



Universidad Nacional Autónoma de México

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA.

**EFFECTO TERATOGENICO DE ETILEN GLICOL Y
METIL CELOSOLVE EN FETOS DE RATA WISTAR Y
DETERMINACIÓN DE LA INMUNOREACCIÓN DE
EGF,EGF-R Y NEU EN GLÁNDULAS SALIVALES.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

P R E S E N T A:

**C.D. VÁZQUEZ RAMÍREZ LUIS ANTONIO
EMILIANO.**

TUTOR: DRA. SANTA PONCE BRAVO

Ciudad Universitaria, 2010.



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.

INDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. ANTECEDENTES	3
III. MARCO TEÓRICO	5
A) GLANDULAS SALIVALES	5
1. PARÉNQUIMA GLANDULAR	11
1.1 ADENÓMEROS	11
1.2 ADENÓMEROS SEROSOS	11
1.3 ADENÓMEROS MUCOSOS	14
B) SISTEMAS DE CONDUCTOS	15
1. CONDUCTOS INTERCALARES	15
2. CONDUCTOS ESTRIADOS	16
3. CONDUCTOS EXCRETORES O COLECTORES	17
C) SOLVENTES ORGÁNICOS	18
1. GLICOLES	18
1.1. ETILÉN GLICOL	21
1.1.1 SINÓNIMOS	19
1.1.2 USOS	19
1.2. METIL CELOSOLVE	19
1.2.1 SINÓNIMOS	20
1.2.2. USOS	20
D) FACTORES DE CRECIMIENTO	20
1. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	21

2. LA FAMILIA DE RECEPTORES ErbB Y SUS LIGANDOS	23
E) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
F) JUSTIFICACIÓN	29
G) HIPÓTESIS	29
H) OBJETIVOS	30
1. OBJETIVO GENERAL	30
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. TIPO DE ESTUDIO	31
2. GRUPOS DE ESTUDIO	31
2.1 GRUPO CONTROL	31
2.2 GRUPOS EXPERIMENTALES	31
2.2.1 PRIMER GRUPO EXPERIMENTAL	31
2.2.2 SEGUNDO GRUPO EXPERIMENTAL	31
2.2.3 TERCER GRUPO EXPERIMENTAL	31
3. VARIABLES	32
3.1 VARIABLES DEPENDIENTES	32
3.2 VARIABLES INDEPENDIENTES	33
3.3 DEFINICIÓN DE VARIABLES	33
4. PROCEDIMIENTO	34
4.1 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA FOTÓNICA	35
4.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	36
4.3 ANÁLISIS DE IMÁGENES	38
V. RESULTADOS	39

1. RESULTADOS MACROSCÓPICOS	39
1.1 GRUPO CONTROL	40
1.2 GRUPOS EXPERIMENTALES	40
2. RESULTADOS MICROSCÓPICOS	41
2.1 GRUPO CONTROL	41
2.1.1 HISTOQUÍMICA	41
2.1.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	44
2.2 GRUPOS EXPERIMENTALES	45
2.2.1 GRUPO EXPERIMENTAL MEZCLA ACUOSA DE SOLVENTES AL 5% ADMINISTRADA POR VIA ORAL	45
2.2.1.1 HISTOQUÍMICA	45
2.2.1.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	48
2.2.2 GRUPO EXPERIMENTAL MEZCLA ACUOSA DE SOLVENTES AL 10% ADMINISTRADA POR VÍA ORAL	49
2.2.2.1 HISTOQUÍMICA	49
2.2.2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	51
3. ANÁLISIS POR DENSIDAD ÓPTICA	53
3.1 RESULTADOS DE EGF	53
3.2 RESULTADOS DE EGF-R	57
3.3 RESULTADOS DE NEU	59
4. RESUMEN DE RESULTADOS	62
VI. DISCUSIÓN	64
VII. CONCLUSIONES	66
VIII. REFERENCIAS	67

EFFECTO TERATOGENICO DE ETILEN GLICOL Y METIL CELOSOLVE EN FETOS DE RATA WISTAR Y DETERMINACION DE LA INMUNORREACCION DE EGF,EGF-R Y NEU EN GLANDULAS SALIVALES MAYORES.

Introducción. Los embriones o fetos de las madres en etapa de gestación expuestos a teratógenos (solventes orgánicos) como etilén glicol (EG) y metil celosolve (MC), pueden desarrollar el síndrome de Saavedra. Las glándulas salivales (GS) son importantes dentro de la cavidad bucal (CB) si están afectadas por los solventes, pueden desarrollar xerostomía u otras alteraciones en las GS. Los factores de crecimiento junto con hormonas y neurotransmisores tienen una función importante en las estructuras normales de las GS, la migración y deiferenciación celular. **Objetivo.** Determinar inmunohistoquímicamente los niveles de EFG, EGF-R-, Neu en GS mayores de ratas de la cepa Wistar (RCW) expuestas a EG y MC. **Metodología.** Se emplearon 20 RCW adultas preñadas en 4 grupos (5 ratas c/u), 1 control (GC) y 3 experimentales (GE). Se administró diariamente 5 mL vía oral la mezcla acuosa (1:1) del solvente por 19 días en concentraciones de 5, 10 y 15%, el GC no se manipuló. Se obtuvieron los productos por cesárea; se eligieron 3 fetos al azar por rata, se fijaron en paraformaldehído al 4%, se cortaron a 3 μm ., se tiñeron con H&E, PAS e inmunohistoquímica para la localización de EGF, EGF-R y Neu. Se comparó la morfología de las GS de los GC y GE. Se analizó el grado de saturación para cada anticuerpo con un software de análisis de imágenes en 5 campos de cada corte de 400x al azar. **Resultados.** El grupo experimental 5% con EGF presentó diferencias significativas ($p < 0.01$) con respecto al GC de EGF. En los grupos experimentales 5 y 10% con EGF-R las diferencias fueron significativas ($p < 0.01$) con respecto a los grupos control y los grupos experimentales, en el grupo experimental con el anticuerpo para NEU encontramos una disminución en las aplicaciones del 10% y un aumento en 5%. **Conclusiones.** Los solventes orgánicos etilen glicol y metil celosolve producen un efecto dosis dependiente de tipo acumulativo ya que los efectos teratogénicos que estos producen se van sumando conforme la dosis aumenta y así hay un daño en las estructuras histológicas normales y en dosis altas como en el 10%.



INMUNOREACTION DETERMINATION OF THE OF EGF, R-EGF, NEU INTO SALIVARY GLANDS OF THE EXPERIMENTAL MODEL WITH ETYLEN GLYCOL Y METYL CELOSOLVE.

Introduction. The mothers who are in gestation stage and which they toil in companies or that are in contact with the enemy with teratógenos or products that contain organic solvent like etilén glycol and metil celosolve, the embryos or fetuses can develop the syndrome of Saavedra. The salivary glands are an important weave within the oral cavity. Those, when being affected by the solvents can develop Xerostomy. This damage brings about alterations in the glands that go from a delay in the cellular differentiation, with the consequent diminution of saliva and factors of growth or its absence. These, along with hormones and the neurotransmitters perform an important function in the normal structures of the salivary glands, the cellular migration and the cellular differentiation.

Objective. To determine EFG, EGF-R-, Neu immunology, histology and chemically also to quantify by means of optical density the immunoreactions in salivary glands majors of rats Wistar stock exhibited to etilen glycol and metil celosolve.

Methodology. 20 pregnant adult rats were used Wistar stock in 4 groups (5 rats c/u), 1 control group (GC) and 3 experimental groups (GE), I daily administer 5 ml to them via oral of watery mixture (1: 1) of reliable by 19 days in concentrations of 5, 10 and 15%. The GC wich were not manipulate, It practiced Caesarean, the products were obtained, chosen 3 fetuses by rat at random, it fixed with paraphormaldehid, processed, cut to 3 μ m. They were dyed with Hematoxiline and Eosine (H& E), and peryódic acid technique of Shiff (PAS) and for the inmunolocalization of EGF, EGF-R and Neu. It was observed by the microscope photon.

Results. The glands morphology of the group control and experimental was compared . The degree of saturation for each antibody with software of image analysis in 5 fields of each observation to 400x was analyzed at random. Experimental group 5% with EGF presented/displayed significant differences ($p < 0.01$) with respect to the GC of EGF.

In experimental groups 5 and 10% with EGF-R the differences were significant ($p < 0.01$) respect to the experimental groups control and groups, in the experimental group with the antibody for NEU we found a diminution in the applications of 10% and an increase in 5%.

Conclusions. Reliable the organic ones etilen glycol and metil celosolve produces an effect dependent dose of cumulative type since the teratogenics effects that these produce are adding as the dose it increases and thus there is damage in the normal histological structures and high doses like in 10%. Besides the structural damage molecular damage exists since they are being affected normal molecules.



II. ANTECEDENTES

En estudios experimentales realizados en rata reportaron "malformaciones en fetos ocasionadas por los solventes MC y EG como: acortamiento de extremidades, edema, agenesia de cola, reducción de extremidades posteriores e implantación caudal de extremidades anteriores"^(1,2). Posteriormente en otro estudio se establecieron características de daño en la región maxilofacial, desarrollo retrasado del maxila y mandíbula, falsa macroglosia, hipertelorismo, retraso en el desarrollo óseo con acortamiento de extremidades inferiores y desarrollo desarmónico de las estructuras faciales ⁽³⁾,entre las características sistémicas se encontró falta de cierre del tubo neural en su porción cefálica ⁽¹⁾, falta de pared abdominal ^(4,5). En otro estudio se reviso y se comparó el síndrome de los éteres del glicol con el síndrome del feto alcoholizado y se encontraron algunas características comunes entre ambos, pero también se identificaron diferencias que solo se presentan en el síndrome de éteres del glicol como malformaciones bucales y dentales ^(6,7), durante las pruebas experimentales que se realizaron en ratas de la cepa Wistar, con dosis de EG y MC que fueron administradas por vía oral (VO) e intraperitoneal (VIP) en relación 1:1 de los solventes, con porcentajes del 5, 10 y 20% durante 19 días, en madres gestantes. Durante el estudio se tomaron medidas de las estructuras craneofaciales de los fetos vivos obtenidos de los 3 grupos experimentales por VO para ser comparadas con el grupo control, en ese estudio se tomaron medidas de 8 distancias morfométricas, lo que permitió determinar la gravedad de las alteraciones en el desarrollo de los huesos que conforman la cabeza de un feto de rata producidas por el EG y el MC. En los grupos experimentales de administración vía intraperitoneal no se realizó la comparación debido a que no hubo desarrollo de productos y los pocos que se obtuvieron estaban muertos. ³.



Se han descrito las características clínicas del síndrome de éteres del glicol, haciendo inferencia de algunos casos presentados en el mundo por causa de la intoxicación con de los solventes de éteres del glicol ^{4,5}.

Los hallazgos microscópicos en tejidos y órganos señalan daños de forma irreversible en hígado, riñones, músculo, sistema nervioso, óseo² y en las glándulas salivales mayores en donde posiblemente se provoca una disminución en la secreción salival en donde encontramos los factores de crecimiento como EGF, NEU, FGF los cuales influyen de manera importantes en el desarrollo y reparación normal de la mucosa bucal provocando ageneia de estructuras las cuales podrían causar una aparente xerostomía.

En otro estudio experimental se encontró daño a los dientes, desde el retraso en el proceso de diferenciación de ameloblastos hasta la agenesia dental⁴. Cada uno de los grupos experimentales mostraron diversos tipos de alteraciones.⁴ En general hubo variación en la morfología del órgano del esmalte⁴. Con los resultados microscópicos se logró establecer una asociación causa-efecto dependiente de la dosis que se manifestó en los daños tisulares ocasionados por los éteres del glicol.



Fig. 1. Imagen de un niño con síndrome de Saavedra¹

III. MARCO TEÓRICO

A. GLÁNDULAS SALIVALES

Estas pueden dividirse con fines descriptivos en:

- Exócrinas (glándula parótida, submandibular, sublingual) y endócrinas.
- Mayores o principales y menores o accesorias.
- Por su tipo de secreción en: serosas, mucosas y mixtas.^{8,9}

Mayores.

Estas glándulas se encuentran en pares, son consideradas verdaderos órganos secretores, se localizan fuera de la cavidad bucal, desembocan a ella por medio de sus conductos principales, entre estas se encuentran las glándulas parótidas, submaxilares o submandibulares y sublinguales^{8,9}.

Menores.

Se encuentran distribuidas en la mucosa y submucosa de la cavidad bucal. Se designan de acuerdo a su ubicación como: labiales, genianas, palatinas y linguales. Son glándulas pequeñas y muy numerosas. Se estima que el ser humano posee una cantidad de 450 a 800 de estas glándulas, todas localizadas muy próximas a la superficie interna de la boca, a la que están conectadas por conductos cortos.^{8,9}

Por su tipo de secreción.

Serosas.

Producen una secreción acuosa que contienen proteínas y a menudo, enzimas como la amilasa que desdobra al almidón aunque su tiempo de acción es breve dado que los alimentos son rápidamente deglutidos..⁸⁻⁹.



