasa y EGF y factor de crecimiento nervioso (por sus siglas en inglés NGF, nerve growth factor).^{5, 19}

Los adenómeros mucosos son más voluminosos que los serosos, poseen células globosas que se encuentran cargadas de vesículas que contienen mucina. Las vesículas de secreción desplazan al núcleo, que aparece aplanado y comprimido contra la cara basal de las células. Con la tinción de H&E el citoplasma se observa claro, escaso RER y el complejo de Golgi, disponiéndose las cisternas acompañadas de algunas mitocondrias en la proximidad de la cara basal y lateral. Inmediatamente por encima del núcleo se extiende el complejo de Golgi, observando en su citoplasma grandes vesículas de secreción. En la rata, la glándula submaxilar es una glándula seromucosa y produce pequeñas cantidades de amilasa. En las paredes de los conductos intralobulillares y aún entre las células acinares de ratas adultas suelen localizarse grandes células eosinófilas, cuyo citoplasma se encuentra lleno de mitocondrias alteradas; son diferentes a todos los otros tipos celulares glandulares y se les denomina oncocitos.^{25, 28}

La pared de los conductos intercalares son los primeros que se originan de cada adenómero, poseen un calibre muy pequeño y se encuentran comprimidos por unidades secretoras. La pared de estos conductos está formada por una sola capa de células cúbicas, rodeadas por células mioepiteliales localizadas entre la lámina basal y el epitelio. Las células se unen entre sí por medio de desmosomas. Los conductos intercalares se unen a la parte secretora con el conducto granular que

solamente existen en la glándula submandibular de las ratas, el epitelio de los conductos granulares es columnar.²⁵⁻²⁷

En machos adultos estos conductos constituyen un gran porcentaje del volumen de la glándula, posee más gránulos eosinófilos secretores y son más largos y anchos que en las hembras. Estas células tienen dependencia hormonal y son sensibles a la testosterona cuyas sustancias van a dar una variación morfológica en las glándulas de la rata. El siguiente sistema de conductos es el conducto estriado que se encuentra revestido por una hilera de células epiteliales cilíndricas con citoplasma acidófilo y núcleos esféricos de localización central. Se denominan estriados por que se distinguen una serie de estriaciones perpendiculares a la superficie basal de las células altas; estos conductos entran en los conductos excretores y se unen para formar el conducto principal excretor. Los conductos que corren por los tabiques de tejido conjuntivo ya fuera del lobulillo son denominados conductos excretores terminales o colectores; estos conductos en sus primeros tramos interlobulillares y a medida que confluyen se denomina interlobulares. Están compuestos de epitelio columnar y el núcleo está localizado apicalmente y con un citoplasma estriado. La unión de estos últimos originan el conducto principal. El conducto principal está constituido por varios tipos de células como células claras, oscuras y basales, todas con membrana basal. La célula más prominente en el revestimiento del conducto excretor de las glándulas submandibular son las células claras. El conducto excretor a medida que se acerca a la apertura de la desembocadura en la cavidad bucal se va transformando de epitelio columnar estratificado a epitelio plano estratificado.²⁵⁻²⁷

4. FISIOLÓGÍA DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES EN RATA.

La función de las glándulas salivales es humedecer el alimento para comenzar el proceso de digestión. La salivación es una función compleja regulada por el sistema nervioso autónomo; la saliva es una mezcla de amilasa, mucina,

electrolitos, inmunoglobulinas, agua y otros componentes. La saliva producida por las glándulas submandibulares es más viscosa que la parotídea, contienen cantidad considerable de glicoproteínas sulfatadas, cistinas y otras proteínas. En esta secreción se ha identificado el NGF y EGF, este último favorecería la cicatrización en caso de heridas a nivel de la mucosa bucal.²⁸⁻²⁹

Dos hormonas y factores de crecimiento, han sido el foco de interés y esfuerzos de nuevos estudios, sobre todo en relación con el desarrollo de neoplasias y la organogénesis normal. La extirpación salival o la ligadura de los conductos demuestran que estas glándulas tienen influencia sobre una amplia gama de funciones endocrinas y exocrinas que han sido reconocidas. La regeneración del adenómero de la glándula submandibular tarda 65 días y sus conductos 95 días, los adenómeros de la glándula sublingual se regeneran en 60 días y los de la parótida en 41 días.^{5, 19, 29}

I. FACTORES DE CRECIMIENTO.

La función principal de los factores de crecimiento es la del control externo del ciclo celular mediante el abandono de la quiescencia celular (G0) y la entrada de la célula en la fase G1. Además estimula la proliferación celular mediante la regulación del ciclo celular (iniciando en la mitosis) y mantiene la supervivencia celular estimulando la migración y diferenciación celular. Actúan uniéndose a receptores celulares situados en la membrana celular que transmiten la señal del exterior al interior de la célula mediante el acoplamiento de diferentes proteoquinasas que se fosforilan y que activan una cascada de señales que acaba con la activación de uno o varios genes (lo que es la traducción de señales).¹

La función de los factores de crecimiento está regulada por diferentes mecanismos que controlan la activación genética, las cuales son:

- Transcripción y traslocación del gen del factor de crecimiento.
- Modulación de emisión de señales por el receptor.
- Control de la respuesta celular por moléculas con acción opuesta a la respuesta inicial.
- Control extracelular por la disponibilidad del factor de crecimiento que es atrapado en la matriz extracelular.¹

1. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

La familia de EGF, abarca el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor transformante α (por sus siglas en inglés TGF α , transforming growth factor alfa) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), presentan gran influencia en el desarrollo fetal del pulmón, dientes, paladar, y glándula submandibular. El EGF fue el primer factor que se aisló en ratones machos adultos en 1962, y los sitios de síntesis del factor fueron las glándulas salivales e intestinos en humanos, ratas y ratones.^{2, 30} Es un polipéptido de 53 aminoácidos que puede aislarse en grandes cantidades de las glándulas salivales submandibulares en ratones. Es un potente mitógeno sintetizado por las ratas y ratones en las glándulas

submandibulares y ha sido reconocido en el crecimiento y diferenciación de las células por la actividad del receptor de la actividad de tirosina cinasa y como segundo mensajero fosfotirosina en la señal de transducción.^{2, 30, 32}

El EGF estimula el crecimiento de las células epiteliales, fibroblastos y células gliales. En el ratón adulto el factor es sintetizado en las células granulares de los túbulos contorneados en la glándula submandibular y en las células distales del riñón. La presencia del EGF en los tejidos en desarrollo, en la leche materna y la localización de los receptores del factor en los tejidos en desarrollo sugieren un papel del factor en el proceso de desarrollo.³⁰⁻³²

La administración subcutánea de EGF a las ratas de 10 microgramos/kilogramo cada 8 horas por 2 ó 3 días inhiben la síntesis pancreática del ADN, incrementa la actividad de la amilasa en la saliva; seguido de la estimulación de la secreción con pilocarpina con una correspondiente disminución de la actividad enzimática en la glándula.²⁹

2. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (por sus siglas en inglés EGFR) es una glicoproteína transmembrana de 170 kD que puede unirse a diversos ligandos y ser activado por estos, que incluyen el EGF, TGF α y ciertos factores de crecimiento codificados viralmente.³³⁻³⁴

La unión del ligando inicia la actividad de la tirosina quinasa intrínseca del receptor, la cual está asociada al dominio intracelular de la molécula. La activación de la quinasa produce la rápida autofosforilación del EGFR, la fosforilación subsiguiente de otros sustratos celulares, tales como fosfolipasa C-II. Se producen varios eventos de señalización, tales como un incremento del calcio intracelular, la cual produce varias respuestas celulares que incluyen síntesis incrementada de ADN, proliferación y diferenciación celular.³⁵⁻³⁶

Se observa una fuerte inmunotinción en la mayoría de los tejidos recubiertos por epitelio escamoso estratificado y pseudoestratificados, utilizando anticuerpos del EGFR. Por ejemplo se informa de una intensa tinción de membrana en la capa basal de la epidermis de la piel y también en células basales de la capa epitelial escamosa estratificada de la cerviz, la lengua y la mucosa oral.³⁴⁻³⁷

3. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Albert Coons (1942) descubrió que los tintes fluorescentes podían ser utilizados con anticuerpos sin transformarlos, con la habilidad de asociarse específicamente a tejidos del antígeno. Lo que permitió explotar la afinidad natural de los anticuerpos con los antígenos, como un sistema de visualización en el diagnóstico inmunopatológico. Stenberg (1970) popularizó el sistema de peroxidasas, lo que permitió la evaluación simultánea de la localización de antígenos y morfología de los tejidos fijados rutinariamente e incluidos en parafina, incrementando la sensibilidad de la metodología.

Los métodos de inmunohistoquímica son técnicas de inmunotinción que nos permiten identificar los antígenos característicos de diferentes líneas de diferenciación y funcionalismo celular, que se presentan en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcadores, sobre diversas muestras tisulares.

Las técnicas de inmunohistoquímica se basan en la capacidad de los anticuerpos unir específicamente a los anticuerpos correspondientes. La reacción solo se puede observar si el anticuerpo se encuentra marcado con una sustancia que emite la luz o que genere coloraciones. La aplicación de anticuerpos sobre los cortes tisulares nos permite observar la localización microanatómica de su expresión y la correlación con los parámetros morfológicos, aumentando la sensibilidad y especificidad del estudio.

Es esencial la conservación y preservación del tejido desde que se obtiene la muestra, fijándolos bien para que su procesado e inclusión se realicen correctamente y los resultados sean lo más fiable posible.² Estas técnicas sobresalen en la actualidad, como una herramienta rutinaria en el diagnóstico inmunopatológico, principalmente en tumores de origen desconocido.

J. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los factores de crecimiento son importantes en el organismo y en los diferentes tejidos ya que regulan y estimulan la migración y diferenciación celular. El EGF y el EGFR son mitógenos para las células animales y humanas, en diversos estudios han encontrado que poseen una relación directa en el desarrollo de las glándulas salivales.

Por lo anterior, surge la necesidad conocer ¿Si el EGF y EGFR se presentan a diferentes concentraciones en las diversas etapas del desarrollo de la glándula submandibular en un modelo experimental? O ¿Si siempre mantienen una concentración constante durante todo el transcurso del desarrollo glandular?

K. JUSTIFICACIÓN.

Es importante conocer la localización de EGF y EGFR en las etapas del desarrollo glandular submandibulares, ya que dicha glándula participa de forma directa en la producción de los factores de crecimiento y dichos factores se encargan de la proliferación y estimulación celular, sobre todo en las células acinares y conductos de dicha glándula.

Esto hace necesario identificar la estructuras histológicas que posee las glándulas submandibulares, en sus etapas de desarrollo, con la tinción de H&E para resaltar el efecto que posee el EGF y EGFR en dicha glándula.

L. HIPÓTESIS.

La presencia del factor de crecimiento epidérmico y de su receptor en las diversas etapas de desarrollo de la glándula submandibular es directamente proporcional a la proliferación en las estructuras de la glándula.

M. OBJETIVOS.

Objetivos generales.

- ❖ Determinar la presencia e intensidad de expresión del EGF y EGFR en el desarrollo de la glándula submandibular en un modelo experimental al día de nacido, 5, 10, 16 y 18 días postnatal.

Objetivos específicos.

- ❖ Establecer la presencia del EGF y EGFR en las estructuras de las glándulas submandibulares en las diferentes etapas de desarrollo y correlacionarlas con el día de observación (1, 5, 10, 16 y 18 días posnatal).
- ❖ Establecer las estructuras histológicas que poseen las glándulas submandibulares en los días 1, 5, 10, 16 y 18 de desarrollo posnatal, con la tinción de H&E.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Tipo de estudio. Experimental, transversal y descriptivo.

2. VARIABLES.

2.1. Variables independientes.

- Genero. Nominal.
- Edad. Ordinal, numérica (1, 5, 10, 16 y 18)
- Tipo de glándula salival. Glándula submandibular.

2.2. Variables dependientes.

- Etapas de desarrollo histológico en la glándula submandibular.
- Grado de intensidad del EGF y EGFR en la glándula submandibular.

2.3. Definición de variables

Género	Hembras y machos debido a que no se tomará en cuenta el género de la camada.
Edad	Se tomará en cuenta la edad posnatal en el cual se sacrificará al modelo experimentan, las cuales son 1, 3, 5, 16 y 23 días postnatal.
Tipo de glándula.	Glándulas submandibulares.
Etapas 1. Formación del brote.	El ectomesénquima subyacente ejerce un efecto inductor sobre el epitelio bucal, causando un ensanchamiento focal y la formación de un pequeño brote.
Etapas 2. Brote inicial	El brote se invagina en el ectomesénquima subyacente y se une a



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

	<p>la superficie bucal por medio de un conducto, este conducto continuará para formar el conducto principal de la glándula y es visible como hoyuelo leve sobre la superficie bucal donde se inicia la formación del lumen.</p>
<p>Etapa 3. Pseudoglandular.</p>	<p>Los cordones que al principio son sólidos, desarrollan una luz en su interior, transformándose en conductos que permiten el acceso libre entre la saliva que genera el adenómero y la cavidad bucal.</p>
<p>Etapa 4. Canalicular.</p>	<p>La canalización de los cordones epiteliales para formar los conductos se producen por degeneración de las células centrales del cordón.</p>
<p>Etapa 5. Brote terminal</p>	<p>Los cordones desarrollan luz en su interior, los cuales forman los conductos, mientras que sus extremos distales se diferencian en acinos. Continuamente se producen las diferenciaciones citológicas a nivel de las diferentes porciones de los conductos y de las unidades secretoras terminales. La diferenciación de la glándula sigue después del nacimiento con la formación de los conductos glandulares que terminan de diferenciarse hasta la pubertad.</p>

3. CRITERIOS.

3.1. Criterios de inclusión.

- Ratas Wistar gestantes sanas.
- Productos a término sanos.
- Factor de crecimiento epidérmico y receptor del factor de crecimiento epidérmico.

3.2. Criterios de exclusión.

- Ratas hembras que no hayan tenido camada.
- Ratas madres que hayan enfermado o muerto en el periodo de gestación.
- Productos a término muertos.

4. METODOLOGÍA.

1.- Se aparearon las ratas cepa Wistar hembras, teniendo un macho por hembra, ambos sanos y adultos, se esperó al día de nacimiento de los fetos de las ratas para sacrificarlas.

2.- Se sacrificaron las ratas por medio de sobredosis las primeras 24 horas de nacimiento, para obtener los días 1, 5, 10, 16 y 18.

3.- Se realizó un corte en sentido longitudinal, caudal al cuello, para conservar la glándula submandibular y separar la cabeza del cuerpo (Fig. 18).

4.- Se fijó la cabeza en paraformaldehído al 4%.

5.- Se realizó la disección de la glándula submandibular, retirando la piel de la parte ventral y lateral del cuello, y removiendo la fascia.