Mucosas

Secretan mucina componente activo de la saliva que es viscoso y cumple con la función lubricante para ayudar a la masticación, deglución y digestión; también tiene la función de protección.⁸⁻⁹. Por la misma viscosidad que presenta la mucina se permite la coagregación bacteriana a la superficie dental^{8,9}.

Mixtas

Las glándulas mixtas, se encuentran constituidas por células mucosas y serosas las cuales tienen forma achatada y forman estructuras en semiluna, denominadas semilunas de Gianuzzi.⁸⁻⁹

Las unidades secretoras representadas por estos adenómeros, vierten su secreción a la cavidad bucal por medio de un sistema de conductos excretores, estructuras que se encuentran soportadas por tejido conjuntivo.^{8,11}.

ETAPAS DE DESARROLLO DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES

El desarrollo de la glándula salival se divide en seis etapas:¹¹

Formación del brote. (ETAPA 1): Inducción del epitelio bucal por el ectomesénquima subyacente.

El ectomesénquima subyacente ejerce un efecto inductor sobre el epitelio bucal, que causa hinchamiento focal y la formación de un pequeño brote. El brote en desarrollo es separado del ectomesénquima por la lámina basal que el mismo epitelio secreta. Aunque el sitio y el tiempo del desarrollo se diferencian ligeramente en las tres glándulas salivales los procesos del desarrollo son similares entre sí (Fig. 2.).^{8,11-15,16}.



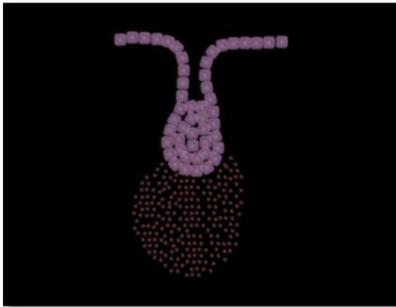


Fig. 2. Esquema de la formación del brote.

Formación y crecimiento del cordón celular. (ETAPA 2)

El brote epitelial se elonga, origina un cordón celular compacto por la proliferación de células que se invagina en el ectomesénquima subyacente. La condensación y la proliferación se presenta en el ectomesénquima. La lámina basal se encuentra entre el cordón celular y el ectomesénquima. La composición de la lamina basal es de colágena tipo I y tipo IV, así como de proteoglicanos de lamina basal tipo (MB-1), glucosaminoglicanos y glucoproteínas. La lámina basal y la matriz extracelular participan en la morfogénesis y diferenciación de la glándula salival durante el desarrollo glandular (Fig. 3).^{8,11-15,16.}

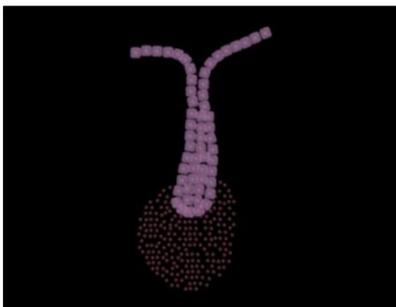


Fig. 3. Esquema en el que se muestra la formación y crecimiento del cordón celular.

Iniciación de la bifurcación en las partes terminales del cordón epitelial y la continuación de la diferenciación glandular. (ETAPA 3)

El cordón epitelial prolifera rápidamente e inicia la bifurcación en las partes terminales del mismo y continúa la diferenciación glandular. Con crecimiento longitudinal del cordón epitelial (Fig. 4).^{8,11-15,16.}

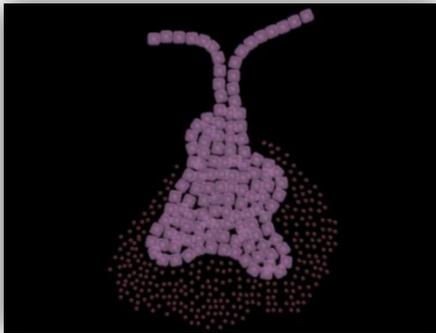


Fig. 4. Esquema en el que se observa el inicio de la bifurcación de la glándula.

Bifurcación en la cuerda epitelial y la formación de lóbulos. (ETAPA 4)

El cordón epitelial se ramifica dicotómicamente a partir de su extremo distal. Cada una de las ramas hijas crece y a su vez se ramifican repetidamente, este proceso se denomina morfogénesis ramificante, que conduce a la formación de una estructura arboriforme de cordones epiteliales sólidos, con extremos redondeados engrosados y con proliferación de brotes y ramificación. El extremo terminal de cada división presenta ensanchamiento semejante a un botón formado por células dispuestas en forma radial. La ramificación va precedida de un incremento local del número de mitosis en dichos cordones y de engrosamiento de la lámina basal que permite la estabilidad del epitelio y mantiene la ramificación. Los miembros de la familia de factor de crecimiento de fibroblastos y sus receptores, juegan un papel importante en la iniciación de la bifurcación. La diferenciación y la contracción

de filamentos de actina en la parte basal y apical de las células epiteliales, proporciona el mecanismo físico que es la base de la formación de la hendidura y la deposición de componentes extracelulares de la matriz dentro de las hendiduras. Al parecer este mecanismo sirve para estabilizarlos (Fig. 5).^{8,11,15,16.}

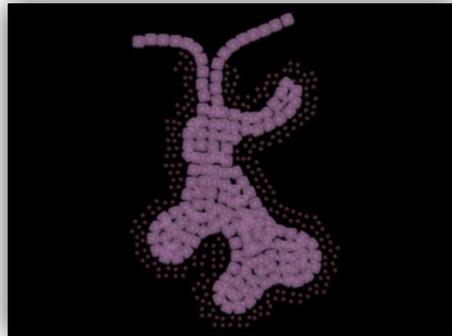


Fig. 5. Esquema en el que se observa la formación de lóbulos.

Desarrollo de la luz de los conductos. (ETAPA 5)

Los cordones desarrollan una luz en su interior, transformándose en conductos, esta se presenta aproximadamente entre el tercer y cuarto mes. La canalización de los cordones epiteliales para formar los conductos se cree se produce por degeneración de las células centrales, no se conoce con claridad si es por necrosis o apoptosis, Por ello se sugieren otros posibles mecanismos como: a) apertura de la luz por la presión hidrostática ejercida por la secreción de las células ductales; o bien b) por el diferente grado de proliferación de las células que forman los cordones. El desarrollo de la luz del conducto se inicia en el epitelio bifurcado en el extremo distal del cordón principal y en las divisiones del mismo y por último en la proximidad del cordón principal en su parte central. Para el sexto mes de vida intrauterina los conductos ya deben estar completamente canalizado (Fig. 6).^{8,11-15,16.}

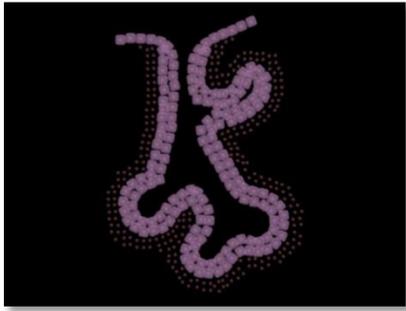


Fig. 6. Esquema que demuestra el proceso de formación de la luz de los conductos y la formación de los lóbulos.

Citodiferenciación. (ETAPA 6)

La etapa final del desarrollo de la glándula salival es la histodiferenciación de la porción secretora y de los conductos intercalares. Durante este periodo la actividad mitótica cambia del cordón epitelial al brote terminal. El sistema formado al inicio por cordones compactos se convierte en un sistema tubular. En el brote terminal, el epitelio consta de dos capas de células, que corresponden a las células de la capa interior que se diferenciarán en células secretoras de la glándula madura, ya sea en adenómeros mucosos o serosos dependiendo de la glándula específica. Algunas células de la capa externa forman las células mioepiteliales, que tienen como función la contracción. Estudios inmunocitoquímicos llevados al cabo en la glándula submaxilar humana han permitido determinar que las células mioepiteliales inician su desarrollo a las 15 ó 16 semanas de gestación, cuando las células secretoras aún son inmaduras. Las células mioepiteliales primitivas son poliédricas y se disponen en una capa compacta externa a las células secretoras en desarrollo. En el periodo fetal avanzado las células mioepiteliales maduran hacia las formas dendríticas típicas, si bien aun no se encuentran alrededor de los conductos intercalares y unidades secretoras, a diferencia de lo que se observa en las glándulas salivales adultas. Los componentes del parénquima aumentan de tamaño y número, el mesénquima disminuye, aunque una capa delgada rodea cada unidad secretora. Las divisiones más abundantes del tejido

conjuntivo son llamados septos y se continúan con la cápsula dentro de la cual pasan los nervios y vasos sanguíneos que suministran a la glándula. El tejido conjuntivo divide a la glándula en lóbulos y lobulillos.

Las unidades secretoras son evidentes en el nacimiento, pero no son completamente funcionales hasta el inicio de una dieta sólida y la presencia de estímulos de la masticación (Fig. 7).^{8,11-15,16.}

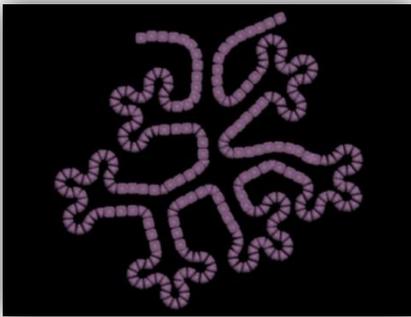


Fig. 7. Proceso de citodiferenciación. En el esquema se puede apreciar la formación de los lóbulos y conductos glandulares.

1. Parenquima Glandular.

1.1. Adenómeros

Los adenómeros son agrupaciones de células secretoras de aspecto piramidal, las cuales vierten su secreción por su cara apical a la luz central del adenómero. A partir de cada adenómero se origina un conducto, cuya pared está formada por células epiteliales de revestimiento y cuya luz es continuación de la luz del conducto. Existen tres variedades de adenómeros, de acuerdo con su organización y con el tipo de secreción de sus células: serosos, mucosos y mixtos.⁸

1.2. Adenómero Seroso: Son pequeños y esferoidales están constituidos por células serosas y consisten de 8 a 12 células que rodean un lumen central, las cuales poseen la estructura típica de las células que sintetizan, almacenan y secretan proteínas. En un corte histológico teñido con hematoxilina-eosina, estos adenómeros presentan contorno redondeado y luz central muy pequeña,

difícil de distinguir con microscopía de luz. Los núcleos de las células son esferoidales y están ubicados en el tercio basal. El citoplasma de esa región presenta una fuerte basofilia, mientras que la región apical contiene gránulos de zimógeno (Fig. 8). El MET permite comprobar que prácticamente toda la región basal se encuentra ocupada por un extenso retículo endoplásmico rugoso (RER). El complejo de Golgi de localización perinuclear está muy desarrollado. En el citoplasma también se visualiza una cantidad moderada de mitocondrias, algunos lisosomas, microtúbulos.^{8,11-15,16.}

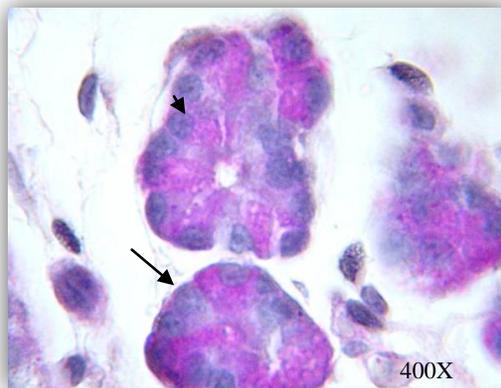


Fig. 8. Fotomicrografía con técnica de PAS de acinos seroso (AS) a 400X aumentos, (flecha)Corresponde al núcleo orientado a la porción basal de la célula y conducto intercalador con presencia de mucina siendo PAS positivo(punta de flecha).

Las células del adenómero están unidas lateralmente unas con otras mediante complejos de unión. Cuya función en las células secretoras es para mantener unidas las células vecinas y para delimitar los dos dominios celulares diferentes: a) el dominio apical, que a menudo se extiende en sentido lateral por los canalículos intercelulares, y que está implicado en la secreción de los componentes salivales y en el intercambio iónico y b) el dominio basolateral, a través del cual tienen lugar diferentes tipos de intercambios entre las células y el estroma lo que permite mantener la función específica de los elementos celulares.^{8,11-15,16.}

Los diferentes métodos de estudio, histoquímicos y bioquímicos, han permitido demostrar que los gránulos de las células serosas contienen una o más de las siguientes sustancias; amilasa, peroxidasa, lactoperoxidasa, lisozima, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, lipasa, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento epidérmico y mucinas entre otros.^{8,9,14-17,18,19.}

La liberación de los gránulos se produce por un mecanismo de exocitosis dependiente del ión calcio. La exocitosis implica la fusión de la membrana de cada gránulo secretor con la membrana plasmática apical, de manera que el contenido del gránulo sale al exterior, sin pérdida de la porción citoplásmica de la célula, proceso conocido como secreción merócrina. La exocitosis es seguida de la recuperación de las porciones de la membrana correspondientes a los gránulos por el citoplasma.^{16-19,20,21.}

El ritmo de secreción es discontinuo y, por ello el aspecto de las células serosas es diferente según el estado funcional en que se encuentren. Una célula en reposo tiene abundantes gránulos de zimógeno, mientras que las células estimuladas presentan escasos gránulos o ninguno, ya que los han descargado por exocitosis.^{16-21.}

Los adenómeros serosos producen una secreción líquida rica en proteínas semejante al suero de ahí su nombre seroso. Sin embargo la mayoría de estas proteínas son de tipo de las glucoproteínas. La proteína más abundante aportada a la saliva por los adenómeros serosos es la amilasa salival o ptialina, enzima que degrada el almidón y el glucógeno, desdoblándolos en maltosa y otros productos. Esta enzima, por lo tanto inicia la digestión de los alimentos en la cavidad bucal, pero su acción se lleva al cabo durante un periodo de tiempo corto, mientras los alimentos son masticados y hasta que son deglutidos. Se considera que continúa actuando en el estómago, hasta que el pH ácido del jugo gástrico la desnaturaliza.^{16-21.}



La mayor porción de amilasa salival es producida por las glándulas parótidas y en segundo por las submandibulares. Otras enzimas son secretadas en diferente cantidad por las distintas células serosas, así por ejemplo, la lipasa salival se origina en las pequeñas glándulas serosas de Von Ebner ubicadas en la lengua.^{16-21.}

1.3. Adenómero mucoso. Los adenómeros mucosos son más voluminosos que los serosos y su forma frecuentemente es más tubular. Sus células, globosas, están cargadas de grandes vesículas que contienen mucina (mezcla de diversas mucosustancias, ricas en proteínas denominadas mucinas, que están unidas a importantes proporciones de carbohidratos complejos). Las vesículas de secreción desplazan al núcleo, que aparece aplanado y comprimido contra la cara basal de las células. Debido a que producen una secreción viscosa, los adenómeros mucosos poseen una luz bastante amplia. La mucina no reacciona tintorialmente con los colorantes de rutina y, por ello en los cortes con hematoxilina-eosina el citoplasma aparece pálido, mostrando apenas una leve basofilia. Por el contrario se tiñe bien con técnicas histoquímicas específicas para las mucinas como PAS (FIG. 9).^{8-10,14.}

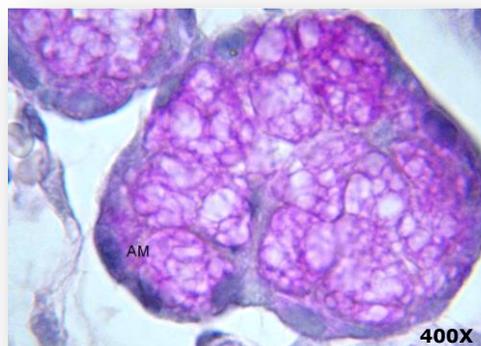


Fig. 9 Fotomicrografía con técnica de PAS de un Acino Mucoso (AM) a 400X de aumento obtenida durante la realización del proyecto.

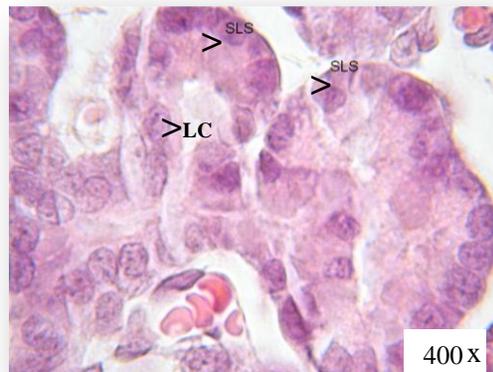


Fig. 10. Fotomicrografía en técnica de H&E donde se observan las semilunas serosas (>SLS), luz de conducto (LC) en 400 X de aumento obtenida durante la realización del proyecto.

B. Sistema de Conductos.

En las glándulas salivales cada lobulillo está formado por una cierta cantidad de acinos, cuyos conductos excretores van uniéndose progresivamente hasta originar un conducto de mayor calibre, que al fin sale del lobulillo. Los conductos que se ubican dentro del lobulillo son denominados por esa razón intralobulillares, y de ellos hay dos categorías: los conductos intercalares (o piezas intercalares de Boll) y los conductos estriados (también denominados excretosecretorios o granulados).^{8-10,14}

Los conductos que corren por los tabiques de tejido conjuntivo ya fuera del lobulillo son denominados conductos excretores terminales o colectores. Estos conductos son en sus primeros tramos interlobulillares y a medida que confluyen entre sí se denominan interlobulares. La unión de estos últimos resulta en el conducto excretor principal.^{8-10,14}

1. Conductos Intercalares.

Son los primeros que se originan a partir de cada acino. Poseen un calibre muy pequeño y se encuentran comprimidos por las unidades secretoras, por lo que

resulta difícil identificarlos. La pared de estos conductos está formada por una sola capa de células cúbicas bajas, rodeadas por células mioepiteliales y envueltas por una membrana basal. Las células que forman los conductos intercalares presentan escaso desarrollo de los organelos, algunas cisternas de RER de localización baja, un aparato de Golgi supranuclear y algunos gránulos pequeños. Las células cubicas bajas se unen entre sí junto con células mioepiteliales unidas por medio de desmosomas y otras estructuras de unión. Estos conductos son comparativamente largos en glándulas salivales de secreción predominantemente serosas, como la parótida y la submaxilar. Los conductos intercalares cumplen una función pasiva en el transporte de la saliva primaria formada por las células acinares. Algunos autores sostienen que estos conductos representan una población de células indiferenciadas que pueden llegar a diferenciarse en células acinares o del conducto estriado (Fig. 11).⁸⁻¹⁰.

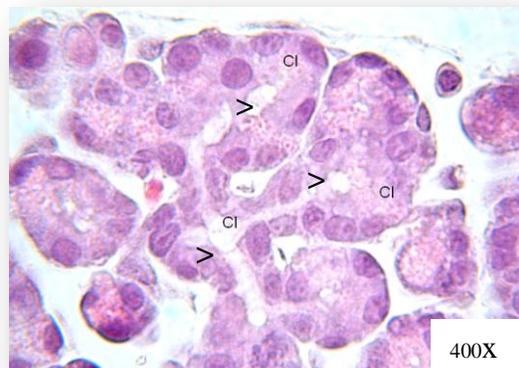


Fig. 11. Corte histológico con técnica de H&E de glándula salival donde se muestran los conductos intercalares (>CI) en aumento 400X.

2 Conductos Estriados.

Se origina por la unión de dos o más conductos intercalares. Son de mayor diámetro que los anteriores y su luz es más amplia. Están revestidos por una hilera de células epiteliales cúbicas altas o cilíndricas, con citoplasma marcadamente acidófilo y núcleos esféricos de ubicación central. Suelen

observarse además algunas células basales. Estos conductos son denominados estriados. Con el MO se distingue una serie de estriaciones perpendiculares a la superficie basal de las células altas (Fig. 12). El MET permite comprobar que estas estriaciones corresponden a 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 los de las células vecinas conformando un laberinto basal que es un rasgo típico de los epitelios que intervienen en el transporte activo de electrolitos (como los túbulos renales). La gran cantidad de mitocondrias presentes en estas células explica la fuerte acidofilia del citoplasma.^{8,10.}



Fig. 12. Conducto estriado con técnica H&E, visto histológicamente a 400X aumentos.

3. Conductos excretores o colectores.

Las porciones iniciales de este conducto son conductos interlobulillares, que corren por los tabiques conjuntivos separan los lobulillos glandulares. Se caracterizan por estar revestidos por un epitelio cilíndrico simple de citoplasma eosinófilo, con pocas estriaciones basales que gradualmente desaparecen. Al MET presentan células semejantes a las del conducto estriado con caracteres menos marcados. Destaca sin embargo, la existencia del REL abundante en la región perinuclear de las células claras que algunos autores relacionan con la posible degradación de hormonas esteroideas a este nivel. Por su estructura se cree que los conductos excretores también participan en intercambios iónicos

modificando la composición de la saliva por reabsorción de electrolitos, principalmente Na^+ y Cl^- . Al ser impermeables al agua, estos conductos contribuyen también a mantener la saliva hipotónica. A medida que se van anastomosando con otros conductos interlobulillares y aumentan de tamaño, el epitelio se convierte paulatinamente en una entidad pseudoestratificada, pudiendo tener algunas células caliciformes intercaladas. Los amplios conductos interlobulares tienen epitelio pseudoestratificado o cilíndrico estratificado. El conducto principal que desemboca en la cavidad bucal esta tapizado finalmente por epitelio plano estratificado al igual que la mucosa bucal.^{8-10.}

C. SOLVENTES ORGÁNICOS

1. Glicoles.

Los glicoles son compuestos alquílicos ($\text{C}_n\text{H}_{2n-2}$) o alifáticos con alta solubilidad conferida por la presencia de grupos hidroxilo ($-\text{OH}$), éter ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$)^{26,27,28.} Como el EG y MC los cuales son solventes orgánicos, líquidos viscosos, incoloros y prácticamente inoloros de alto interés comercial .²⁶⁻²⁸

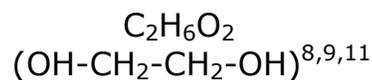
Los éteres de glicol y sus derivados son líquidos inflamables. Sin embargo, sus puntos de ignición están por encima de la temperatura ambiente normal y sus vapores alcanzan concentraciones situadas dentro del rango inflamable o explosivo sólo cuando se calientan.²⁶⁻²⁸



1.1 Etilén Glicol

El EG generalmente se encuentra con un 99% de pureza, el 1% de impureza está constituido por formaldehido, oxido de etileno y 1-4 dioxano.^{26-29,30}

1.1.1 Sinónimos.



El etilén glicol también es conocido como 1, 2,-dihidroxi-etanol, 1,2-hetanediol, EG, etane-1,2-diol, glicol, Fridex, alcohol glicol, lutrol-9, macrogol 400 bcp, MEG, alcohol, ethylene dihydrate, ethylene glycol (ACGIH), M.E.G., glycol alcohol, NCI-C00920, downtherm SR1, Ucar 17.²⁹

1.1.2 Usos

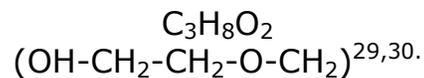
El EG se emplea como anticongelante en sistemas de refrigeración y calefacción, como solvente en las industrias de pinturas y plásticos y como ingrediente de los líquidos descongelantes utilizados en las pistas de los aeropuertos. Se utilizan en líquidos hidráulicos para frenos, la dinamita de bajo punto de congelación, tintes para madera, adhesivos, tintes para el cuero y el tabaco. También sirve como deshidratante del gas natural, como solvente de tintas y pesticidas y como ingrediente de condensadores electrolitos.³⁵

1.2. Metil Celosolve.

El MC se encuentra generalmente con un 99% de pureza y aproximadamente 1% de agua. Se obtiene a partir del oxido de etilo.^{29,30}



1.2.1. Sinónimos.



2-metoxietanol, metilcellosolve, etilén glicol metil celosolve, etilén glicol monometil éter, dowanol EM, éter monometílico de 1' etilen glicol, glicol éter EM, glicol metil éter, glicol monometil éter, Jeffersol EM, 2 metoxietanol, meroxietanol, metoxihidroxietanol, metilselosolv, metil etoxol, metil metil cilosolve, methoxyetylowy alcohol, 2-metoxietanol, monometil éter de etilen glicol, Poly-Solv EM.³⁰

1.2.2. USOS

Muchas de las aplicaciones industriales de los glicoles y los glicerolos se basan en su propiedad de ser solventes orgánicos completamente hidrosolubles. Estos compuestos se utilizan como solventes de colorantes, pintura, resinas, tintas, insecticidas y productos farmacéuticos. Además, los dos grupos hidroxilo químicamente reactivos hacen de los glicoles y poliglicoles, los más importantes. Los usos más importantes son la disminución del punto de congelación, la lubricación y la solubilización. Los glicoles se emplean también como aditivos alimentarios directos o indirectos y como ingredientes en la preparación de explosivos, resinas alquídicas y cosméticos.^{29,30,31,32,33,34.}

D. FACTORES DE CRECIMIENTO.

Existe un amplio número de factores de crecimiento que permite el desarrollo y funcionamiento de los tejidos y órganos de los seres vivos.

Los factores de crecimiento comprenden una amplia familia de moléculas que estimulan la proliferación celular mediante su interacción con un receptor



específico de membrana no son nutrientes, ni se emplean como metabolito o cofactor en ningún paso del metabolismo intermediario. Se trata de moléculas con una función de regulación⁵⁹.