6.- Se disecó la glándula submandibular que se encuentra en la parte anterior y media del cuello, sumergiéndola en paraformaldehído al 4% para conservar la morfología y composición de la glándula (Fig. 18)

7.- Se procesaron las muestras de forma automatizada, en los siguientes pasos: deshidratación, clarificación, emulsificación e inclusión en parafina.

8.- Se realizaron los cortes en el microtomo, se tiñeron con Hematoxilina & Eosina (H&E). Se montaron para su observación (Fig. 19)

9.- Se observaron al microscopio y se tomaron microfotografías.

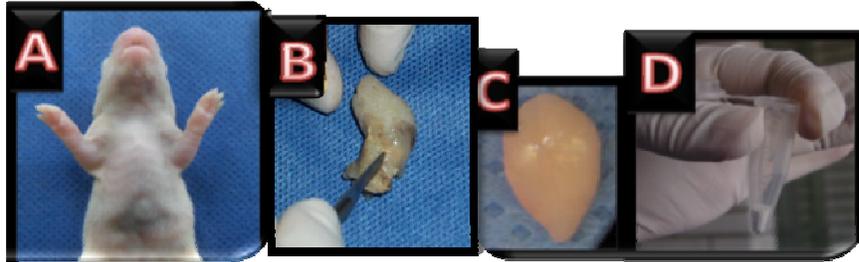


Fig. 18. A) Producto preparado para la disección, B) Disección de la glándula submaxilar, C) Obtención de la muestra, D) Fijación en paraformaldehído.

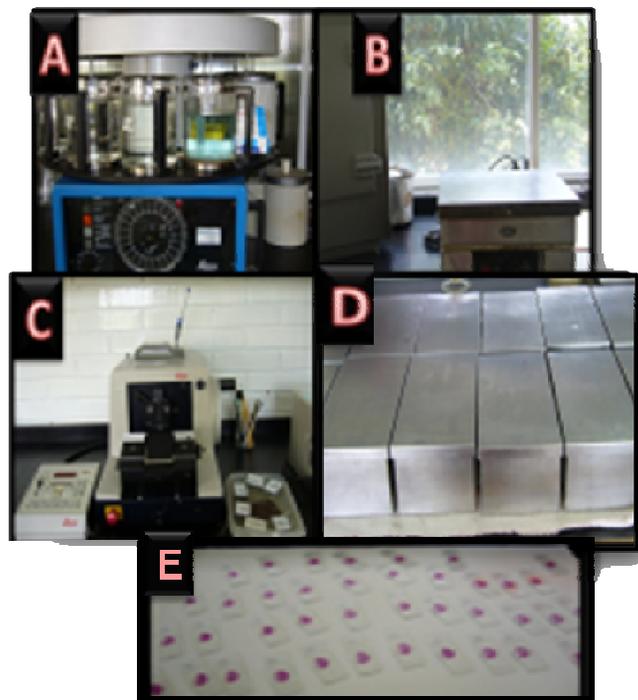


Fig. 19. Procesamiento de las muestras; A) Deshidratación (histoquinete) y clarificación, B) Inclusión en parafina, C) Corte en micrótopo, D) Tren de tinción en H&E, E) Montaje de las muestras.

1. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Una vez que se obtuvieron las laminillas, se desparafinaron las laminillas y se prehidrataron los cortes de tejido con las siguientes soluciones: xilol, xilol-alcohol,

alcohol del 96°, alcohol del 100° y agua bidestilada, con inmersiones de 10 minutos en cada una de las soluciones. Posteriormente se lavo con buffer de fosfato con un pH de 7.4 (PBS 1X) tres veces, 5 segundos cada uno.

Para identificar EGF y EGFR:

1. Para la recuperación antigénica.

Se realizó la recuperación de los componentes antigénicos por medio del buffer de citratos en caliente, dejando atemperar por un tiempo de 10 a 15 minutos. Se lava con PBS 1x tres veces 5 minutos cada uno.

2. Eliminación de la peroxidasa tisular.

Se colocaron las laminillas en frascos de Köplin y se le añadieron 50 ml de solución de peróxido de hidrógeno por 15 min. Posteriormente se lavó con PBS 1X tres veces cada 5 segundos, luego se le coloca la solución de albumina por 20 min a temperatura ambiente. Se colocó la solución necesaria de albumina para cubrir todo el tejido, la laminilla se situó dentro de la cámara húmeda, para posteriormente lavar con PBS 1x tres veces por un lapso de 5 minutos cada uno. Se lavaron las muestras con PBS 1x tres veces 5 minutos cada uno.

Secando posteriormente las laminillas con una gasa, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado, cubriendo todo el tejido previa colocación de las laminillas dentro de la cámara húmeda y se incubo a 36.5° por 60 minutos. Posteriormente se lavó con PBS 1x por tres veces cada 5 minutos cada uno, y finalmente se secaron las laminillas.

3. Revelado con DAB (Cromógeno).

Se colocó sobre cada una de las laminillas la solución de DAB, necesaria para cubrir todo el tejido iniciando el cronómetro. Después de 5 minutos se enjuagó con PBS 1x, colocando el espécimen en PBS 1x, manteniéndola ahí hasta completar la totalidad de las muestras para finalmente sumergirlas en agua desionizada.

4. Contraintinción.

Se realiza con hematoxilina de Gil (para realizar el contraste de núcleos), se lavó con agua corriente las laminillas por 5 minutos. Se deshidrataron los cortes de los tejidos pasándolos por soluciones de alcohol de 96° (2 veces, tres minutos cada uno), alcohol 100° tres minutos, xilol- alcohol (50:50) 5 minutos y xilol (2 veces) por diez minutos en ese orden.

5. Montaje de los tejidos.

Se secaron cada una de las laminillas de la solución de xilol, colocándolo en la porción lateral del portaobjeto una línea de resina de montaje, dejando descansar el cubreobjeto en el portaobjeto iniciando en la zona con resina; evitando la formación de burbujas y eliminando aquellas burbujas presentes con el exceso de resina. Se colocaron las laminillas en posición horizontal en un cartón por 24 horas, para asegurar la solidificación de la resina. Finalmente se realizó la observación de los tejidos al microscopio, fotografiando las zonas representativas.

2. ANÁLISIS POR DENSIDAD ÓPTICA.

Para el análisis de inmunomarcaje obtenido en las laminillas, se realizó una medición en píxeles las cuales fueron obtenidas por medio de un software de análisis de imágenes, IMAGE J. Para la calibración de las diferentes tonalidades de grises, desde el negro hasta llegar al blanco, se utilizó una tabla de 18 tonos de grises, numerando el blanco como 1 y el negro como 18, obtuvimos de cada tono una lectura de densidad óptica (PIXELES) con la misma área de medida. (Fig. 20) Posteriormente se realizó una curva de calibración (Fig. 20) y se realizaron mediciones en las laminillas obtenidas con inmunomarcaje y se midieron 10 áreas en campos de 40x de 5 zonas diferentes de cada laminilla en donde existía presencia de inmunorespuesta, las fotomicrografías seleccionadas fueron obtenidas con el MO. Se cambió cada fotomicrografía de RGB (por sus siglas en inglés red, green y blue; rojo, verde, azul en el cual hace referencia a la composición de la intensidad de los colores primarios) a una imagen con formato

de 8 bits para realizar las mediciones y obtener así los datos en base a la escala de grises que se utilizó como parámetro de oscuridad y claridad. Posteriormente los datos que se obtuvieron fueron anexados en una hoja de cálculo para sacar el promedio de cada día con EGF y EGFR, y poder realizar el análisis estadístico.

AREA	DESV. EST.	DENSIDAD ÓPTICA	MEDIANA
1	255	252960	255
2	248	246016	248
3	234	232128	234
4	221	219232	221
5	192	190464	192
6	178	176576	178
7	150	148800	150
8	128	126976	128
9	119	118049	119
10	95	94240	95
11	77	76384	77
12	51	50502	51
13	41	49672	41
14	28	27776	28
15	17	16864	17
16	17	16864	17
17	8	7936	8
18	0	0	0

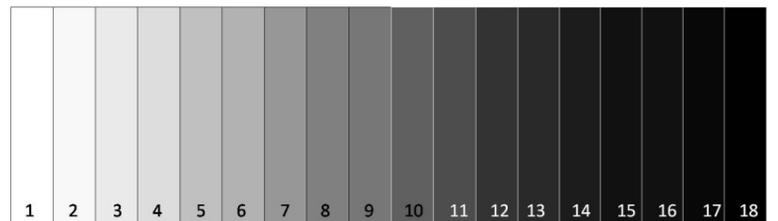
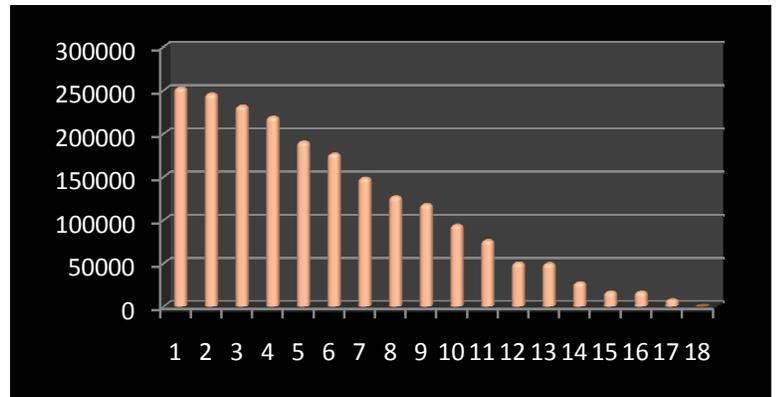


Fig. 20. Calibración de los 18 tonos de grises, para obtener la escala de calibración, para obtener en el inmunomarcaje la oscuridad y claridad en las laminillas analizadas

V. RESULTADOS

1. UN DÍA POSTNATAL.

1.1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA.

La glándula submandibular al día de desarrollo, empiezan a formar los brotes epiteliales invaginados en el estroma, que formarán los acinos y los conductos de la glándula. En los brotes epiteliales de los conductos se observa una luz en el centro, a diferencia de los brotes epiteliales de los acinos, en donde se encuentran las células epiteliales aglomeradas. (Fig. 21)

La glándula submandibular se encuentra en la **etapa 2: brote inicial**.

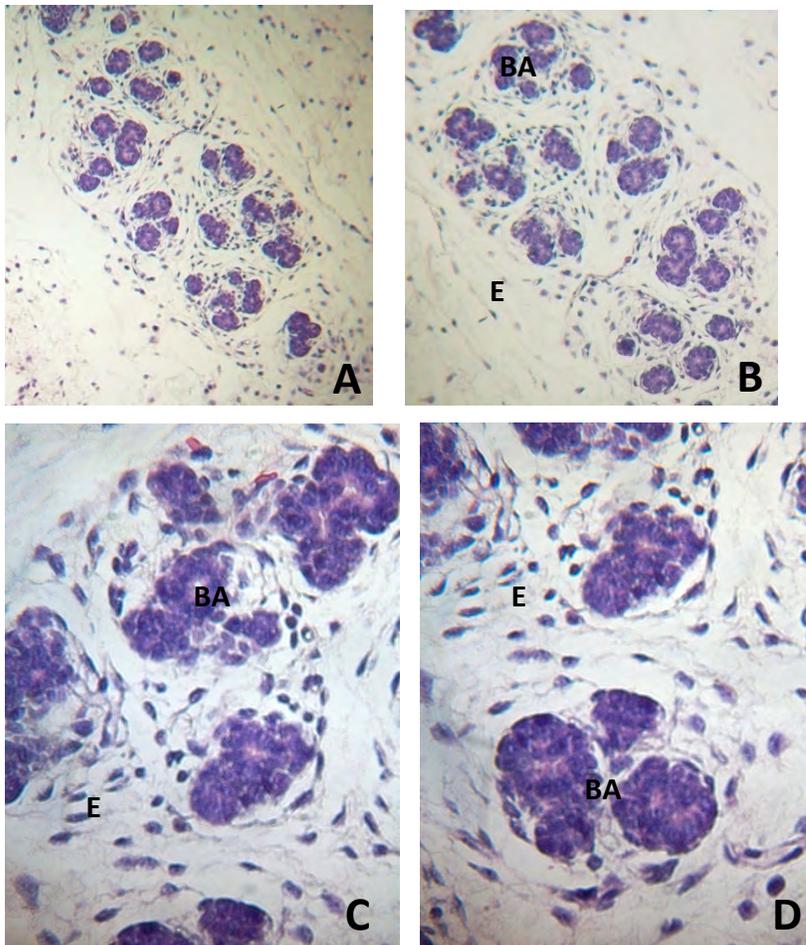


Fig. 21. Glándula submandibular a 1 día neonatal. Fotomicrografías a A) 10x, B) 20x, C) y D) 40x se observa los brotes epiteliales de los acinos glandulares (BA) invaginados en el estroma (E) fibroso laxo.

1.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.



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.

Se realizó la densitometría, en el parénquima glandular, para observar la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en cada uno de los días, se tomaron 10 medidas en 5 campos de 40x y se obtuvo el promedio.