Los factores de crecimiento están presentes en una gran variedad de tejidos, tanto embrionarios como adultos y se piensan que son liberados por todas las células en cultivo⁶⁰. Se diferencian en cuanto a su especificidad; algunos como la interleucina-2 (IL-2), estimulan uno o solo unos pocos tipos de células, mientras que otros, como el EGF, estimulan una amplia variedad de tipos celulares (fig 15). Hasta hoy se ha descrito un grupo de factores de crecimiento que han sido caracterizados y sus genes clonados. Por lo general, son sintetizados en forma de largas moléculas precursoras que posteriormente son procesadas para dar lugar a la molécula madura. Entre estos tenemos, EGF, TGF α (factor de crecimiento transformante α), CSF-1 (factor estimulador de colonias), TNF (factor de necrosis tumoral), IL-1 α , (interleucina 1 α), MCGF (factor de crecimiento de colonias de macrófagos)^{60,61,62}.

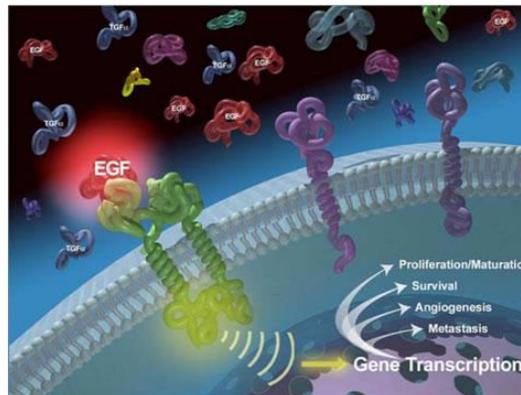


Fig.15 .Vía de señalización del EGF en donde el ligando se une al receptor formando un homodímero que por medio de una cascada de tirosin cinasas crea una transcripción genética (esquema tomado Bic.rog.my).

1. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

El EGF fue el primer factor de crecimiento que se describió hace casi cuatro décadas. Éste es un polipéptido no glucosilado de 53 aminoácidos que puede aislarse en grandes cantidades de las glándulas salivales submaxilares hipertróficas del ratón. El EGF se encuentra también en muchos fluidos biológicos, especialmente en la leche y en la orina de hembras gestantes (Fig 16)^{43,47}.

En humanos, el gen que lo codifica se encuentra localizado en el cromosoma 4. Este gen está constituido por 24 exones separados por grandes regiones no codificantes, siendo su transcrito primario de aproximadamente 110 Kb. Este transcrito es procesado posteriormente dando lugar a un ARNm de 4,8 Kb que es translocado fuera del núcleo y codifica a un precursor de más de 1200 aminoácidos, el pre-pro EGF. El precursor contiene una región hidrofóbica que le permite atravesar la membrana plasmática y nueve módulos extracelulares semejantes a EGF. El procesamiento proteolítico secuencial de este precursor da lugar a la formación del EGF maduro⁴¹⁻⁴⁴⁻⁵⁴. La cadena polipeptídica del EGF mantiene su estructura terciaria fundamentalmente mediante tres enlaces disulfuro. Estos enlaces, que son esenciales para su actividad biológica, se encuentran conservados en otros polipéptidos de esta familia de factores de crecimiento^{47,55,56}.

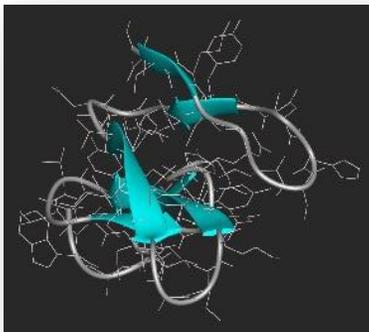


Fig 16. Esquema de la molécula activa de EGF humano (imagen tomada wwwnmr.cabm.rutgers.edu/.../gif/3EGF,)

2 FAMILIA DE RECEPTORES EGF-R/ ErbB2/HER2/Neu.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) es filogenéticamente muy antiguo, ya que existen homólogos de este receptor en diversos invertebrados, como el receptor Let-23 en el gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*,^{36,37} incluso se ha descrito un homólogo de este receptor en protozoos parásitos del género *Trypanosoma*^{38,39}. Además, se han descrito en invertebrados varios ligandos de estos receptores.(Fig 17)⁴⁰

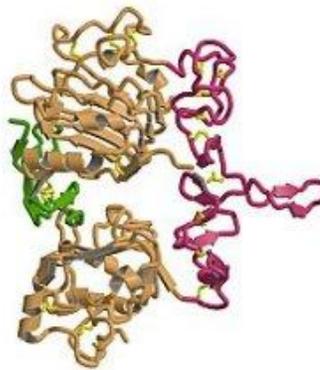


Fig 17. Esquema de la molécula activa de EGF-R humano (imagen tomada de www-nmr.cabm.rutgers.edu/.../gif/3EGF-R.)

En vertebrados, la familia de receptores ErbB, forman parte del EGF-R, además está constituido por otros tres receptores análogos el, ErbB2/HER2/Neu (que tiene una masa molecular de 185 kDa), el ErbB3/HER3 y el ErbB4/HER4 (ambos de 180 kDa)⁴¹. El dominio extracelular de estos receptores está bastante conservado, como ocurre con el dominio de la proteína Tirocin Kinasa, salvo en el caso de ErbB3 que no posee actividad catalítica, aunque es capaz de unir ATP y transmitir señales mitogénicas mediante su heterodimerización con otros miembros de esta familia de receptores.⁴²

Existe un gran número de ligandos para los receptores ErbB que poseen el llamado módulo semejante a EGF. Así, actuando además con los factores de crecimiento transformante- α (TGF- α), la anfirregulina (AR), el factor de crecimiento semejante a EGF que une heparina (HB-EGF), la β -celulina (BTC) y la epirregulina (EPR)^{43,44,45,46,47}. Adicionalmente, han sido descritas dos nuevas familias de ligandos de diversos receptores ErbB; estas son las neurregulinas-1 (NRGs-1), también llamadas **factores de diferenciación Neu** (NDFs, por *Neu differentiation factors*) o herregulinas, y las llamadas neurregulinas-2 (NRGs-2)^{41,42}

Los diversos ligandos de la familia de receptores ErbB poseen diferentes afinidades de unión a los receptores y cada uno de ellos presenta un patrón de expresión distinto, tanto durante el desarrollo embrionario como en los diversos tejidos del adulto, lo cual contribuye en parte a explicar la pleiotropía funcional de estos receptores. Además, las diversas combinaciones posibles de homodímeros y heterodímeros que forman estos receptores, generan una gran diversificación en la transmisión de señales.^{41,49}

Dentro de la familia de ligandos de los receptores ErbB se distinguen tres grupos funcionales en cuanto a sus capacidades de unir y activar a uno u otro receptor. En el primer grupo están incluidos el EGF, el TGF- α y la AR, los cuales son capaces de unir y activar a homodímeros del EGF-R y a heterodímeros de éste con otros receptores de esta familia. En un segundo grupo incluiríamos a las NRGs-1 y las NRGs-2, las cuales se unen a homodímeros de ErbB3 o de ErbB4 y a heterodímeros de éstos con otros receptores de esta familia. En el tercer grupo estarían la BTC, la EPR y el HB-EGF, que pueden activar tanto a homodímeros de EGFR o de ErbB4, como a heterodímeros de cada uno de ellos con otros miembros de la familia⁴⁵. Una de las características de los ligandos de los receptores ErbB es que son sintetizados como precursores de alto peso molecular que se anclan en la



membrana plasmática exponiendo sus módulos semejantes a EGF al medio extracelular.

Estos precursores son posteriormente procesados proteolíticamente dando lugar a sus formas maduras solubles que son liberadas al medio, siendo así capaces de unirse a receptores de la propia célula que lo sintetiza o de células próximas, dando lugar a activaciones autócrina y parácrina, respectivamente. Sin embargo, es importante resaltar que los precursores unidos a la membrana plasmática pueden ser también funcionales, ya que en ciertos casos son capaces de unirse a receptores ErbB de células adyacentes, por lo que estarían implicados en señalización yuxtacrina ⁴⁵ (Fig.18).

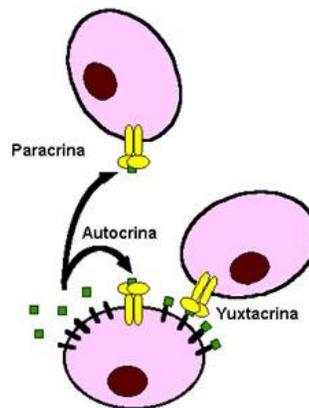


Fig. 18. Diferentes modos de acción de los ligandos de receptores ErbB. Los precursores de los ligandos anclados a la membrana plasmática (*cuadrados con segmentos*) son procesados proteolíticamente generando ligandos maduros (*cuadrados*). Los ligandos maduros son capaces de interactuar con receptores ErbB (*dímeros en forma de T*) localizados en la misma célula (*activación autócrina*) o en células próximas (*activación paracrina*), mientras que los precursores unidos a la membrana plasmática pueden interactuar con receptores localizados en células adyacentes. (imagen tomada de caibco.ucv.v.../BiologiaCelular)

Rutas de señalización mediadas por el EGF-R.

El EGF-R es capaz de transmitir una gran variedad de señales que pueden generar respuestas celulares como mitogénesis, supervivencia celular, diferenciación, prevención o inducción de apoptosis e incluso migración celular. Esta variedad de respuestas ante un mismo estímulo puede depender del tipo

celular y más genéricamente de las diversas condiciones fisiológicas a las cuales estén sometidas las células.

Cuando el ligando extracelular se une al EGF-R se produce la dimerización de éste, lo que da lugar a la activación de su tirosina cinasa y a la transfosforilación de los residuos de tirosina de su extremo C-terminal⁶²⁻⁶⁴. Los residuos de fosfotirosina de los receptores activados son reconocidos por proteínas que poseen dominios SH2 o dominios PTB. Estas proteínas pueden ser de dos tipos: proteínas adaptadoras que pueden reclutar a otras proteínas transductoras, o factores o enzimas directamente transductores/as que tras unirse al receptor son fosforilados por éste, pasando de un estado inactivo a otro activo. Por lo tanto, mediante estos reclutamientos y/o fosforilaciones se producen cambios conformacionales y/o cambios en la localización intracelular de estas proteínas señalizadoras, siendo así capaces éstas de transmitir sus mensajes a otros componentes de las diversas rutas intracelulares de transducción de señales.^{76,77,78}.

La ruta de señalización mejor conocida en diversos organismos e iniciada por el EGFR activado es la vía de las MAPKs. Ésta se inicia por la proteína adaptadora Grb2 que posee un dominio SH2, con el que interacciona con los residuos de fosfotirosina del receptor, y dos dominios SH3, con los que interacciona con factores intercambiadores de nucleótidos de guanina tales como Sos1/2. Así, después de la formación del complejo Grb2/Sos, éste se transloca a la membrana plasmática estimulando el intercambio de nucleótidos en Ras, transformando Ras-GDP (forma inactiva) en Ras-GTP (Fig.19).



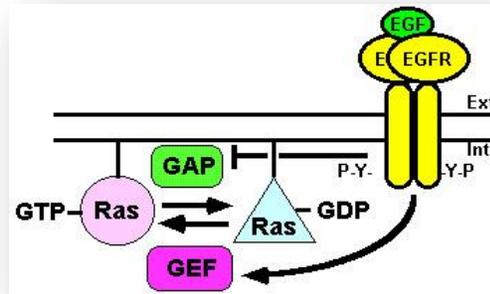


Fig. 19. Regulación del ciclo de Ras por el EGFR. Este regula el ciclo de la proteína Ras facilitando la formación de su forma activa (Ras-GTP, círculo) mediante la activación del factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) y secuestrando la forma fosforilada de la proteína activadora de la GTPasa de Ras (GAP) que la transformaría en su forma inactiva (Ras-GDP, triángulo). (imagen tomada de caibco.ucv.ve/.../BiologíaCelular)

El Ras activo es capaz de interactuar y activar a las serina/treonina cinasas Raf-1, A-Raf y B-Raf ⁶³. Estas últimas a su vez fosforilan a las tirosina/treonina cinasas duales MEK1/2, y éstas finalmente fosforilan a las serina/treonina cinasas ERK1/. Una vez que las ERK1/2 son activadas, éstas pueden fosforilar a diferentes proteínas dianas localizadas en la membrana plasmática y en el citoplasma, dando lugar a la activación de otras vías de señalización o traslocarse al núcleo y fosforilar diversos factores de transcripción como son, entre otros, c-Myc, c-Jun, c-Fos, Elk-1 y p62TCF, produciendo así la inducción o la represión transcripcional de determinados genes (Fig. 20).

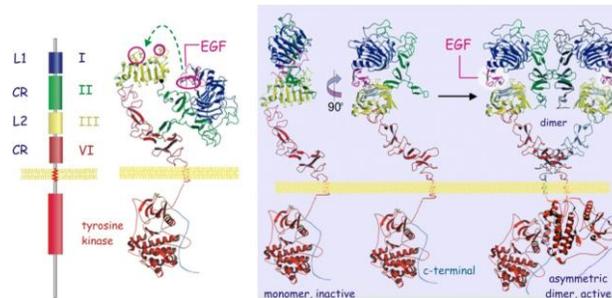


Fig. 20.- Regulación del ciclo de Ras por el EGFR. El EGFR regula el ciclo de la proteína Ras facilitando la formación de su forma activa (Ras-GTP, círculo) mediante la activación del factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) y secuestrando la forma fosforilada de la proteína activadora de la GTPasa de Ras (GAP) que la transformaría en su forma inactiva (imagen tomada de caibco.ucv.ve/biología celular).