1.2.1. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

Se observó el EGF en el citoplasma de los brotes epiteliales de los acinos y conductos, que al obtener la densidad óptica se apreció el factor de color gris debido a que el valor promedio de la densidad óptica fue de 166267.5, de acuerdo a la escala de grises. (Fig. 22)

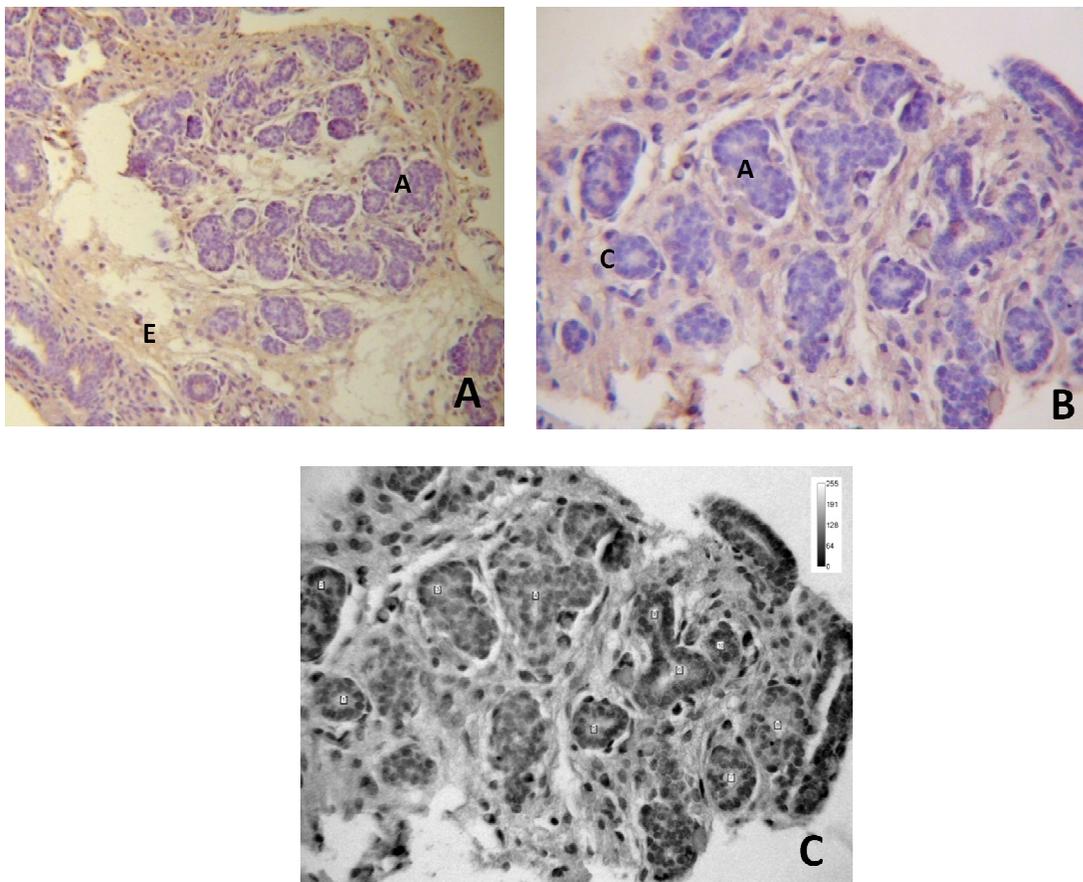


Fig. 22. Inmunohistoquímica con EGF a 1 día neonatal A) Se aprecia los brotes epiteliales (A) delimitados por el estroma de tejido conjuntivo (E), a 20x B) A 40 x podemos observar los brotes epiteliales de los acinos (A) y los conductos (C) con inmunotinción a EGF C) Densitometría del EGF en el cual hubo una inmunoreacción leve en el citoplasma de las células epiteliales de los acinos y conductos en desarrollo.

1.2.2. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

Se presentó el receptor en el citoplasma de las células epiteliales de los acinos y de los conductos en formación. Al obtener la densitometría se observó de color grisáceo en el citoplasma de las células epiteliales, y se encontró menor inmunoreacción a EGFR que con EGF. (Fig. 23)

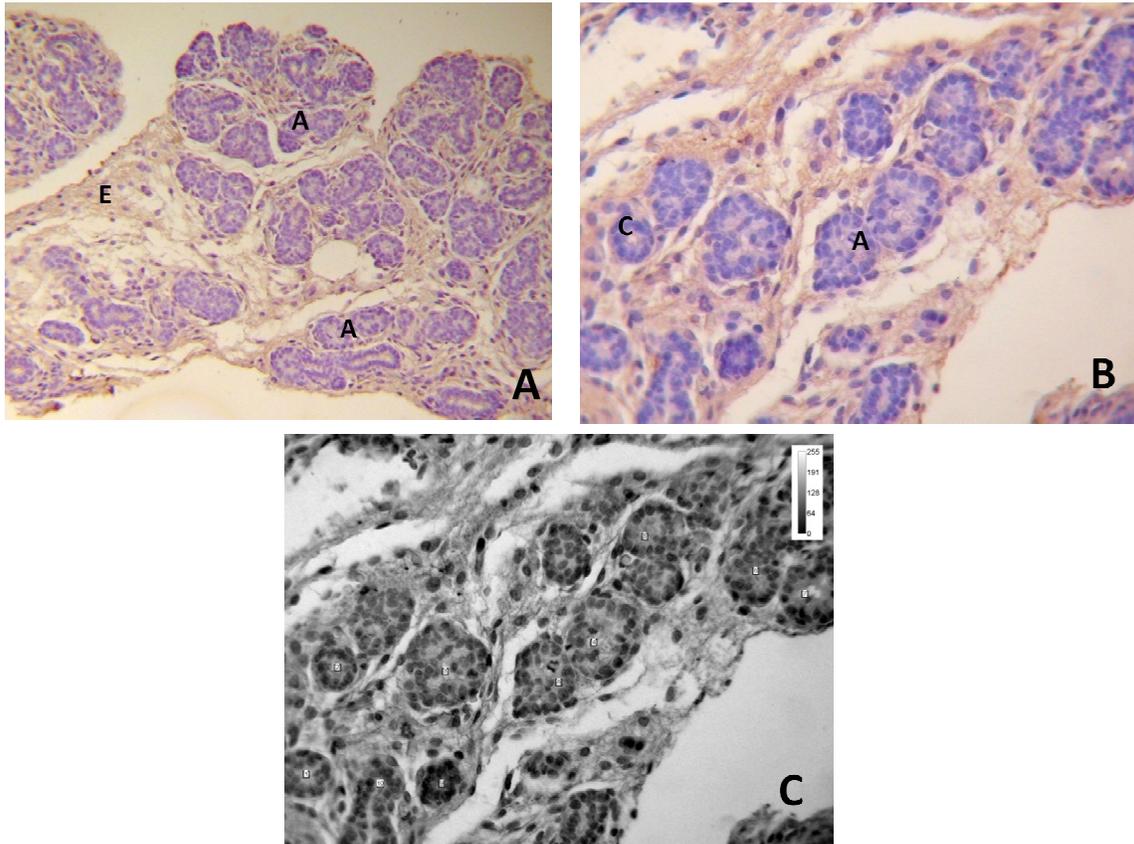


Fig. 22. Inmunohistoquímica con EGFR a 1 día neonatal A) A 20x se aprecian los brotes epiteliales de los acinos (A) delimitados por el estroma (E) de tejido conjuntivo. B) A 40x podemos observar inmunoreacción con EGFR en el citoplasma de las células epiteliales de los acinos (A) y de los conductos (C), observando una luz bien definida en el centro. C) Densitometría en el que se observa inmunotinción leve en el citoplasma de los brotes epiteliales de los acinos y conductos.

2. QUINTO DÍA POSTNATAL.

2.1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA.

En el quinto día aún no termina de formarse la glándula, los brotes se bifurcaron y se observa un racimo, se encuentran los conductos y acinos en proceso de diferenciación. Los conductos estriados se observaron de forma cúbica con pocas estriaciones, mientras que las células secretoras de los acinos serosos y mucosos se encuentran en citodiferenciación (Fig. 23). Por lo que se encuentra en la **etapa 3: pseudoglandular**.

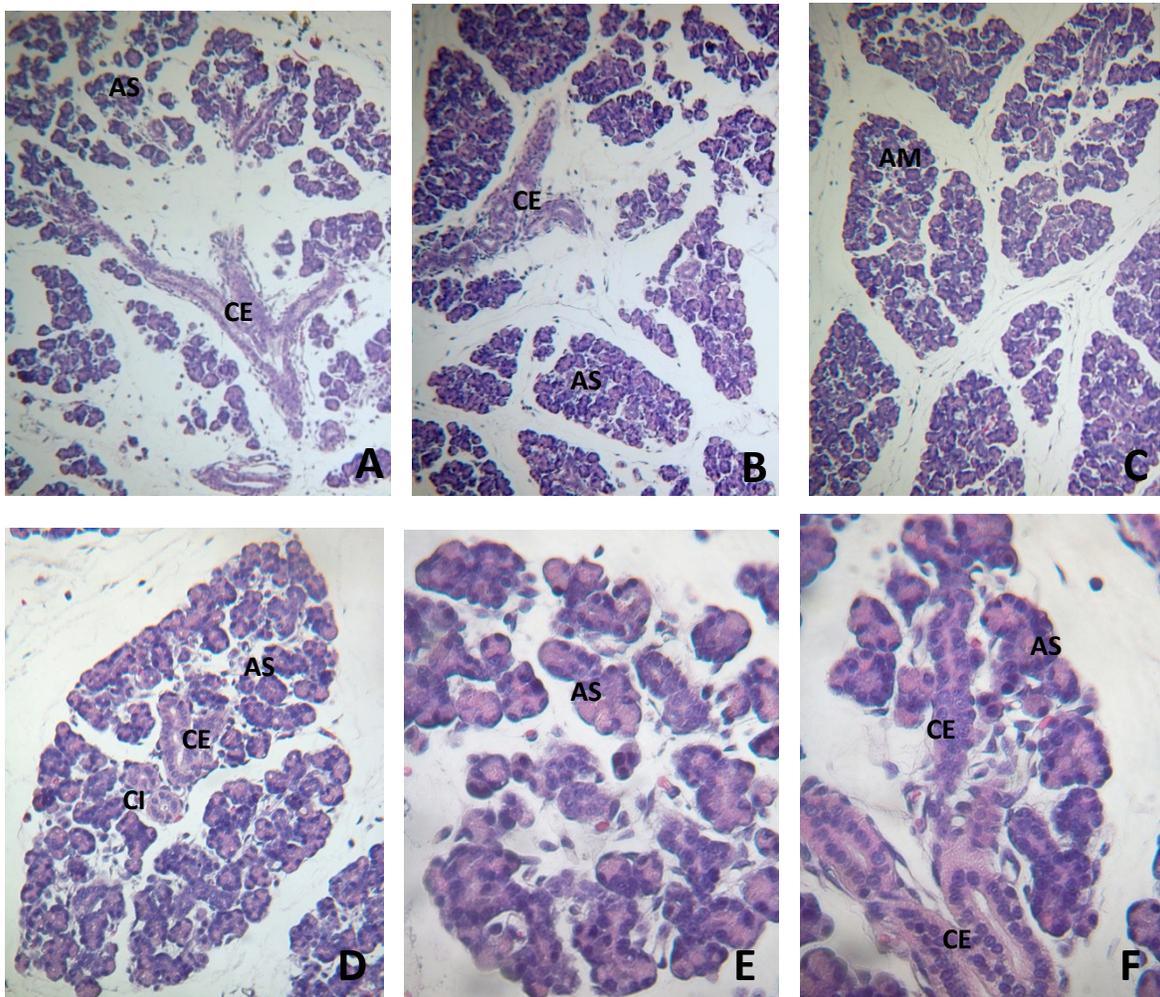


Fig. 23. Fotomicrografías A) y B) a 10x y C) Y D) a 20 x en el cual se observa el proceso de diferenciación de los conductos estriados (CE) e intercalares (CI) y la citodiferenciación de los adenómeros serosos (AS) y mucosos (AM). E) y F) Se observa a 40x el desarrollo de la luz de los conductos estriados (CE) que presentan células cúbicas altas, así como la citodiferenciación de las acinos serosos (AS).

2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.

2.2.1. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Al obtener la densidad óptica se observó el factor de color grisáceo, existiendo mayor inmunoreacción en este día que al día neonatal. Se expresó más el EGF en los acinos más cercanos a los conductos estriados e intercalares (Fig. 24).

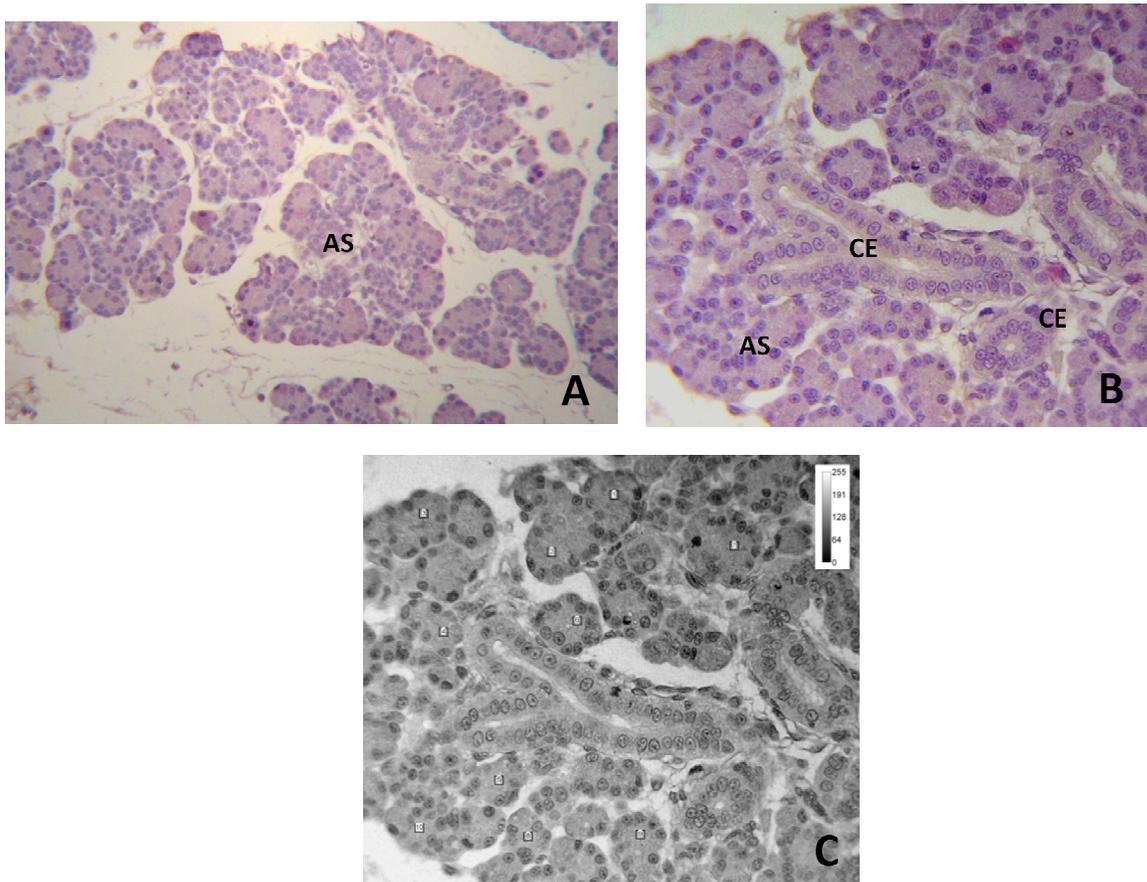


Fig. 24. A) Se observa a 20x la presencia del EGF en el citoplasma de los acinos serosos (AS). B) A 40x se aprecia los acinos serosos con inmunoreacción a EGF, en el citoplasma de las células, y en los conductos estriados (CE) se observan células epiteliales cúbicas con presencia del EGF, con núcleo centrado. C) Densitometría a 40x en el que se aprecia inmunoreacción leve en el citoplasma de los acinos serosos y en los conductos estriados (CE).

2.2.2. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

Se presentó en el citoplasma de las células acinares y al realizar la densitometría se observó que hubo menor inmunorespuesta con el receptor que con el factor. Se expresó más el EGFR en este día que al día de desarrollo postnatal (Fig. 25).