La activación de la vía Ras/MAPK parece ser imprescindible para la proliferación celular mediada por EGF, pero no parece ser esencial para la

supervivencia celular, ya que este proceso está mediado por vías independientes de Ras. Por otro lado, líneas celulares que expresan EGFR mutados que carecen de actividad de tirosina cinasa, aunque presentan ciertas alteraciones en la transmisión de señales, sí median la activación de la vía de las MAPKs, lo que implica que mecanismos alternativos son operativos en dichas células ⁷⁶⁻⁷⁹⁻⁸¹⁻⁸⁴



E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios previos, donde se emplearon solventes organicos como EG y MC en modelos experimentales se comprobaron daños estructurales y ultraestructurales en dientes, así como cambios morfológicos en hígado y riñón.

Sin embargo aún no se conocen, los efectos que pueden tener estos solventes en cavidad oral específicamente en las glándulas salivales mayores del producto durante la gestación por la exposición continua de la madre a estos solventes.

Por lo que surgen las siguientes preguntas; ¿los solventes afectan las glándulas salivales en todos sus componentes estructurales? o ¿la presencia de los factores de crecimiento se encuentran alterados por las concentraciones de los solventes orgánicos en el tejido glandular?

F. JUSTIFICACIÓN

La intoxicación por éteres del glicol se encuentra relacionada con la actividad laboral, así como también con la exposición o la ingesta accidental de estos productos. No obstante, que estos alcoholes se encuentran en una amplia gama de artículos de uso doméstico, no existe la suficiente información que permita comprender las alteraciones que se presentan en las glándulas salivales, cómo se ven afectadas las estructuras normales ocasionando una aparente xerostomía y cómo influyen los factores de crecimiento en este padecimiento cuando los pacientes presentan el síndrome de éteres del glicol.

G. HIPÓTESIS

Los solventes etilén glicol y metil celosolve a diferentes concentraciones administradas por vía oral, ocasionan daño en el desarrollo del tejido glandular, por lo tanto altera la expresión de EGF, EGF-R y NEU en las glándulas salivales mayores de un modelo experimental.



H. OBJETIVOS

1. Objetivo General

- Determinar y correlacionar la presencia o ausencia del EGF, NEU, EGF-R, por medio de densidad óptica en el inmunomarcaje en modelos experimentales (fetos de ratas de 19 días de gestación) por exposición directa al metil celosolve y etilén glicol en una mezcla relación 1:1. En diferentes concentraciones (5%, 10% y 15%) de 0.5ml de dosis al día a las madres gestantes.

2. Objetivos Específicos

- Determinar las alteraciones estructurales en glándulas salivales mayores en productos de 19 días de gestación expuestos de forma indirecta a la mezcla de MC y EG a diferentes concentraciones y administrada vía oral a la rata madre gestante.
- Estudiar por microscopia de luz las características morfológicas de los grupos control y experimentales en tinciones de H&E y P.A.S.
- Determinar en las glándulas salivales los sitios de mayor expresión de EGF, EFGR y NEU por medio de ensayos de inmunohistoquímica, y medirlo por medio de un análisis de imágenes.
- Comparar los resultados obtenidos en cada uno de los grupos experimentales con el grupo control para determinar los cambios estructurales y de inmunomarcaje obtenidos de las diferentes dosis administradas.



IV. MATERIALES Y METODOS

1. Tipo De Estudio.

Experimental, transversal ya que se realizara una sola vez.

2. Grupos De Estudio.

Se utilizaron 20 ratas hembras adultas jóvenes, sanas las cuales se criaron en el Bioterio de la DEPel, Facultad de Odontología, UNAM. Con un peso de 200-250 gramos de peso de la cepa Wistar, distribuidas en 4 grupos de 5 ratas hembras cada uno y 8 machos sanos (2 por grupo) para el apareamiento.

2.1 Grupo Control. Sin manipulación, solo alimento y agua *ad libitum*.

2.2 Grupos Experimentales. A las ratas ya preñadas Se les administró la mezcla de los solventes orgánicos 1:1 de EG y MC de forma oral de 0.5 mL diarios por medio de una jeringa de 1mL. durante los 19 días de gestación (Fig. 19)

2.2.1 Primer grupo experimental: Se les administró 0.5 mL de la mezcla de EG y MC al 5% por VO durante los 19 días de gestación

2.2.2 Segundo grupo experimental: Se les aplicó 0.5 mL de la mezcla de EG y MC al 10% por VO durante 19 días.

2.2.3 Tercer grupo experimental: Se les aplicó 0.5 mL de la mezcla de Eg y MC al 15% por VO durante 19 días.



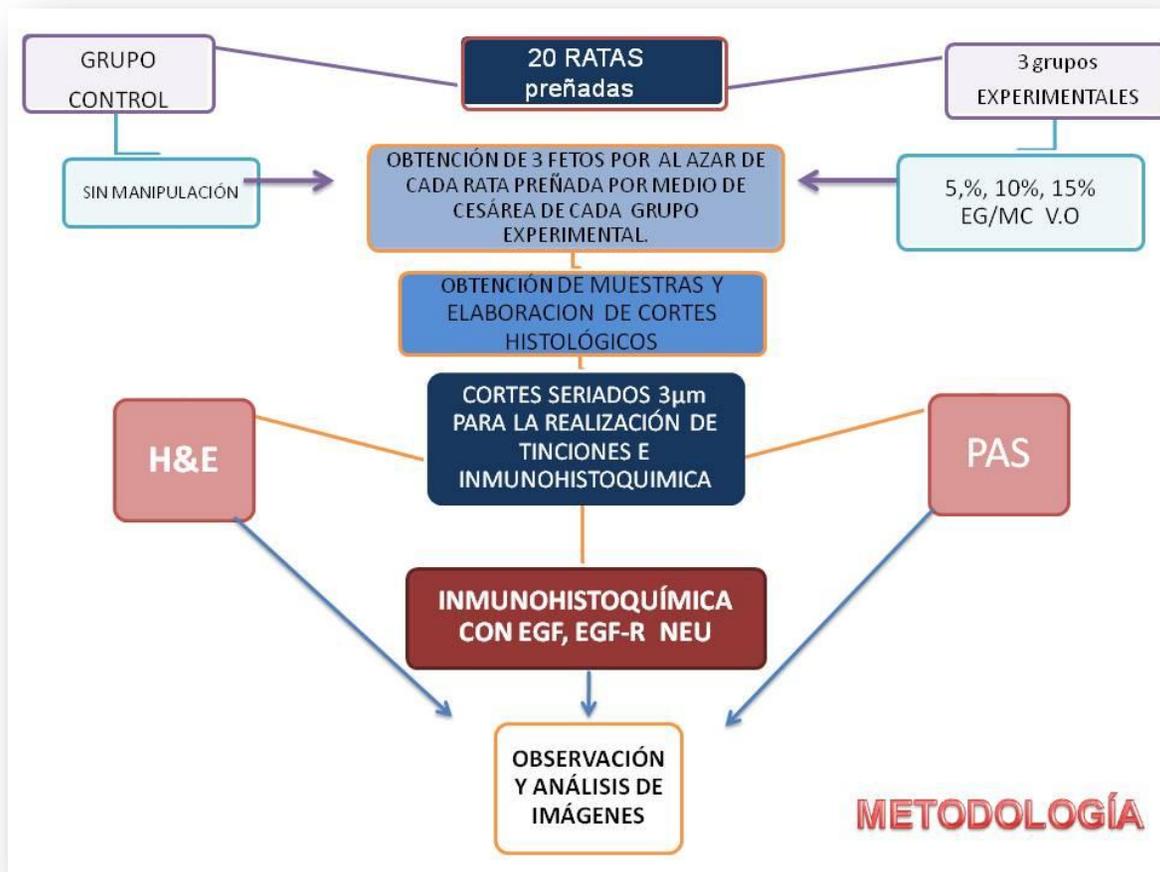


Fig. 18. Metodología

3. VARIABLES.

3.1. Variables Dependientes.

- Número de productos vivos.
- Número de productos muertos.
- Número de reabsorciones.
- Malformaciones que presenten los productos.
- Cambios estructurales.

3.2. Variables Independientes.

Solventes EG y MC.

Dosis aplicada.

3.3. Definición de Variables.

Productos Vivos. Se definen como todos aquellos seres que se nutren, desarrollan y pueden reproducirse manteniendo las características normales de su especie para ser objeto de investigación.

Productos Muertos. Feto muerto que ocurre durante o antes del parto de un feto con suficiente tamaño y desarrollo como para esperarse que sobreviva.

Reabsorciones. Se consideraron hembras con reabsorciones, aquellas diagnosticadas preñadas con un tiempo menor de 19 días y registro de celo posterior.

Malformaciones que presenten los productos. Las malformaciones corresponden a alteraciones en la forma, producto de un defecto durante desarrollo embrionario.

Cambios Estructurales. Conjunto de transformaciones en la estructura biológica de el feto.

Dosis aplicada. La cantidad de una sustancia dada a un humano o a un animal de prueba en la determinación de relaciones dosis-respuesta.



4. Procedimiento

Se utilizó como modelo experimental ratas de la cepa Wistar con un peso de 200 a 250 gramos. Se formaron cuatro grupos de cinco ratas cada uno (1 control y 3 experimentales). Posteriormente se colocaron dos machos por cada grupo para el apareamiento, el cual fue confirmado al observarse el tapón vaginal tomando este como día 1 de gestación; a partir de este momento se inició la administración a las ratas gestantes la mezcla de los éteres del glicol a las concentraciones de 5%, 10% y 15% por VO en los grupos experimentales. Al término de los 19 días de gestación se les practicó cesárea, colocando a la rata madre en la campana para ser anestesiada con éter (el sacrificio se realizó de acuerdo a la norma ISO 10993-2), el cual fue colocado hasta que la rata perdió la conciencia y se detuvieron sus pulsaciones (Fig. 22-A). Una vez sujeta de las extremidades superiores e inferiores sobre la plancha quirúrgica se hizo un corte sagital a la altura del abdomen para la obtención de los fetos (Fig. 22-B-C), los cuales se encontraban en los sacos intrauterinos en grupos de 10 a 12 por cada rata madre (Fig. 22-D). Se observó una disminución en el número de fetos vivos a medida que la dosis administrada era mayor. Una vez realizado el procedimiento quirúrgico se cuantificaron e identificaron los productos como vivos (Fig. 22-E), muertos (Fig. 22-F) y reabsorciones (Fig. 22-G). Se seleccionaron 3 fetos al azar de cada rata madre de los grupos experimentales (Fig. 22-H, I) para después colocar gasas inmersas en éter a los productos vivos, provocándoles la muerte. Posteriormente se realizó un corte a la altura de las extremidades superiores (Fig. 22-J), y un corte sagital para diseccionar las glándulas salivales mayores localizadas en la base del cuello y mandíbula. Una vez diseccionadas las glándulas salivales (Fig. 22-K), fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS. Los productos más pequeños en los cuales no fue posible diseccionar las



glándulas salivales se sumergió toda la cabeza en paraformaldehído para su posterior procesamiento, corte, tinción, y realización de la inmunohistoquímica.