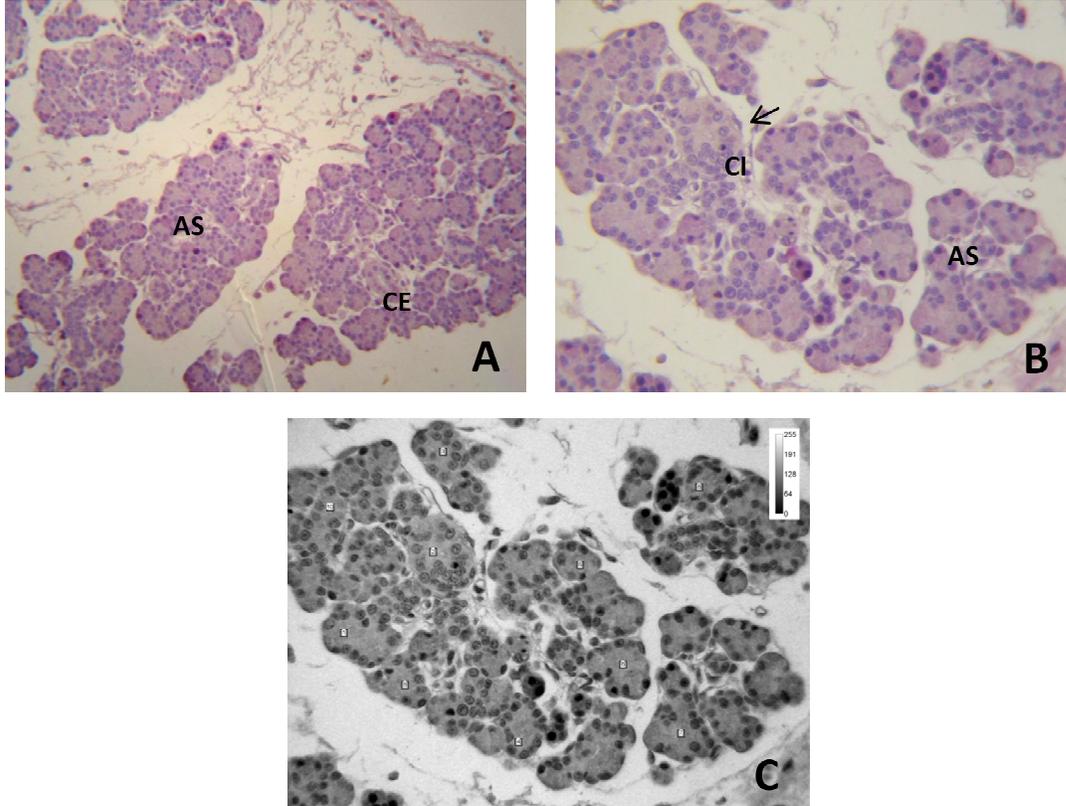


Fig. 25. Fotomicrografías con inmunorespuesta positiva A) Se observa a 20x la presencia del EGFR en el citoplasma de los acinos serosos (AS) y estriados (CE). B) A 40x se aprecia un conducto intercalar (CI), rodeado por células mioepiteliales (flecha) con reacción leve en el citoplasma y los acinos serosos (AS) con inmunotinción leve al EGFR. C) Densitometría a 40x en el que se aprecia inmunotinción positiva en el citoplasma de los acinos serosos y en el conducto intercalar (CI).

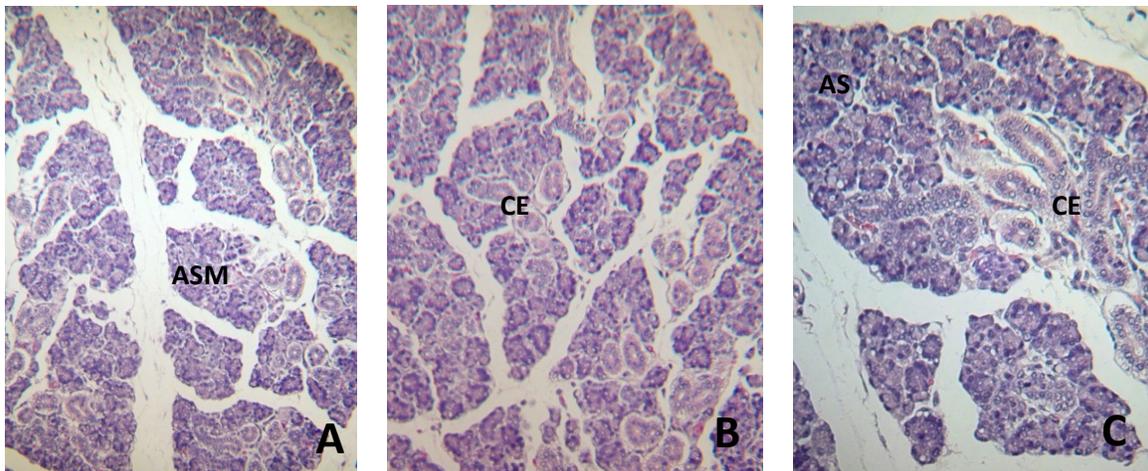
3. DÉCIMO DÍA POSTNATAL.

3.1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA.

La glándula submandibular de 10 días postnatales, se encontró que la arquitectura glandular estaba conformada por acinos serosos y mucosos con predominio

seroso. Se observó el conducto excretor bien desarrollado, con células cúbicas y planas, los conductos intercalares y estriados todavía se encuentran en proceso de diferenciación. Los acinos mucosos se encontraron rodeados por las semilunas serosas (semilunas de Gianuzzi), mientras que los acinos serosos se encontraron con un contorno bien definido, el núcleo de forma esférica y situados en la parte basal, el citoplasma presentó fuerte basofilia y abundantes gránulos de cimógeno.

Los conductos intercalares se observaron células epiteliales cúbicas bajas, con núcleos esféricos en la parte central, rodeadas por las células mioepiteliales, los conductos estriados presentaron células epiteliales columnares con estriaciones perpendiculares a la porción basa, encontrándose en la **etapa 4: canalicular**. (Fig. 26)





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

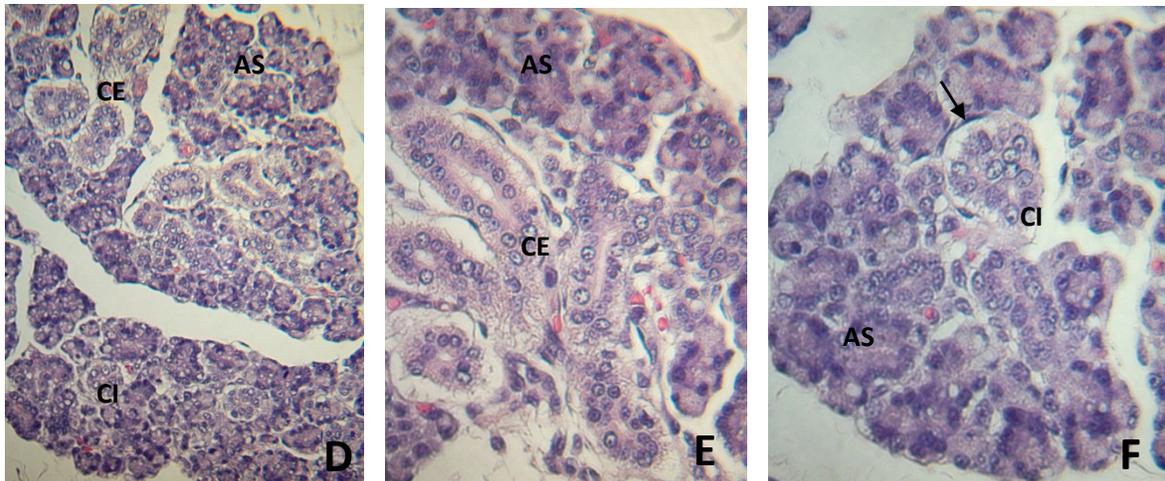


Fig. 26. Fotomicrografías de 10 días postnatales A), B) a 10x y C), D) a 20x se observa la arquitectura de la glándula, compuesta de acinos seromucosos (ASM) con predominio seroso (AS), así como los conductos estriados (CE) e intercalares (CI). E) y F) Se observan los conductos intercalares (CI), formados por células epiteliales cúbicas bajas rodeados por células mioepiteliales (flecha), y los conductos estriados (CE) formados por células epiteliales columnares con núcleos esféricos y con estriaciones basales. Los acinos serosos (AS) muestran un contorno bien definido, el núcleo esférico y situado en la parte basal, y el citoplasma basófilo.

3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.

3.2.1. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

Se presentó mayor inmunoreacción a EGF en el citoplasma de los acinos serosos en su porción más apical, así como en aquellos acinos que se encontraban cerca de los conductos intercalares y estriados. Se obtuvo la densitometría y se observó el factor de color grises, de acuerdo a la escala de grises, con un valor promedio en la densidad óptica de 203614.6. (Fig. 27)

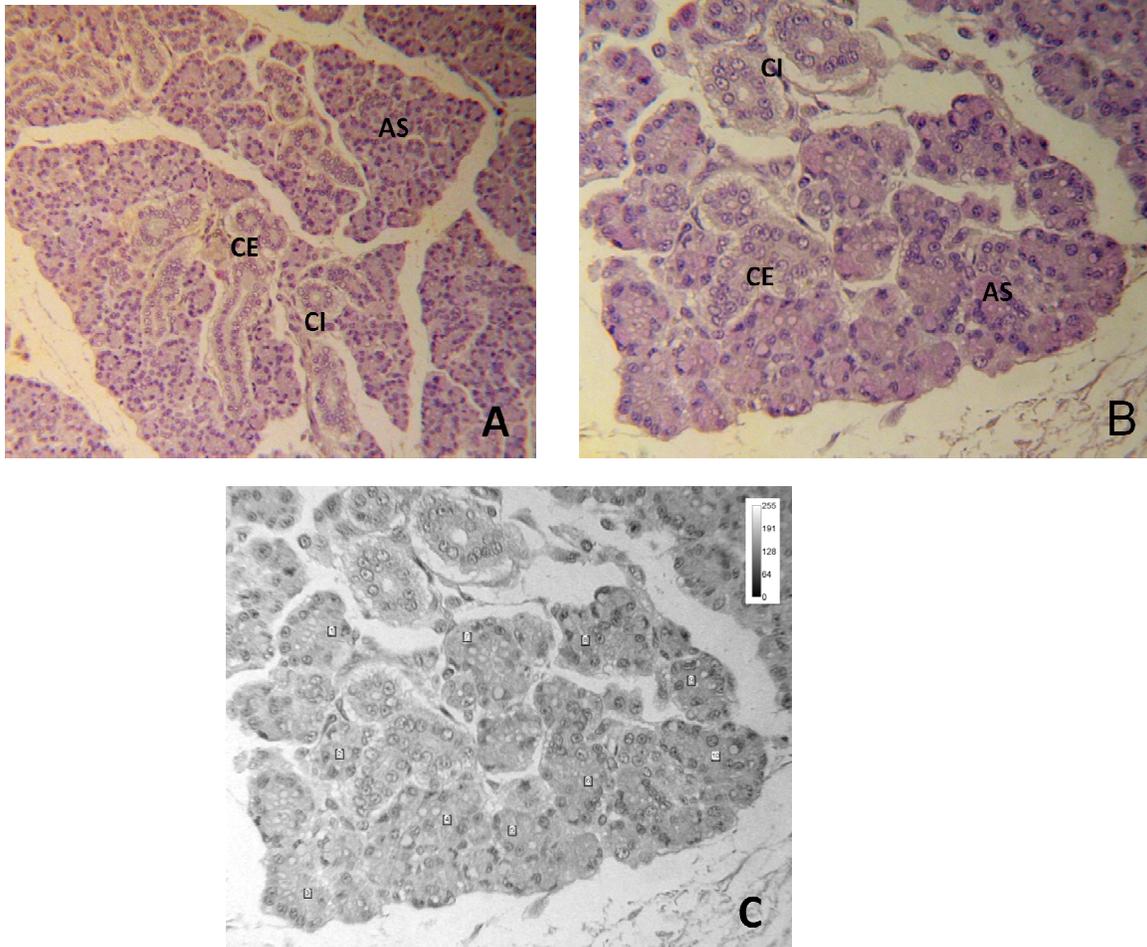


Fig. 27. A) A 20x se aprecia respuesta inmunohistoquímica con EGF de manera homogénea en los acinos serosos (AS) y conductos estriados (CE) e intercalares (CI). B) A 40x se observa la inmunotinción positiva en los acinos serosos al factor, los conductos intercalares (CI) presentan inmunoreacción leve, observando la luz bien delimitada. C) y E) Densitometría a 40x de los acinos serosos con inmunotinción leve, y se aprecia respuesta positiva en los conductos estriados (CE).

3.2.2. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

Se presentó mayor inmunotinción en el citoplasma de los acinos serosos que se encontraban cerca de los conductos estriados e intercalares, que en el resto de las

estructuras histológicas. Al obtener la densidad óptica se observó que hubo mayor respuesta inmunohistoquímica en este día que en los días 1 y 5 postnatales, pero menor inmunoreacción que con EGF. (Fig. 28)

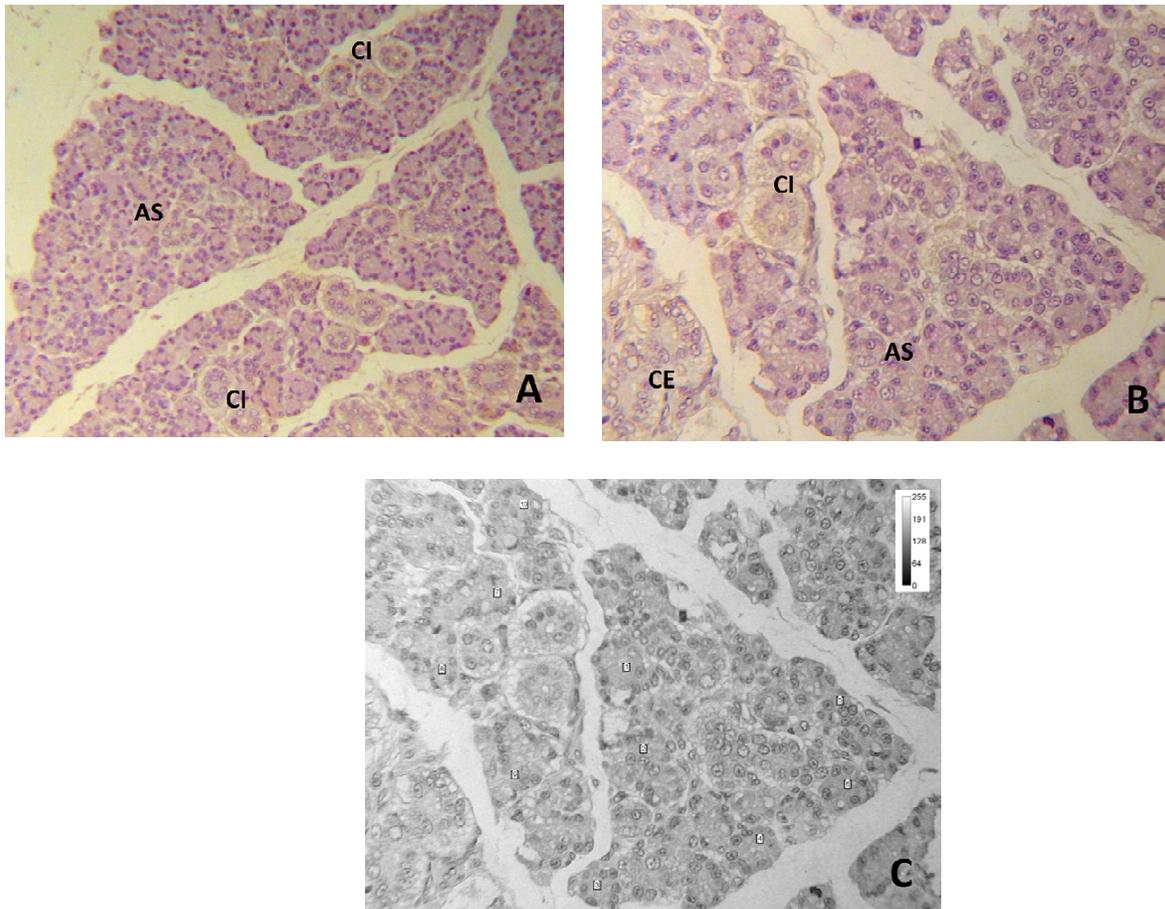


Fig. 28. A) Fotomicrografía a 20x en el cual se observa inmunoreacción positiva con EGFR tanto en los acinos serosos (AS) como en los conductos intercalares (CI). B) A 40x se observa respuesta inmunohistoquímica leve en el citoplasma de los acinos serosos y en los conductos estriados (CE) e intercalares (CI), C) Fotomicrografía de la densitometría a 40x de los acinos serosos (AS) con inmunotinción leve, se aprecia abundantes conductos intercalares (CI) con reacción leve en su citoplasma.

4. DECIMOSEXTO DÍA POSTNATAL.

4.1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Existe mayor desarrollo ductal y de los acinos, así como mayor cantidad de estructuras túbulo-acinares, observando la luz de los conductos bien definidos con presencia de secreción (Fig. 29). Por lo que si existe morfo-diferenciación a nivel de los conductos y unidades secretoras de la glándula salival, encontrándose en la **etapa 5: brote terminal.**

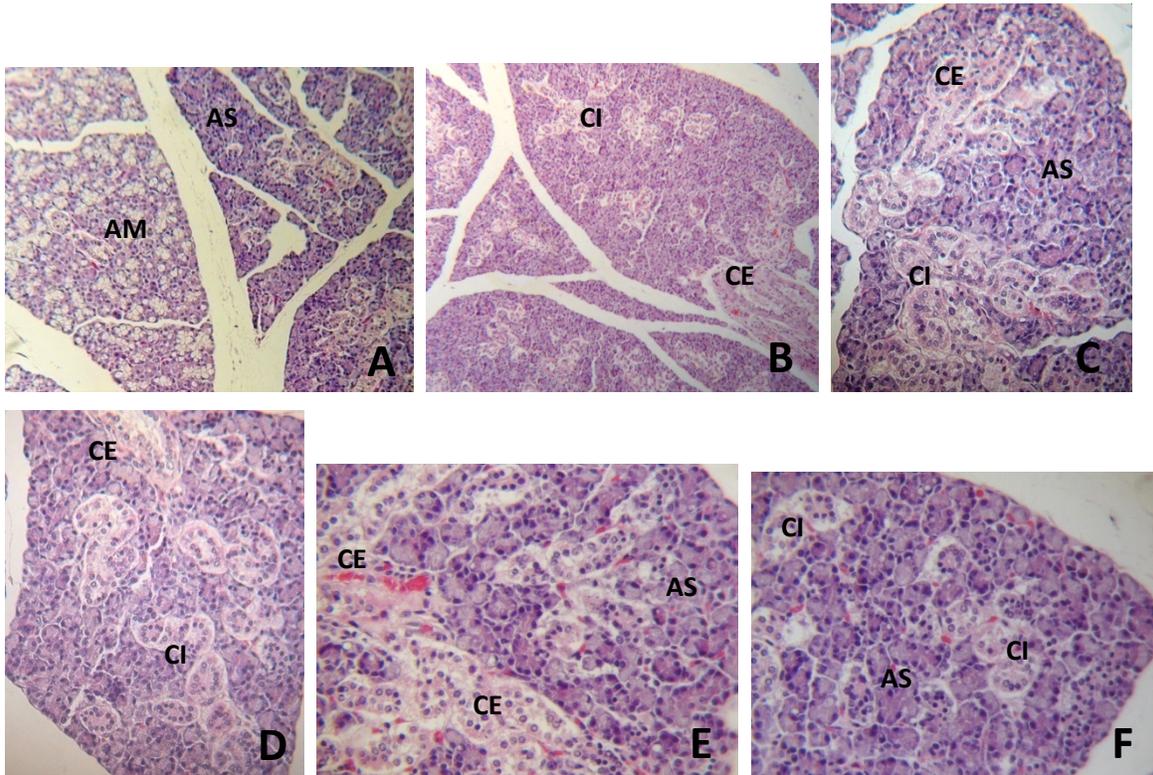


Fig. 29. A) y B) Se observa a 10x la arquitectura de los acinos mucosos (AM) y serosos (AS), con predominio seroso y mayor cantidad de acinos. C) y D) A mayor aumento, 20x, se aprecia mayor cantidad de conductos estriados (CE) e intercalares (CI) con mayor diferenciación. E) y F) A 40x se observa los conductos estriados (CE) revestidos por epitelio cilíndrico simple con estriaciones basales y núcleos esféricos centrales. Los conductos intercalares (CI) se encuentran formados por epitelio cúbicas bajas con núcleos centrales.

4.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.

4.2.1. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

Se realizó la densitometría y se encontró mayor reacción en todo el citoplasma de los acinos serosos y cerca de los conductos, así como en los conductos estriados e intercalares. Se observó el factor de color gris claro debido a que el valor promedio de la densidad óptica fue de 217666.7, de acuerdo a la escala de grises. (Fig. 30)

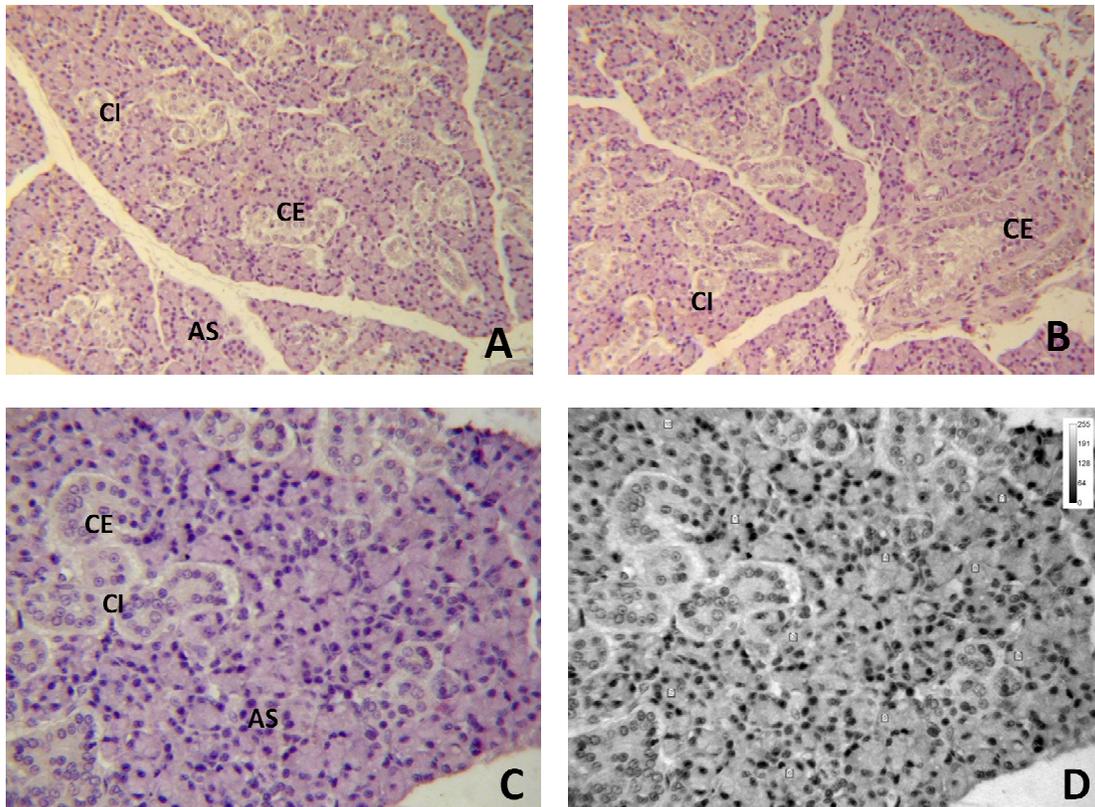


Fig. 30. Fotomicrografías con respuesta positiva al factor. A) y B) Se observa a 20x inmunotinción moderada con EGF en el citoplasma de los acinos serosos (AS), así como en los conductos estriados (CE) e intercalares (CI). C) A mayor aumento, a 40x se observa respuesta inmunohistoquímica en todo el citoplasma de los acinos serosos (AS) con abundantes conductos intercalares (CI) y estriados (CE), observando las células epiteliales cúbicas altas con estriaciones basales. D) Densitometría a 40x de los acinos serosos y conductos estriados e intercalares con inmunotinción moderada.

4.2.2. RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO.

Se expresó el EGFR en el citoplasma de los acinos serosos y los conductos estriados, así como en los conductos intercalares. Al obtener la densidad óptica se

observó el receptor de color grisáceo, por lo que hubo menor inmunoreacción al receptor que al factor. (Fig. 31)

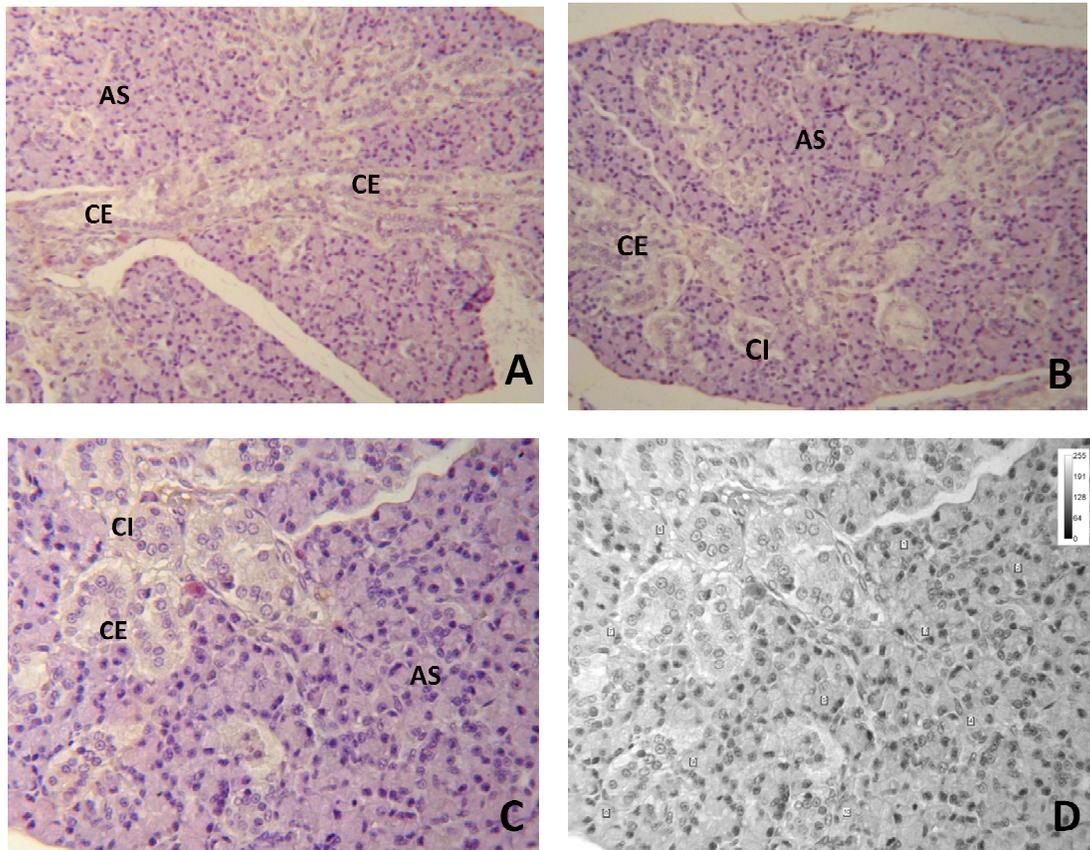


Fig. 31. Fotomicrografías a 16 días de desarrollo postnatal A) y B) A 20x se observa inmunoreacción moderada con EGFR en los acinos serosos, con abundantes conductos estriados (CE) e intercalares (CI). C) Se observa a 40x inmunotinción positiva en el citoplasma de los acinos serosos (AS) y conductos estriados (CE). D) A 40x se aprecia la densitometría en los acinos serosos y conductos estriados con inmunoreacción moderada.

5. DECIMOCTAVO DÍA POSTNATAL.

5.1. TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA.



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.

Las estructuras adenoméricas y el sistema ductal, de la glándula submandibular, se encuentran totalmente diferenciados y desarrollados, con un estroma laxo rodeando el tejido glandular (Fig. 32). Por lo que la glándula se encuentra en la **etapa 5: brote terminal**.