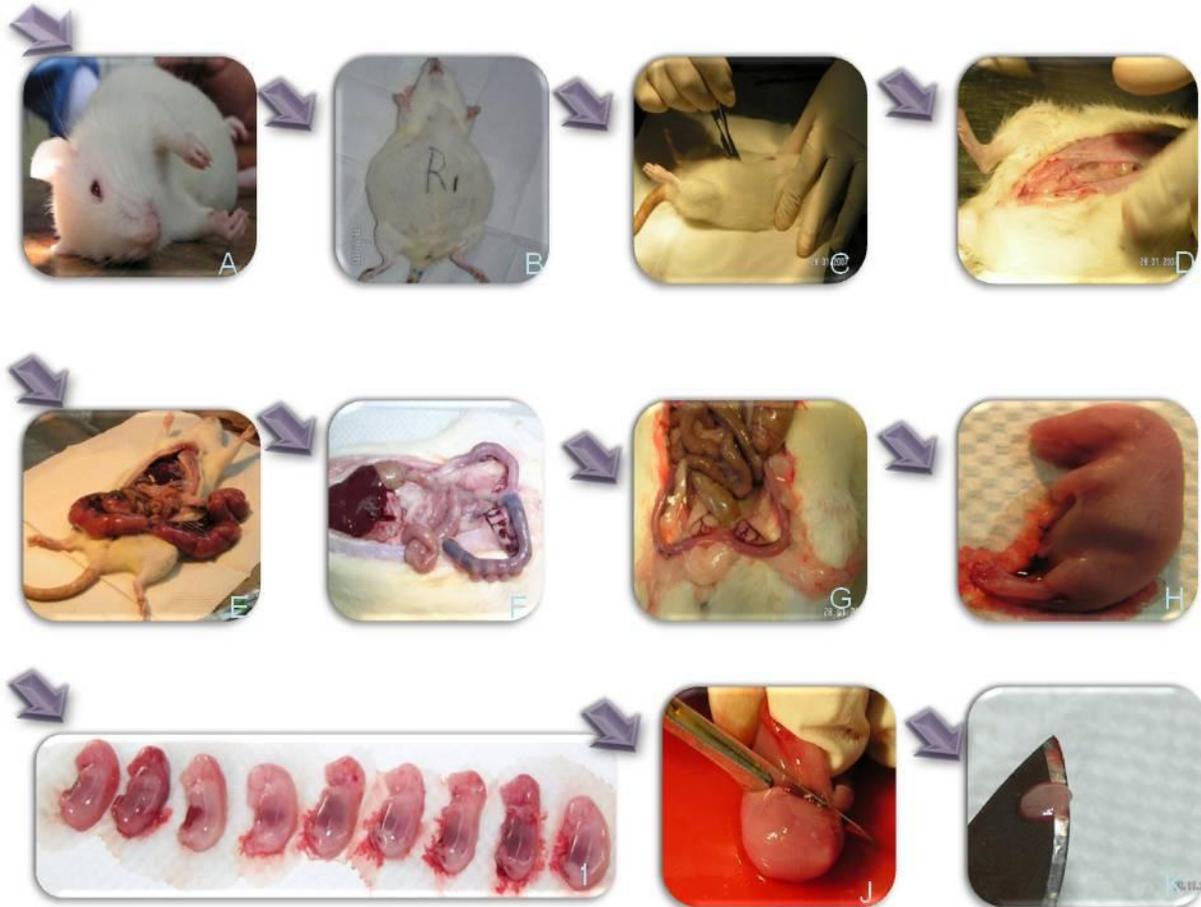


Fig. 22. Sacrificio y obtención de muestras.

4.1. Procesamiento De Muestras Para Histología de Luz.

En forma aleatoria se sacrificaron tres productos de cada madre de los grupos experimentales y control en los cuales se realizó la disección en el área de cuello para la disección de las glándulas salivales mayores, donde fueron colocadas previamente al procesamiento histológico. Los especímenes fueron procesados por la técnica de rutina para histología, realizando cortes en los bloques de cera en forma seriada con espesor de $3\mu\text{m}$ cada uno, posteriormente se realizó el montaje de las muestras y se realizó tinción con técnica de Hematoxilina y Eosina, PAS. Realizando la observación al microscopio de luz (Carl Zeiss Axiostar Plus). También se realizó el corte de 3

laminillas más las cuales fueron en blanco para que se les realizara la técnica de inmunohistoquímica posteriormente.

4.2 INMUNOHISTOQUIMICA

Obtención de tejidos.

Después de obtener los tejidos de los fetos de 19 días de gestación se mantuvieron en frascos cerrados con paraformaldehído para la conservación de los tejidos.

Procesamiento de los tejidos:

Los tejidos se lavaron en agua corriente durante 30 minutos para eliminar el paraformaldehído y se procesaron de forma automatizada en un histokinette (REICHERT JUNG HISTOKINETTE 2000) Se orientó la muestra para obtener un buen corte de toda la glándula salival, se incluyó el tejido en parafina, haciendo cortes seriados de 3μ en un microtomo semi automático (Leica). Colocando 3 cortes por laminilla.(se obtuvieron 5 laminillas por bloque).

Procedimiento para la tinción de rutina con hematoxilina y eosina (H&E).

Una vez que se obtuvieron las laminillas se pasaron los especímenes por soluciones de xilol (2 veces), Xilol – alcohol (50:50), alcohol 96°, alcohol 100° y agua bidestilada, con inmersiones de 10 min en cada solución, para su desparafinación y rehidratación de los cortes biológicos, utilizando H&E como medio de contraste (núcleos basofilos y citoplasma eosinófilo).

Preparación de laminillas para la inmunohistoquímica.

Una vez obtenidas las laminillas silanizadas, se desparafinaron y rehidrataron los cortes pasando los especímenes por soluciones de xilol (2 veces), xilol-alcohol (50:50), alcohol 100° y agua bidestilada, en ese orden con inmersiones de 10 min en cada solución. Se lavo con amortiguador de fosfatos pH 7.4 (PBS 1X) tres veces, 5´c/u.



Procedimiento inmunohistoquímico para identificar EGF, EGF-R Y NEU. Recuperación antigénica.

Para exponer los receptores (bioquímicos) se colocaron las laminillas con las muestras biológicas en el horno de microondas en una solución de citratos a punto de ebullición, dejando templar por un periodo de 10 a 15 min. Posteriormente se lavo con PBS 1X tres veces por 5 minutos c/u obteniendo para la recuperación de los componentes antigénicos.

Eliminación de peroxidasa tisular.

Se colocaron los cortes en frascos Köplin y se añadió 50mL de solución de peróxido de hidrógeno (al 3%) por 15 min luego se lavaron con PBS 1x por 5 minutos c/u. posterior a ello se coloco solución de albúmina para cubrir todo el tejido, se colocó la laminilla dentro de la cámara húmeda. Lavando con PBS 1x por tres veces, 5 minutos c/u se sumergieron las laminillas en 50mL de solución de tritón 0.2% por 15 min se lavaron con PBS 1X tres veces, 5 minutos c/u.

Procedimiento inmunohistoquímico.

Se incubaron los tejidos con los anticuerpos primarios contra EGF, EGF-R y NEU (anticuerpos monoclonales, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) Diluidos 1:100, se depositó el anticuerpo sobre la superficie de la muestra para cubrir todo el tejido, se incubaron a 4°C por 12 hrs, se secaron las laminillas con papel filtro. se lavaron las muestras con PBS 1x tres veces por 5 minutos c/u. se Secaron cuidadosamente las laminillas, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado cubriendo todo el tejido previa colocación de las laminillas dentro de la cámara húmeda y se incubó a 36°C por 60 min. Se lavó con PBS 1X tres veces, 5 minutos c/u. se secaron nuevamente las laminillas.

Revelado con DAB (cromógeno).

Se colocó sobre cada laminilla la solución DAB (Diamino Bencidina) necesaria para cubrir todo el tejido iniciando el cronómetro; pasados 5 minutos se enjuagó con PBS 1x colocando el espécimen en PBS 1x manteniéndole allí hasta completar la totalidad de las muestras para finalmente sumergirlas en agua desionizada.

Contratinción.

La contratinción se realizó con hematoxilina de Gill (para contraste de núcleos). Se lavaron con agua corriente las laminillas por 5 minutos. Se



deshidrataron los cortes de tejidos pasándolos por soluciones de alcohol de 96° (2 veces por 3 min c/u), alcohol 96° (3 minutos), xilol-alcohol, 50:50 (5 minutos) y xilol (2 veces) por 10 minutos, en ese orden.

Montaje de los tejidos.

Se sacaron cada una de las laminillas de la solución de xilol, se procedió a colocar en la porción lateral del portaobjeto una línea de resina de montaje dejando descansar el cubre objeto sobre el portaobjeto, iniciando en la zona con resina, evitando la formación de burbujas y eliminando aquellas presentes junto con el exceso de resina. Se colocaron las laminillas en posición horizontal en un cartón por 24 hrs. (para asegurar la solidificación de la resina) y se realizó la observación de los tejidos al microscopio para su catalogación, fotografiando las zonas representativas así como las áreas que presentaron inmunomarcaje.

4.3. ANÁLISIS DE IMÁGENES.

Para el análisis del inmunomarcaje obtenido en las laminillas de estudio se realizó una medición (en pixeles) las cuales fueron obtenidas mediante el programa computacional de análisis de imágenes IMAGE J. Para la calibración de las diferentes tonalidades de grises desde el color blanco al negro se utilizó una tabla de 18 tonos de grises, así de cada tono obtuvimos una lectura en de pixeles en una misma área. Posteriormente, se realizó una curva de calibración y se realizaron mediciones en las laminillas obtenidas con inmunomarcaje. Esto se hizo con la medición de 10 áreas, al azar, en campos de 400X de 3 diferentes zonas de cada laminilla en donde había presencia de inmunomarcaje. Cambiando de una fotomicrografía RGB a una imagen de 8bits. Debido a la escala de grises, con la cual se realizó la calibración, posteriormente los datos obtenidos fueron anexados a una base de datos en una hoja de cálculo para el análisis estadístico (Fig. 23).



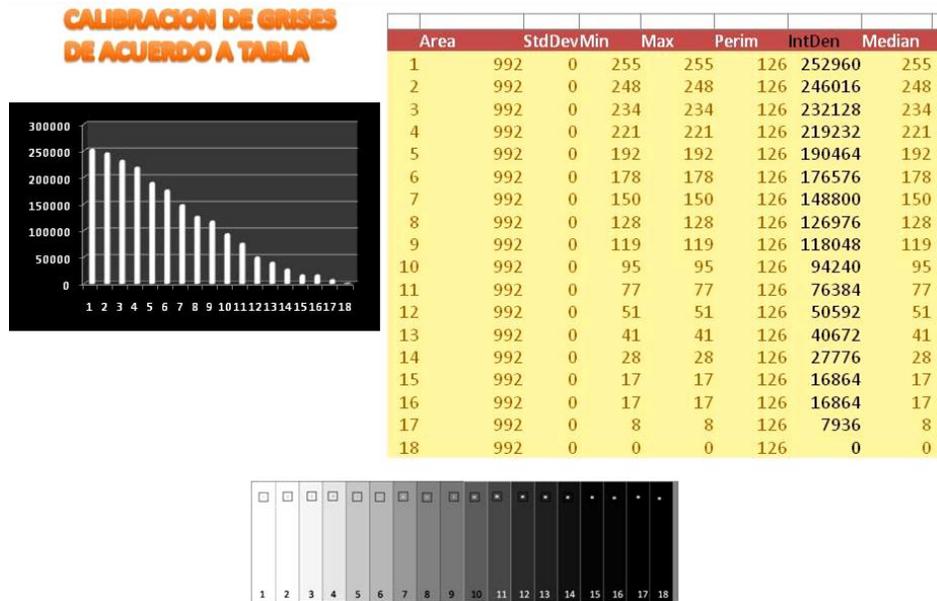


Fig. 23. en esta imagen encontramos la calibración de los 18 tonos de grises para la obtención de oscuridad y claridad del inmunomarcaje obtenido en las laminillas analizadas.

V. RESULTADOS.

1. Resultados Macroscópicos.

Las glándulas salivales después de la disección presentaron una forma piramidal con aspecto lobulado con coloración gris amarillenta, de consistencia blanda con un peso promedio de 6-8 mg (fig. 24).



Fig. 24. Apariencia macroscópica normal de las glándulas Salivales mayores de un feto de 19 días de gestación.

1.1. GRUPO CONTROL.

En este grupo, de las 5 madres gestantes se obtuvieron 65 fetos vivos, teniendo en promedio de 10 a 13 fetos viables por madre (Tabla 2). Los productos presentaron tamaño, forma, y características estructurales homogéneas entre sí (Fig.25).



Fig.25 imagen macroscópica de los fetos del grupo control con características físicas normales.

1.2. GRUPOS EXPERIMENTALES

El grado de alteraciones en los grupos experimentales fue aumentando conforme las concentraciones del EG y el MC se incrementaron. En el grupo en el que se administró los solventes al 5% se obtuvieron 63 fetos vivos, en el grupo experimental de (10%) solo se presentaron 37 fetos viables y en el grupo experimental del 15% no se tuvieron fetos viables. Las malformaciones encontradas fueron:

1. Disminución en el número de fetos vivos.
2. Falta de desarrollo, con retardo en el crecimiento, y consecuente talla disminuida. Fig (26)
3. Malformaciones craneofaciales.
4. Acortamiento de cuello.
5. Falta de pared abdominal.

6. Acortamiento de extremidades superiores e inferiores.
7. Reducción en longitud de la cola.

La gravedad de las alteraciones que se manifestaron fueron relacionadas con el aumento de las concentraciones de los solventes orgánicos.

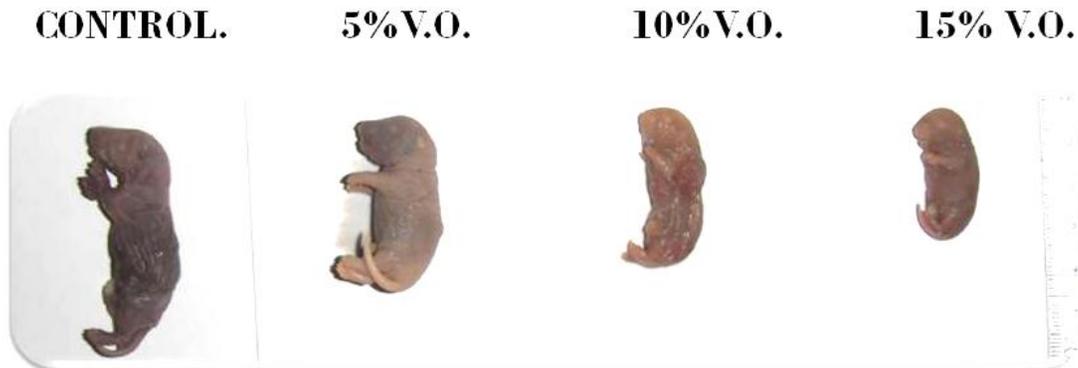


Fig 26 Características físicas de los grupos experimentales en las diferentes concentraciones en donde se observa disminución de tamaño así como pérdida de la morfología normal en comparación al grupo control.