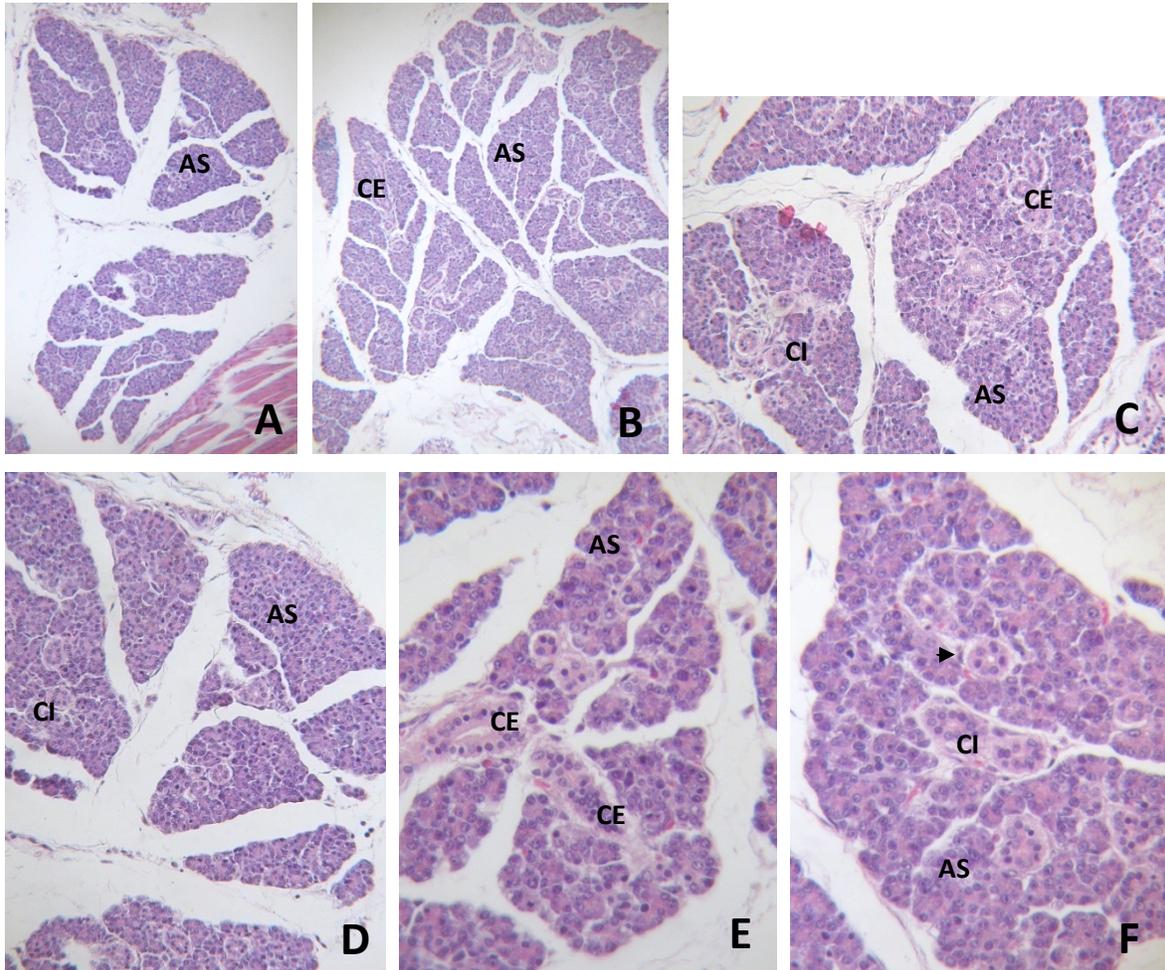


Fig. 32. A) y B) En una observación a 10x se aprecia gran cantidad de adenómeros y estructuras ductales. C) y D) A 20x se muestran los acinos serosos (AS) y abundantes conductos intercalares (CI) y estriados (CE) bien diferenciados. E) y F) A 40x se observa la arquitectura del conducto estriado (CE), revestidos por células epiteliales cilíndricas simples con un citoplasma eosinófilo y con estriaciones basales que disminuyen gradualmente. Se presentan abundantes conductos intercalares (CI) que muestran núcleos esféricos centrales rodeados por células mioepiteliales (flecha), al igual que los acinos serosos (AS).

5.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.

5.2.1. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

Se realizó la densitometría, se observó el EGF de color gris claro, y por lo consiguiente existió mayor inmunoreacción al factor en este día de desarrollo postnatal que con el resto de los días (días postnatales 1, 5, 10 y 16), localizándose en el citoplasma de los acinos serosos y sobre todo los que se encontraban cerca de los conductos estriados. (Fig. 33)

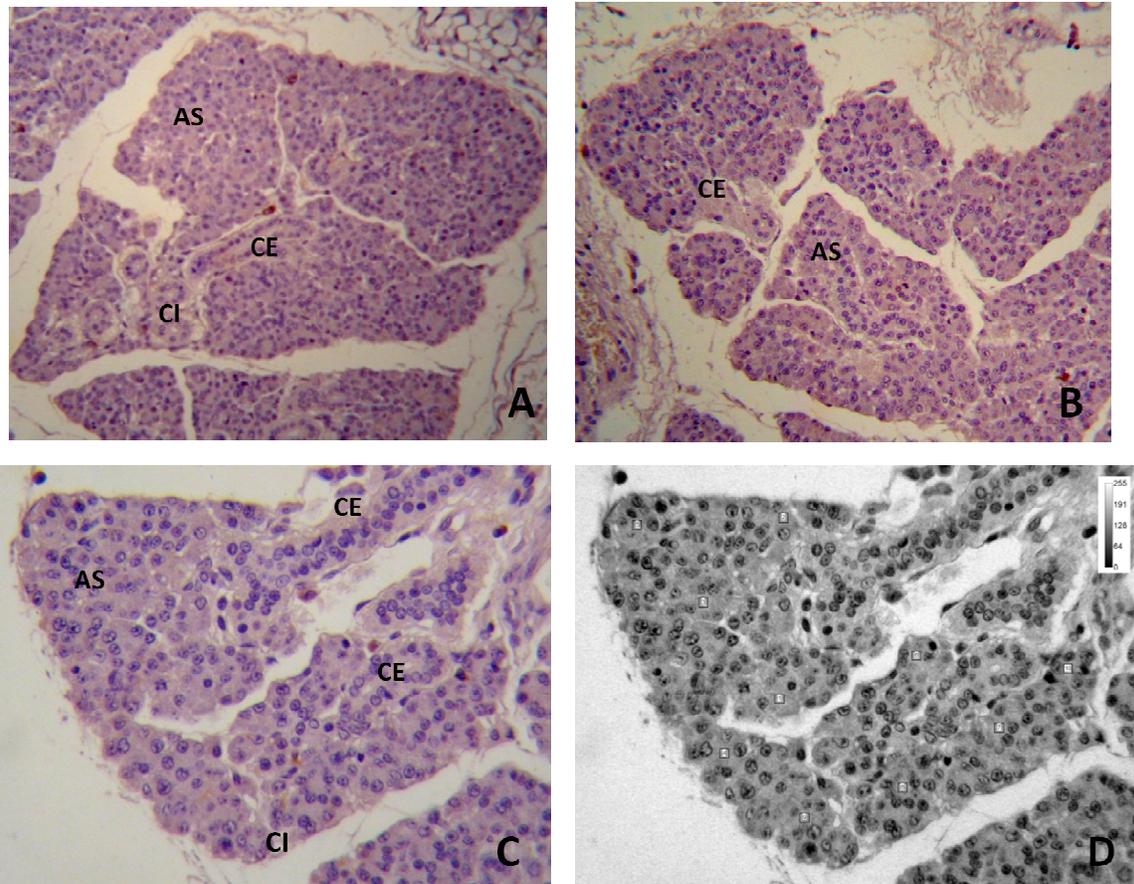


Fig. 33. A) y B) En una vista a 20x se aprecia inmunoreacción severa con EGF en los acinos serosos (AS), conductos intercalares (CI) y estriados (CE). C) Se observa a 40x inmunotinción positiva en el citoplasma de los acinos serosos (AS) y conductos estriados (CE), observando células epiteliales cubicas altas con núcleo central, y menor cantidad de conductos intercalares. D) Se aprecia la densitometría con inmunoreacción moderada, a 40x, en los acinos serosos más cercanos los conductos estriados.

5.2.2 RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.

Se encontró inmunoreacción moderada en el citoplasma de los acinos serosos que disminuía la expresión a EGFR en los acinos de manera gradual conforme se alejaban de los conductos estriados. Se realizó la densitometría y se observó el

receptor de color grisáceo claro, por lo que existió mayor inmunoreacción en este día que en el resto de los días (1°, 5°, 10° y 16° días postnatales), existiendo menor inmunotinción con el receptor que con EGF. (Fig. 34)

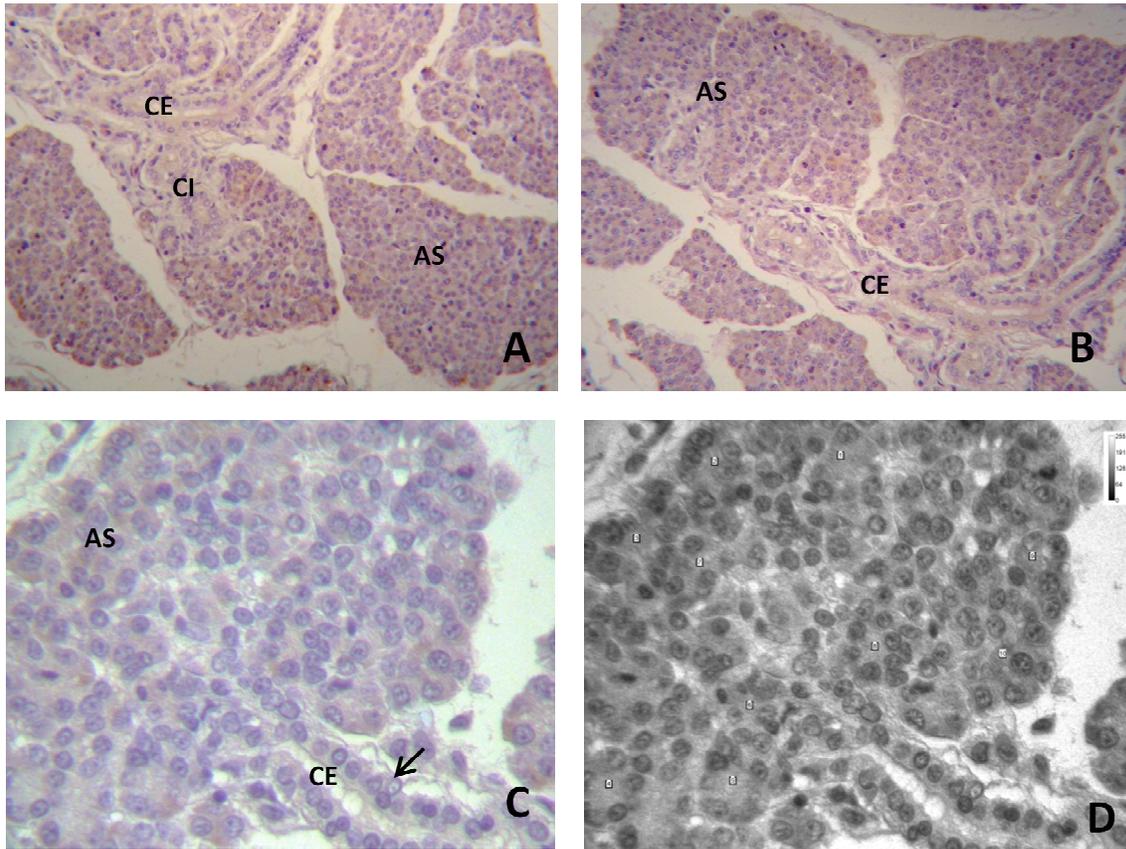


Fig. 34. Inmunohistoquímica con EGFR a 18 días neonatales A) y B) Se aprecia a 20x el tejido glandular bien desarrollado y con inmunotinción positiva C) A 40x podemos observar inmunoreacción moderada con EGFR en los acinos serosos (AS) y conductos estriados (CE), con menor cantidad de conductos intercalares. D) Densitometría en el que se observa inmunoreacción moderada en el citoplasma de los acinos serosos (AS) y en el conducto estriado (C), el cual se encuentra conformado por células epiteliales cúbicas con núcleo centrado (flecha).

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

6.1. ANÁLISIS DE EGF.

Se compararon los datos por medio del análisis de variación unidireccional (ANOVA) en el cual el valor de $P = <0.0001$ (valor de probabilidad, significancia de



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.

resultados), considerando este valor como extremadamente significativo (al realizar la diferencia existente entre los promedios del factor). La prueba estadística de comparaciones múltiples de Bonferroni se utilizó para comparar los promedios y verificar entre cuales de estos existió diferencia de importancia estadística, por lo que nos indica que el valor de $t = >3.153$, entonces el valor de $P = <0.05$.

COMPARACIÓN	DIFERENCIA	t	VALOR P
1 vs. 5	-16837 2.624	ns	$P > 0.05$
1 vs. 10	-37347 5.821	***	$P < 0.001$
1 vs. 16	-51399 8.012	***	$P < 0.001$
1 vs. 18	-103326 16.106	***	$P < 0.001$
5 vs. 10	-20511 3.197	*	$P < 0.05$
5 vs. 16	-34563 5.387	***	$P < 0.001$
5 vs. 18	-86489 13.481	***	$P < 0.001$
10 vs. 16	-14052 2.190	ns	$P > 0.05$
10 vs. 18	-65979 10.284	***	$P < 0.001$
16 vs. 18	-51927 8.094	***	$P < 0.001$



Fig. 35. Tabla y gráfica del análisis estadístico del EGF, observando en el día 18 postnatal con mayor diferencia significativa (expresión) que en el resto de los días. Al comparar los promedios de los días con EGF se observó que no existe diferencia significativa (^{ns}) entre el día 1 vs 5 y 10 vs 16, poca diferencia significativa (*) entre 5 vs. 10 y mucha diferencia significativa (***) entre los días 1 vs. 10, 16 y 18; 5 vs. 10, 16 y 18; 10 vs. 18 y 16 vs. 18 (Fig. 35). Esto significa que conforme se diferencia y crece el tejido glandular, los acinos y el sistema ductal,

requieren de mayor cantidad de EGF, ya que dicho factor participa de forma directa en el desarrollo y formación de la arquitectura glandular.

6.2. ANÁLISIS DE EGFR.

Se utilizó el análisis de variación unidireccional (ANOVA) para comparar los datos de EGFR, en el cual el valor de $P= 0.9790$ (significancia de resultados) es considerado como no significativo. La prueba estadística de comparaciones múltiple de Bonferroni, el cual se utilizó para comparar los promedios y verificar entre cuales existe diferencia de importancia estadística, nos indica que el valor de $t= >3.153$, entonces el valor de $P= <0.05$.