2. Resultados Microscópicos.

2.1. Grupo Control.

Las estructuras normales de las glándulas salivales encontradas en los cortes histológicos del grupo control y observados por medio de microscopia fotónica se describen a continuación teniendo en cuenta que no recibió este grupo ninguna manipulación.

2.1.1. H&E.

La tinción con hematoxilina y eosina en los cortes histológicos de la glándula parótida, submaxilar y submandibular reveló la presencia de acinos glandulares conformados por gran número de células piramidales de citoplasma basófilo, la luz de los conductos intercalares amplia, visible y bien

delimitada por células cúbicas bien organizadas, con núcleos basales. Los conductos estriados estaban delimitados por células de tipo columnar con abundante citoplasma eosinófilo y núcleos orientados basalmente. El estroma se encuentra constituido por abundantes fibroblastos activos, fibras colágenas gruesas y delgadas, bien vascularizado con capilares y pequeñas terminaciones nerviosas (Fig. 27). Las células acinares y ductales intercalares se encontraron rodeadas por células mioepiteliales de forma fusiforme, delimitados por una membrana basal, por campo de 400X se encontraron en promedio 25 acinos glandulares. Los conductos estriados estuvieron constituidos por células columnares con estrías en la porción basal.

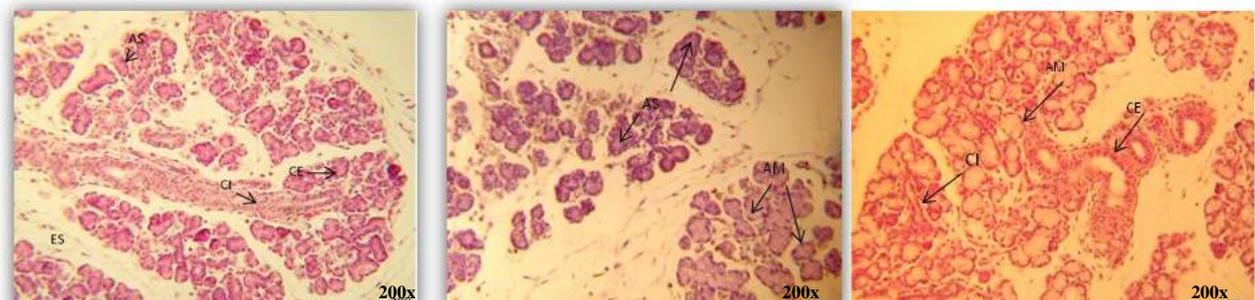


Fig. 27. Corte histológico a 200X, teñido con H y E, en la que se aprecian los acinos serosos(AS), conductos intercalares (CI), estroma (ES) y conductos estriados (CE) de glándula parótida de un grupo control.

La tinción con PAS permitió observar la membrana basal delimitando los acinos glandulares y los conductos intercalares, así como las características de las células mioepiteliales que presentan forma fusiforme. (Fig. 28,29)

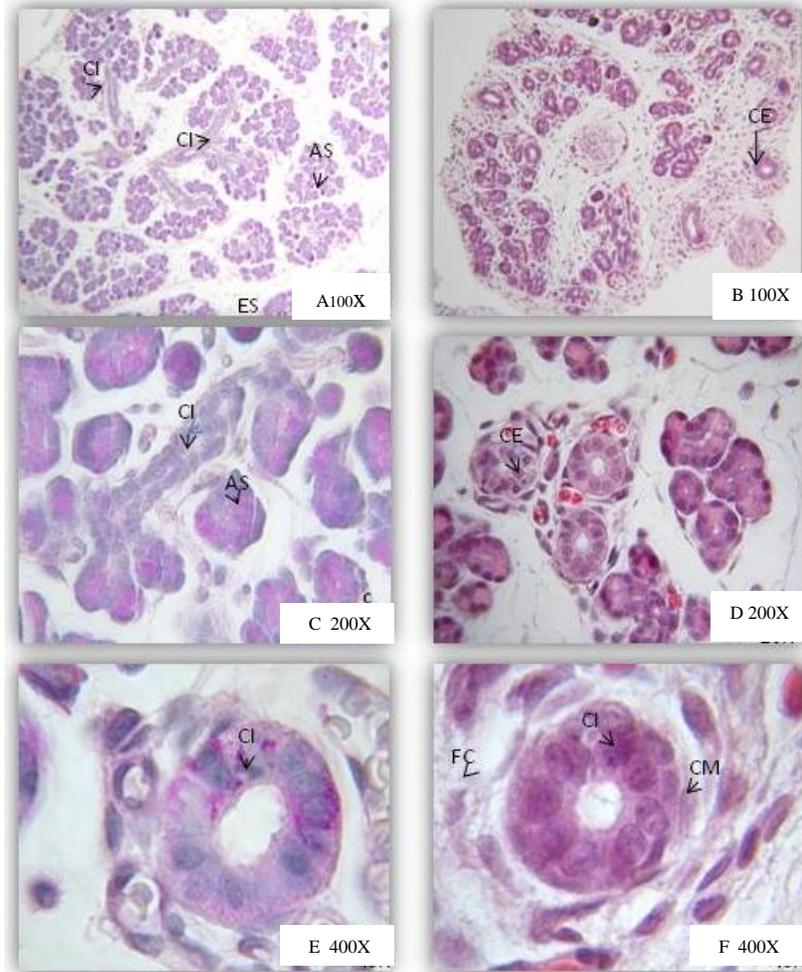


Fig. 28. Corte histológico de glándula parótida teñida con PAS (columna izquierda) y H & E (columna derecha). A y B) a un aumento de 100X podemos observar con el abundante número de acinos serosos(AS), conductos intercalares (CI) y conductos estriados (CE), estroma (ES) de tejido conjuntivo laxo circundando los acinos y conductos. C y D) a 200x se pueden observar los núcleos de las células, de forma esferoidal, localizados en la porción basal. El citoplasma de las células acinares es PAS positivo y con H & E es basófilo. Los conductos estriados están delimitados por células de tipo columnar con abundante citoplasma eosinófilo, núcleos orientados basalmente. E y F) A 400X con PAS. Las células de los conductos intercalares son PAS positivos (ricas en mucina), de forma cúbica con núcleo centrado. F) Con H y E se puede ver la disposición de las células mioepiteliales (CM) y de las fibras colágenas (FC) rodeando al conducto.

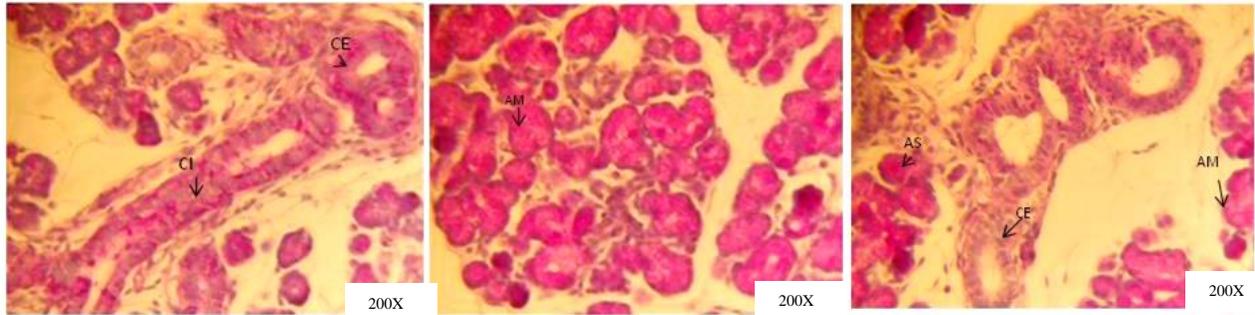


Fig. 29. A) conducto intercalado (CI) y conducto estriado (CE) con presencia de mucina siendo a la tinción PAS positivo de la glándula sublingual B) acino mucoso. C) conducto estriado (CE) acino mucoso (AM) de la glándula submandibular con presencia de mucina.

2.1.2. Inmunohistoquímica

La reacción a EGF fue de leve a moderada, en el citoplasma de las células acinares de las Glándulas salivales parótida, submaxilar y submandibular (Fig. 30). Al igual se encontró con EGF-R (Fig. 31) y con NEU (Fig. 32).

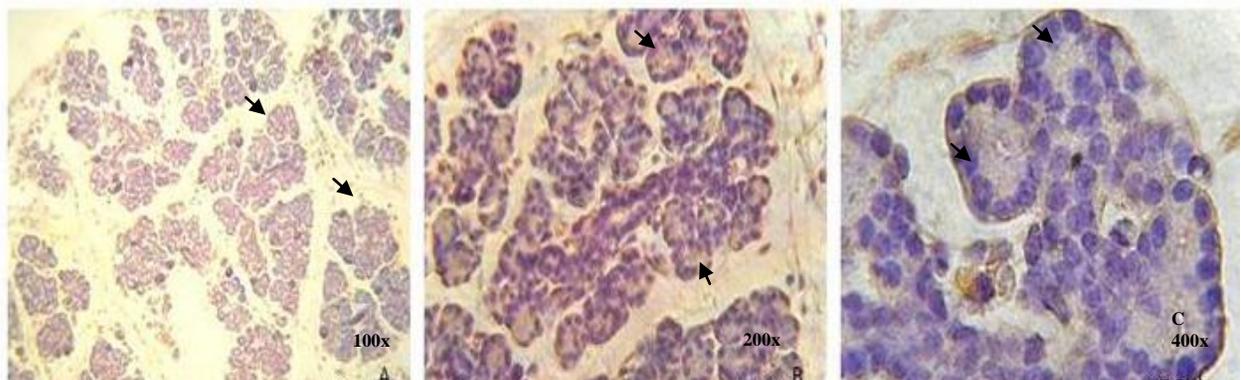


Fig. 30. Inmunohistoquímica con EGF en glándula parótida A) se aprecia la cantidad de lobulillos acinares, delimitados por el estroma fibroso laxo de tejido conjuntivo(flechas) B) Se aprecia a 200x un conducto estriado con reacción leve en su citoplasma, así como los acinos (flecha es un acino). C) a 400x se puede observar la inmunoreacción leve con EGF en el citoplasma de las células acinares (flecha).

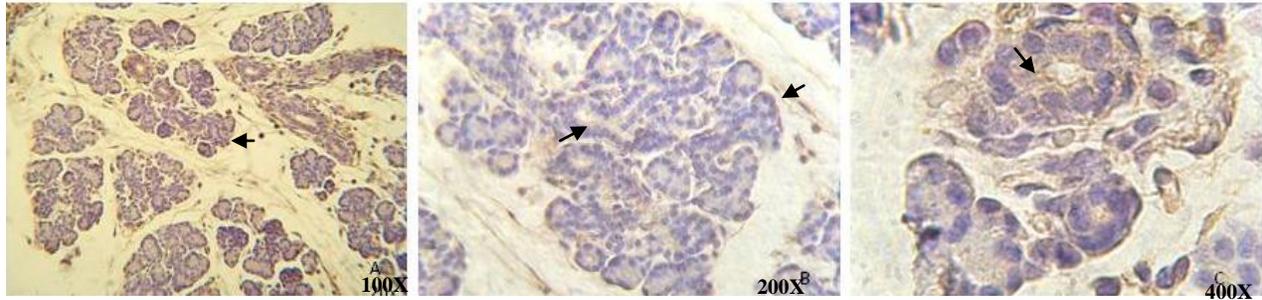


Fig. 31. Inmunohistoquímica con EGF-R en glándula parótida A) se aprecia la cantidad de lobulillos acinares y conductos estriados e intercalares (flecha), delimitados por el estroma fibroso laxo de tejido conjuntivo. B) A 200x se puede observar la inmunoreacción leve con EGF-R en el citoplasma de las células ductales. C) Se aprecia a 400x un conducto intercalar con reacción leve en su citoplasma, el núcleo es centrado.