COMPARACIÓN	DIFERENCIA	t	VALOR P
1 vs. 5	5839.7 0.2771	ns	$P>0.05$
1 vs. 10	7523.9 0.3571	ns	$P>0.05$
1 vs. 16	9880.6 0.4689	ns	$P>0.05$
1 vs. 18	12981 0.6161	ns	$P>0.05$
5 vs. 10	1684.3 0.07993	ns	$P>0.05$
5 vs. 16	4041.0 0.1918	ns	$P>0.05$
5 vs. 18	7141.5 0.3389	ns	$P>0.05$
10 vs. 16	2356.7 0.1118	ns	$P>0.05$
10 vs. 18	5457.2 0.2590	ns	$P>0.05$
16 vs. 18	3100.5 0.1471	ns	$P>0.05$

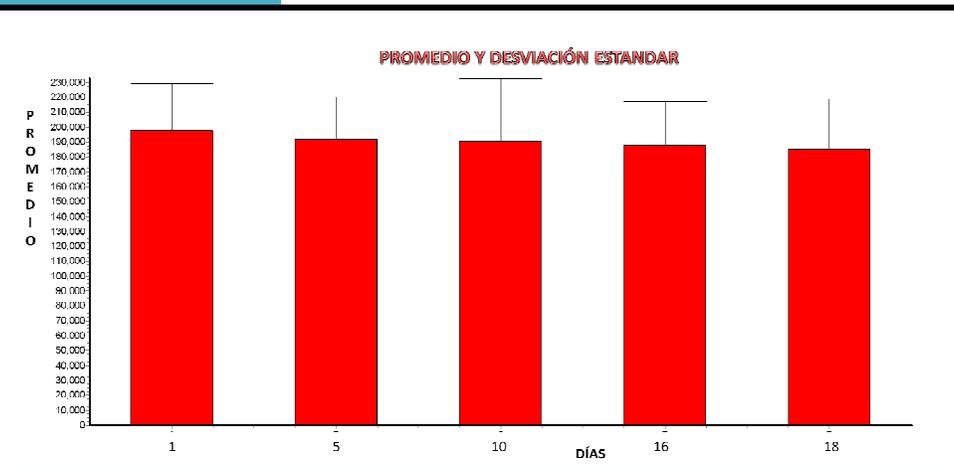


Fig. 36. Tabla y grafica del análisis estadístico del EGFR, observando ninguna diferencia significativa entre los días de desarrollo postnatal.

Al comparar los datos de todos los días (días posnatales 1, 5, 10, 16 y 18) con EGFR podemos observar que no existe diferencia significativa (^{ns}) entre un día y otro día (Fig. 36). Esto significa que en todos los días del desarrollo glandular existe la misma cantidad de receptor ya que se necesita mayor cantidad de EGF para la formación y desarrollo de la glándula salival, por lo consiguiente existe menor expresión del receptor.

6.3. COMPARACIÓN DE EGF CONTRA EGFR.

Para comparar EGF vs EGFR se utilizó la prueba estadística de Mann Whitney, que consiste en comparar 2 variables independientes cuyos datos han sido medidos al menos en una escala de nivel ordinal (con una variable continua). El valor con dos colas de $P= 0.4206$ es considerado como no significativo, el promedio de EGF fue de 221,127 y el promedio de EGFR fue de 197,933.

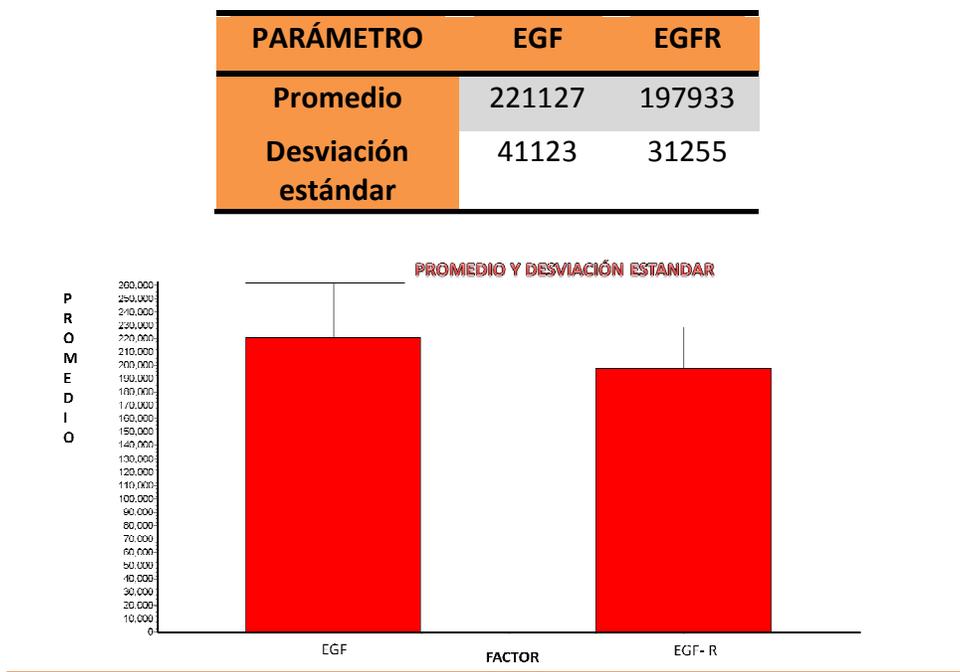


Fig. 37. Tabla y grafica comparando EGF y EGFR, con mayor expresión del EGF.



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.

Se presentó más el EGF que el EGFR en todos los días de desarrollo postnatal debido a que el factor presenta una acción directa en el desarrollo de la glándula salival, a nivel estructural, molecular y funcional (Fig. 37). Por lo que existió una mayor expresión con el factor, en el desarrollo postnatal de la glándula submandibular, y disminuye proporcionalmente la cantidad del receptor, para la formación de la arquitectura del tejido glandular.

7. ANEXOS ESTADÍSTICOS.

DIA	1	5	10	16	18
EGF	170730.5	196158.2	218953.6	242721.7	277073.2
	170892.4	180047.1	193412.1	203148.6	262902.4
	156274.6	181797.2	206582.7	204115.2	261087.7
	166266.8	177381.8	197623.2	215948.5	268256.4
	167173.4	180136	201501.5	222399.7	278647.7

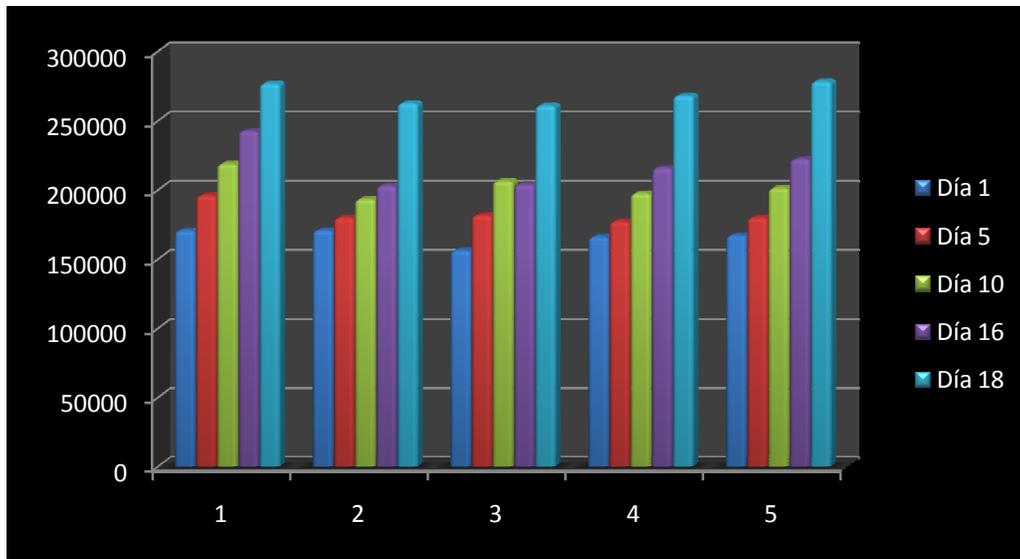


Fig. 38. Resultados de la densitometría con EGF en el desarrollo postnatal.

DIA	1	5	10	16	18
EGFR	155898.4	184901.5	191108.3	226750.1	231006.3
	153288.1	191541.7	182954.1	202722.5	229959.9
	142766.4	171521.6	188478.8	191436.1	257842
	157480.1	170038.8	189195.1	189623.5	233923.9
	151676	167743.6	178218.4	185958.7	241162.1

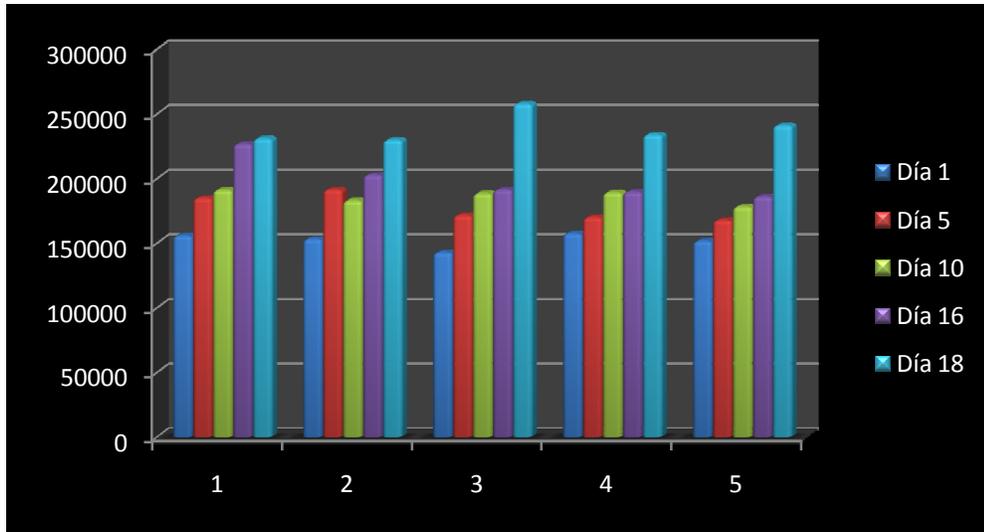


Fig. 39. Resultados de la densitometría con EGFR en el desarrollo postnatal.

DÍA	EGF	EGFR
1	166267.54	152221.8
5	183104.06	177149.44
10	203614.62	185990.94
16	217666.74	199298.18
18	263539.48	232118.84

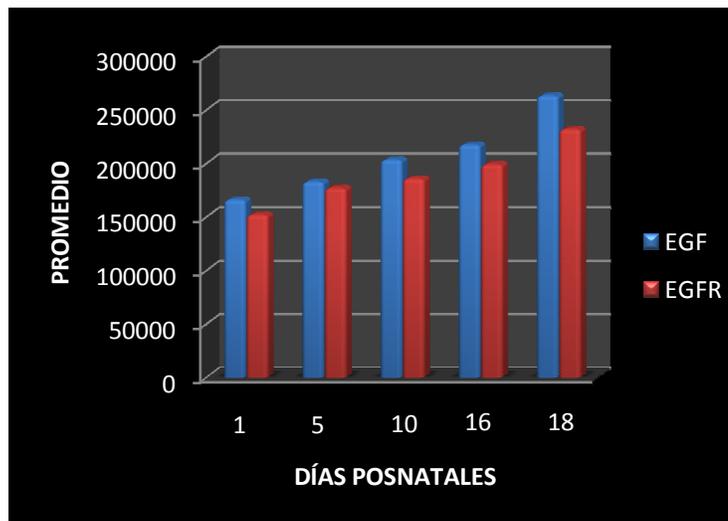


Fig. 40. Resultados del promedio de la densitometría con EGF y EGFR en el desarrollo postnatal glandular.

VI. DISCUSIÓN



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.

En diversos estudios previos se ha demostrado la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en el desarrollo de la glándula submandibular (GSM) en los fetos y en el crecimiento postnatal de dicha glándula en ratones, pero no se han enfocado en observar la presencia del EGF y EGFR en la GSM en ratas siguiendo la secuencia de desarrollo glandular postnatal.

Gresik y cols² demostraron la localización inmunohistoquímica del EGF en la glándula submandibular en ratones observando que el EGF es sintetizado, almacenado y secretado por las células granulares del túbulo contorneado (GCT) de la GSM en ratones y la concentración del factor en la glándula está estrechamente relacionada con el desarrollo y diferenciación de las GCT. Se localizó el factor, en algunas células, en el citoplasma basal mientras que en otras GCT se concentró en todo el citoplasma; el citoplasma basal y apical alrededor de los gránulos de secreción por lo general fueron positivos a la inmunohistoquímica mientras que los gránulos fueron mínimamente reactivos. A diferencia de los resultados inmunohistoquímicos obtenidos en este estudio, muestran que existió mayor inmunorespuesta a EGF en la porción apical del citoplasma de los acinos serosos lo que indica que el factor es destinado para la secreción salival, ya que la saliva contiene altas concentraciones del factor, y puede ser reabsorbido por el conducto excretor y estriado, y llegar directamente al tejido conjuntivo, epitelial y al plasma sanguíneo. Por lo que el factor tiene la función de la renovación y regeneración de la mucosa bucal para el correcto funcionamiento de las estructuras de la cavidad bucal.

Estudios más recientes, Gattone y colaboradores³⁰ mostraron que el EGF y el factor de crecimiento transformante α (TGF α) se encuentra presente en las células acinares y ductales en el desarrollo postnatal temprano de la GSM en ratones, observaron que la glándula submandibular de los ratones recién nacidos y de 10 días de desarrollo postnatal los sitios donde se expresó el factor fueron en las células acinares y en las células de los conductos con una mayor concentración

en el día 10 postnatal. A partir del día 20 postnatal se presentó inmunoreactividad principalmente en los conductos (sistema ductal), y en el día 21 EGF fue localizado en las GCT de la GSM. A diferencia de los resultados de esta investigación, se observó que las ratas no presentan células granulares de los túbulos contorneados (GCT) por lo que el factor solo se expresa en los acinos y en el sistema ductal. La inmunorespuesta con EGF fue incrementando conforme la glándula salival iba creciendo y diferenciándose, existiendo diferencia significativa entre un día y otro en la intensidad y expresión del factor, debido a que el EGF juega un papel importante en la regulación de la proliferación celular y la citodiferenciación de la GSM, existiendo una inmunoreacción severa en el día 18 postnatal (etapa de brote terminal) ya que conforme se diferencia y crece la glándula salival se requiere de mayor cantidad del factor para el desarrollo y formación de la arquitectura glandular.

Gresik y colaboradores³⁶ demostraron que el EGFR está presente en la GSM fetal de los ratones y se expresa en la células epiteliales de esta glándula en desarrollo, el receptor en todos los fetos de todas las edades fue localizado en las membranas epiteliales de las estructuras, observando inmunotinción fuerte en la porción final, inmunotinción moderada en las superficies de algunas células mesenquimales. En las primeras etapas de desarrollo fetal fue localizado el receptor en todas las superficies de las células epiteliales pero en estado avanzado aparecía más prominente en las superficies basolaterales de las células en contacto con el mesénquima especialmente las células de los conductos en desarrollo. Esto implica que las células epiteliales son el principal blanco del EGF durante el desarrollo de la GSM debido a una acción directa. Los resultados de las primeras etapas de desarrollo prenatal concuerdan con los resultados encontrados en este estudio en el cual las primeras etapas del desarrollo postnatal (etapa de brote inicial, día 1; y pseudoglandular, día 5) el receptor se expresó en todo el citoplasma, pero por lo contrario en el día 10 (etapa canalicular) se observó inmunoreacción en la parte apicolateral del citoplasma de los acinos serosos y en las etapas tardías (día 16 y 18, etapa de brote terminal) se encuentra en todo el

citoplasma de las células y disminuían la expresión del EGFR de manera gradual conforme se alejaba del conducto excretor.

Durban y colaboradores³⁵ realizaron un estudio de la aparición de la diversidad del linaje de las células de la glándula salival sugiriendo un papel en la señalización del EGFR en el desarrollo postnatal en ratones, observando que la GSM durante el curso del desarrollo postnatal, se compone de una población heterogénea de células fenotípicas las cuales incluyen las células ductales, acinares, mioepiteliales y mesenquimales. Realizaron inmunohistoquímica del día 1 al 35 de desarrollo postnatal observando en el día 1 expresión fuerte en los pro-acinos, en el conducto intercalado muy fuertemente y los conductos estriados apenas se van formando; en el día 3 EGFR se expresó sobre casi todas las celulares acinares y ductales, los conductos estriados aparecen con una inmunoreactividad fuertemente a partir del tiempo en que su aparición por la diferenciación de las células intercaladas del conducto fueron perceptibles en el día 2 . Mientras que en los días 10 y 13 se observó poca o nula inmonoreactividad en las células acinares y los conductos estriados e intercalares se expresó fuertemente el EGFR. Las GCT de la GSM mostraron inmunoreactividad en su aparición en el día 10 por la diferenciación de las células estriadas del conducto y persistió la inmunoreactividad en edad adulta. Los días 16 y 18 no hubo expresión en las células acinares mientras que en los conductos estriados e intercalares se expreso muy fuertemente el EGFR. Existió una disminución evidente de la reacción inmune entre los días 21 y 35 después del nacimiento en todas las estructuras, posteriormente la reacción inmune específica a EGFR parecía estabilizarse y las diferencias obvias no eran perceptibles en los ratones adultos de diversas edades.

Por lo contrario en los resultados obtenidos en este estudio observamos que el EGFR en el desarrollo de la GSM en ratas se expresó levemente en el día 1 en el citoplasma de los brotes epiteliales de las acinos y conductos, en el día 5 hubo una respuesta inmunohistoquímica leve en los acinos serosos y conductos estriados e intercalares en el cual dichas estructuras se encontraban en

diferenciación. Así sucesivamente se expresaba más el EGFR conforme existía una mayor diferenciación celular en los acinos y en el sistema ductal (días 10, 16 y 18 días de desarrollo postnatal), expresándose moderadamente en los acinos serosos en el día 18, observando morfo-diferenciación a nivel de los conductos y unidades secretoras de la glándula salival en los días 16 y 18 postnatales. Tomando en cuenta que el EGFR se expresa en la misma cantidad en todos los días de desarrollo postnatal (días 1, 5, 10, 16 y 18 postnatales), podemos concluir que el receptor participa en el mantenimiento de la forma y función del tejido glandular.

En la actualidad no existen estudios que comparen la expresión del EGF con EGFR en el desarrollo de la GSM en ratas, por lo que en esta investigación se observa que existe una mayor cantidad e intensidad del factor en todas las etapas de desarrollo glandular postnatal, esto se debe a que se requiere de mayor cantidad de EGF para la formación del tejido glandular y por lo consiguiente menor cantidad de EGFR. Por lo que en los días 16 y 18 de desarrollo postnatal existe una inmunoreacción leve con EGFR y va disminuyendo la intensidad de dicho factor, concordando con las observaciones de Durban et al ³⁵ en el cual existió una disminución evidente de la reacción inmune entre los días 21 y 35 después del nacimiento en todas las estructuras, posteriormente la reacción inmune específica a EGFR pareciera estabilizarse.

Por lo que nuestros datos confirman que el EGF y EGFR, dos de los componentes de la familia del EGF, se encuentran presentes en el desarrollo postnatal de la glándula salival y, por lo tanto, desempeñan un papel importante en la conducción de la proliferación celular y en la citodiferenciación de la GSM actuando de manera directa en el desarrollo y maduración del tejido glandular.

Así mismo tienen la función de la renovación y regeneración epitelial de la mucosa oral para una correcta cicatrización y funcionamiento de las estructuras normales de la cavidad bucal.

VII. CONCLUSIONES

1. El EGF y EGFR se encuentran presentes en las diversas etapas de desarrollo de la glándula submandibular, por lo que es importante conocer los cambios histológicos que se generan durante el desarrollo de la estructura glandular.

2. El EGF presentó mayor expresión en el día 18 postnatal con mucha diferencia significativa de $P = <0.001^{***}$ que en el resto de los días. Al comparar los días 1 vs. 5 y 10 vs. 16 se encontró poca expresión del factor con ninguna diferencia significativa de $P = >0.05^{ns}$. Obteniendo así que a mayor diferenciación y desarrollo de la glándula salival (etapa de brote terminal) se presenta el factor con mayor expresión.

3. El EGFR en las diversas etapas de desarrollo postnatal se expresó en una misma cantidad, observando ninguna diferencia significativa de $P = >0.05^{ns}$ en todos los días. Concluyendo que el receptor se encontró en una misma cantidad, sin incrementos y estabilizando la inmunorespuesta, en el desarrollo de la glándula salival.

4. Existió mayor inmunorespuesta con EGF que el EGFR en todos los días de desarrollo postnatal ya que el promedio del factor fue de 221,127 y del receptor fue de 197,933 con un valor de $P = 0.4206$, considerado como no significativo, observando una disminución proporcional del receptor con respecto al factor. Concluyendo que la glándulas submandibulares requieren mayor cantidad del factor y menor cantidad del receptor conforme se va diferenciando y desarrollando la arquitectura glandular.

5. Es importante establecer la presencia de los diferentes factores de la familia de EGF en la morfo-diferenciación del tejido glandular para un buen funcionamiento de las estructuras de la cavidad bucal, en especial la reepitelización y regeneración de la mucosa bucal.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem.* 1962; 237: 1555- 1562.
2. Gresik E, Barka T. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. *J Histochem Cytochem.* 1977; 25: 1027- 1035.
3. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990; 265: 7709- 7712.
4. Arquero P. Factores de crecimiento y rejuvenecimeinto facial. *Rev. Medicina Estética.* 2003; 7.
5. Tucker, AS. Salivary Gland Development. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18: 237- 244.
6. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz. *Histología Embriología bucodental.* 2º edición. Madrid: Medica Panamericana; 2002.
7. Avery KJ. *Oral Development and Histology.* 2º edition. USA: Thieme Medical Publishers; 1994.
8. Ross MH, Pawlina KW. *Histology a Text and Atlas.* 4º edition. Philadelphia: Williams and Wilkins; 2003.
9. Garther LP, Hiatt JL. *Texto Atlas de Histología.* 2º edición. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2002.



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.

10. Bath MB. Illustrated dental embryology, histology and anatomy. 2^o edition. USA: El Sevier; 2006.
11. Junqueira LC, Carneiro J. Histología básica. Barcelona: Masson; 2000.
12. Fawcett, DW. Compendio de Histología. 12^o edición. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana; 1999.
13. Drake RL, Vogl W. GRAY: anatomía para estudiantes. Madrid: El Seiver; 2005.
14. Velayos JL, Santana H. Anatomía de la cabeza. 3^o edición. Madrid: Editorial Médica Interamericana; 2001.
15. Moore KL, Dalley AF. Anatomía con orientación clínica. 5^o edición. México: Editorial Médica panamericana; 2007.
16. Berkovitz, BK. Oral anatomy, embryology and histology. 3^o edition. London: Mosby; 2002.
17. Cuttler LS. The role of extracellular matrix in the morphogenesis and differentiation of salivary glands. Adv Dent Res. 1990; 4: 27- 33.
18. Proyecto PAPIME No. PE207506.
19. Patel VN, Rebutini, IT, Hoffman MP. Salivary gland branching morphogenesis. International Society of Differentiation. 2006; 74: 349- 364.
20. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. Ann Rev Biochem. 1987; 56: 881- 914.
21. Moore, P. Embriología clínica. 7^o edición. España: El Servier; 2004.

22. Sadler, TW. Langman Embriología médica. 7° edición. México: Editorial Medico Panamericana; 1996.
23. <<http://www.fcv.unl.edu.ar/atlashisto/atlas11.htm>>
24. <<http://haldanamarcos.bravepages.com/unidades/unidad5/par.htm>>
25. Warren F, Homberger G. Anatomy and dissection of the rat. 5° edition. New York: Freeman and Company; 1990.
26. Hebel R, Strong M. In anatomy and embryology of the laboratory rat. Bio Med Verlag. 1986; 231- 257.
27. Chiasson R. Laboratory anatomy of the White rat. 5° edition. USA: Mc Graw Hill; 1994.
28. Boorman E. Pathology of the fisher rat reference and atlas. San Diego: Academic Press INC; 1990.
29. Purushotham KR, Zelles T, Bazsek J. Efect of EGF on rat parotid gland secretory function. Comp. Biochem. Physiol. 1995; 110 C: 7- 14.
30. Gattone V, Sherman D, Hinton D, Fu-Wen N, Topham R, Klein R. Epidermal growth factor in the neonatal mouse salivary gland and kidney. Biol Neonate. 1992; 61: 54– 67.
31. Kashimata M, Gresik EW. Epidermal growth factor system is a physiological regulator of development of the mouse fetal submandibular gland and regulates expression of the $\alpha 6$ -integrin subunit. Dev Dyn. 1997; 208: 149– 161.

32. Kashimata M, Sayeed S, Ka A, Onetti-Muda A, Sakagami H, et al. The ERK-1/2 signaling pathway is involved in the stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Dev Biol.* 2000; 220: 183–196.
33. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and the other polypeptide mitogens. *Ann Rev Biochem.* 1987; 56: 881-914.
34. Schlessinger J, Schreiber AB, Levi A, Lax I, Libermann T. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *CRC Crit Rev Biochem.* 1983; 14(2): 93-111.
35. Durban EM, Nagpala PG, Barreto PD, Durban E. Emergence of salivary gland cell lineage diversity suggests a role for androgen-independent epidermal growth factor receptor signaling. *J Cell Sci* 108 (1995): 2205–2212.
36. Gresik E, Kashimata M, Kadoya Y, Mathews R, Minami N, Yamashina S. Expression of epidermal growth factor receptor in fetal mouse submandibular gland detected by biotinyltyramide- based catalyzed signal amplification method. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45: 1651-1657.
37. Gusterson B, Cowley G, Smith JA, Ozanne B. Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. *Cell Biol Intl Rpts*, 1984; 8(8): 649-658.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem.* 1962; 237: 1555- 1562.
2. Gresik E, Barka T. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. *J Histochem Cytochem.* 1977; 25: 1027- 1035.
3. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990; 265: 7709- 7712.
4. Arquero P. Factores de crecimiento y rejuvenecimiento facial. *Rev. Medicina Estética.* 2003; 7.
5. Tucker, AS. Salivary Gland Development. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18: 237- 244.
6. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz. *Histología Embriología bucodental.* 2º edición. Madrid: Medica Panamericana; 2002.
7. Avery KJ. *Oral Development and Histology.* 2º edition. USA: Thieme Medical Publishers; 1994.
8. Ross MH, Pawlina KW. *Histology a Text and Atlas.* 4º edition. Philadelphia: Williams and Wilkins; 2003.
9. Garther LP, Hiatt JL. *Texto Atlas de Histología.* 2º edición. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2002.

10. Bath MB. Illustrated dental embryology, histology and anatomy. 2^o edition. USA: El Sevier; 2006.
11. Junqueira LC, Carneiro J. Histología básica. Barcelona: Masson; 2000.
12. Fawcett, DW. Compendio de Histología. 12^o edición. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana; 1999.
13. Drake RL, Vogl W. GRAY: anatomía para estudiantes. Madrid: El Seiver; 2005.
14. Velayos JL, Santana H. Anatomía de la cabeza. 3^o edición. Madrid: Editorial Médica Interamericana; 2001.
15. Moore KL, Dalley AF. Anatomía con orientación clínica. 5^o edición. México: Editorial Médica panamericana; 2007.
16. Berkovitz, BK. Oral anatomy, embryology and histology. 3^o edition. London: Mosby; 2002.
17. Cuttler LS. The role of extracellular matrix in the morphogenesis and differentiation of salivary glands. Adv Dent Res. 1990; 4: 27- 33.
18. Proyecto PAPIME No. PE207506.
19. Patel VN, Rebutini, IT, Hoffman MP. Salivary gland branching morphogenesis. International Society of Differentiation. 2006; 74: 349- 364.
20. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. Ann Rev Biochem. 1987; 56: 881- 914.
21. Moore, P. Embriología clínica. 7^o edición. España: El Sevier; 2004.

22. Sadler, TW. Langman Embriología médica. 7° edición. México: Editorial Medico Panamericana; 1996.
23. <<http://www.fcv.unl.edu.ar/atlashisto/atlas11.htm>>
24. <<http://haldanamarcos.bravepages.com/unidades/unidad5/par.htm>>
25. Warren F, Homberger G. Anatomy and dissection of the rat. 5° edition. New York: Freeman and Company; 1990.
26. Hebel R, Strong M. In anatomy and embryology of the laboratory rat. Bio Med Verlag. 1986; 231- 257.
27. Chiasson R. Laboratory anatomy of the White rat. 5° edition. USA: Mc Graw Hill; 1994.
28. Boorman E. Pathology of the fisher rat reference and atlas. San Diego: Academic Press INC; 1990.
29. Purushotham KR, Zelles T, Bazsek J. Efect of EGF on rat parotid gland secretory function. Comp. Biochem. Physiol. 1995; 110 C: 7- 14.
30. Gattone V, Sherman D, Hinton D, Fu-Wen N, Topham R, Klein R. Epidermal growth factor in the neonatal mouse salivary gland and kidney. Biol Neonate. 1992; 61: 54– 67.
31. Kashimata M, Gresik EW. Epidermal growth factor system is a physiological regulator of development of the mouse fetal submandibular gland and regulates expression of the $\alpha 6$ -integrin subunit. Dev Dyn. 1997; 208: 149– 161.

32. Kashimata M, Sayeed S, Ka A, Onetti-Muda A, Sakagami H, et al. The ERK-1/2 signaling pathway is involved in the stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Dev Biol.* 2000; 220: 183–196.
33. Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and the other polypeptide mitogens. *Ann Rev Biochem.* 1987; 56: 881-914.
34. Schlessinger J, Schreiber AB, Levi A, Lax I, Libermann T. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *CRC Crit Rev Biochem.* 1983; 14(2): 93-111.
35. Durban EM, Nagpala PG, Barreto PD, Durban E. Emergence of salivary gland cell lineage diversity suggests a role for androgen-independent epidermal growth factor receptor signaling. *J Cell Sci* 108 (1995): 2205–2212.
36. Gresik E, Kashimata M, Kadoya Y, Mathews R, Minami N, Yamashina S. Expression of epidermal growth factor receptor in fetal mouse submandibular gland detected by biotinyltyramide- based catalyzed signal amplification method. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45: 1651-1657.
37. Gusterson B, Cowley G, Smith JA, Ozanne B. Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. *Cell Biol Intl Rpts*, 1984; 8(8): 649-658.