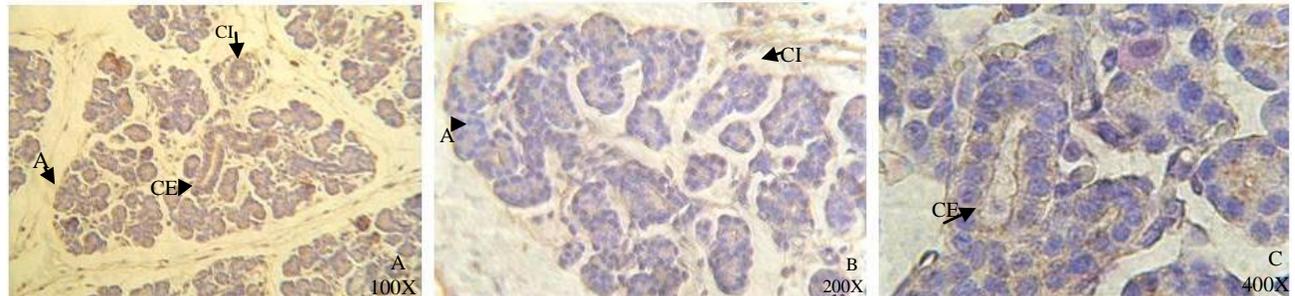


Fig. 32. La respuesta inmunohistoquímica en la glándula submaxilar con NEU fue homogénea de forma leve en los acinos(A) y conductos intercalares (CI) y estriados (CE). A) Abundantes acinos glandulares y conductos estriados. B) Los conductos intercalares presentan una reacción Inmunohistoquímica homogénea. C) en campo de 400x se puede observar la luz bien delimitada de un conducto estriado (CE), con reacción leve a NEU.

2.2. Grupos Experimentales.

2.2.1. Grupo Experimental Mezcla Acuosa De Solventes Al 5% Administrada Por Via Oral

2.2.1.1. Histoquímica.

En las glándulas submandibular, sublingual y parótida, La observación microscópica reveló daños al tejido de tipo moderado, tanto en las estructuras ductales como en los acinos, estos últimos estuvieron compuestos en su mayoría por células amorfas de forma

piramidal con citoplasma eosinófilo, también se encontró una gran cantidad de conductos intercalares en los cuales la arquitectura es dismórfica con la luz de los conductos delimitada en forma circular, las células cúbicas presentan citoplasma entre eosinófilo y basófilo con aspecto grumoso, los núcleos están centrados y de forma elongada e hipercromáticos, así como nucléolos prominentes, los conductos estriados perdieron su configuración. El estroma es fibroso laxo con fibroblastos jóvenes y escasos capilares (Fig. 33,34,35).

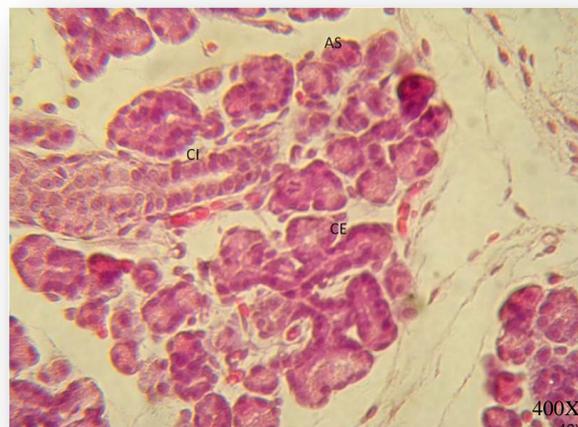


Fig. 33. Corte histológico de glándula parótida teñida con Hematoxilina y Eosina a 400X, En donde se observan los acinos serosos(AS), los conductos intercalares (CI) con la delimitada y conductos estriados (CE).

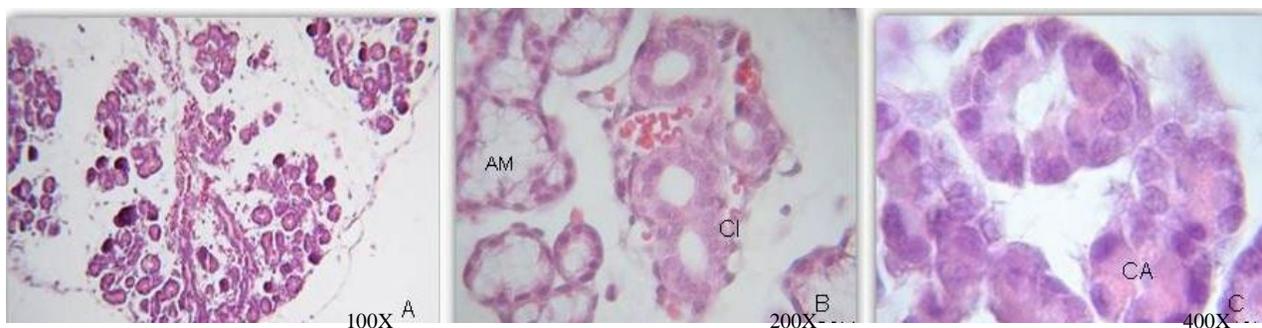


Fig. 34. En el grupo experimental de 5% de solventes en glándula parótida (A) con solventes orgánicos con tinción con H & E. A 10x se aprecia la disminución en el número de acinos, los conductos no presentan alteraciones. B) en glándula submandibular los acinos mucosos (AM) no muestran cambios arquitectónicos, los ductos intercalares (CI) sin cambios morfológicos. C) conducto intercalar de glándula submaxilar con la luz del conducto delimitada por células piramidales con núcleos basales bien definidos.(CA) granuloso.

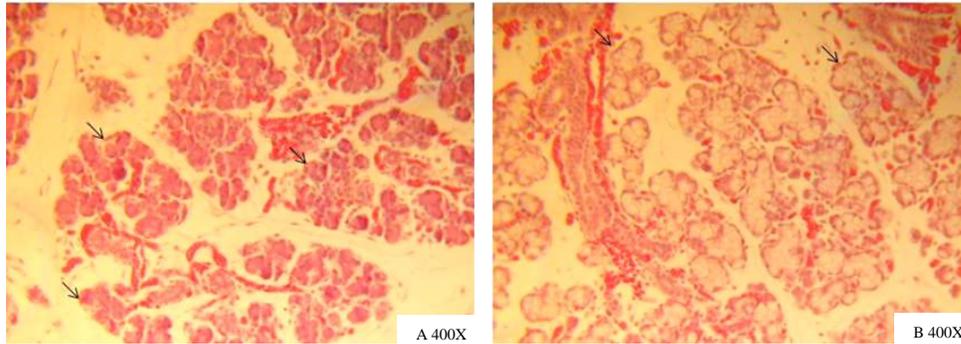


Fig. 35. En glándula submandibular, (A) en aumento de 400x se aprecia la disminución en el número de acinos, los conductos presentan alteraciones en el desarrollo. B) Los acinos mucosos (AM) muestran cambios arquitectónicos, los ductos intercalares no se encuentran bien desarrollados.

La tinción con P.A.S fue más intensa, comparada con el grupo control, esto podría contribuir al daño estructural que se observa tanto en las células acinares como ductales (Fig. 36).

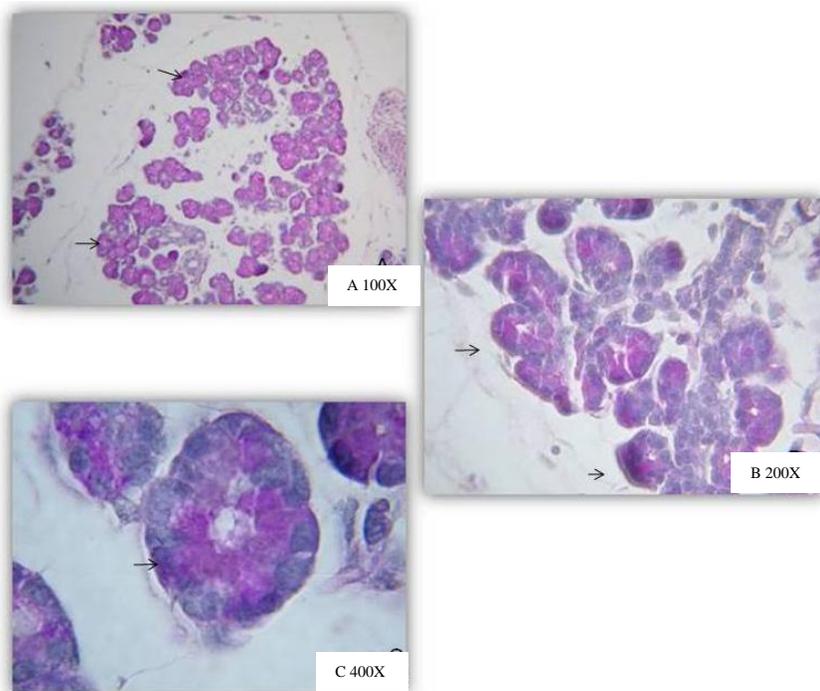


Fig. 36. Glándula submaxilar en el grupo experimental con administración de la mezcla acuosa al 5%, se aprecia el daño estructural en los acinos y células de conductos. A) Se aprecia una disminución en el número de lobulillos. B) con pérdida de la arquitectura, C) las células piramidales de los acinos presentan lisis nuclear.

2.2.1.2. Inmunohistoquímica

La reacción a EGF fue moderada en la glándula parótida (Fig. 30), con localización en el citoplasma de las células acinares y de los conductos intercalares encontrándose también un inmunomarcaje moderado en los grupos de EGF-R (Fig. 37) y con NEU (Fig. 38), de las glándulas submaxilar y sublingual.

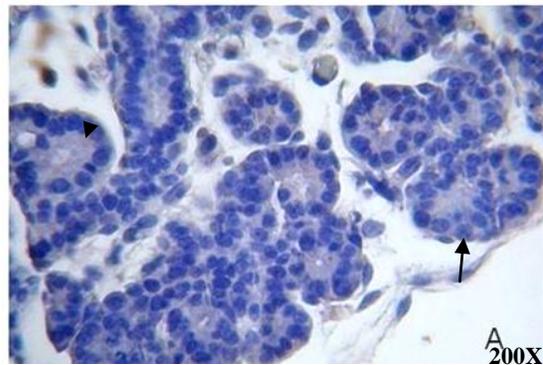


Fig. 37. Cortes histológicos con inmunomarcaje de EGF del grupo experimental al 5%. En el corte histológico teñido con técnica de inmunohistoquímica para EGF, se obtuvo una reacción moderada en el citoplasma de células acinares (flecha) y en conductos intercalares (punta de flecha).

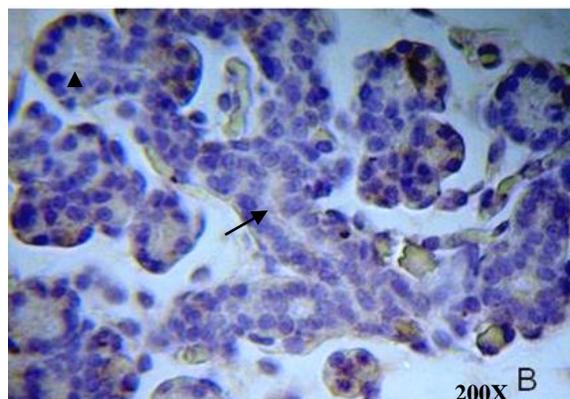


Fig. 38. Inmunoreacción moderada a EGF-R, de forma heterogénea en el citoplasma de las células ductales (flecha) y en conductos intercalares (punta de flecha).

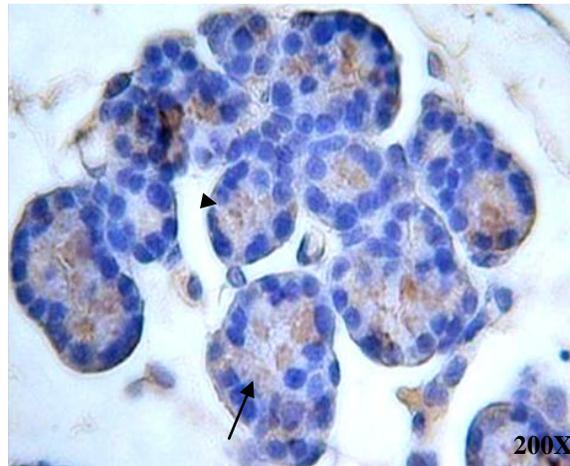


Fig. 39. La glándula sublingual con Neu mostró una inmunoreacción de moderada a intensa de forma heterogénea en el citoplasma de las células acinares (flecha) y ductales (punta de flecha).

2.2.2. GRUPO EXPERIMENTAL MEZCLA ACUOSA DE SOLVENTES AL 10% ADMINISTRADA POR VIA ORAL.

2.2.2.1. Histoquímica

En las glándulas salivales mayores (sublingual, submandibular y parótida) Se encontró una importante disminución de los acinos glandulares de secreción serosa que están formados por células piramidales de núcleo hipercromático rechazado a la periferia, también se observó disminución en el tamaño de conductos estriados los cuales presentan células de aspecto columnar y cuboidal lo que hace pensar en cambios morfológicos en su aspecto y conformación, el citoplasma basófilo con núcleos picnóticos, rechazados a la periferia. Los conductos intercalares se encontraron en pequeños grupos formados por células cúbicas, la luz de los conductos ocluida en algunos conductos y en otras estrecha; el estroma fibroso laxo con abundantes fibroblastos activos fusiformes, el grado de alteración morfológico en este grupo se considera moderada (Fig. 40 y 41).

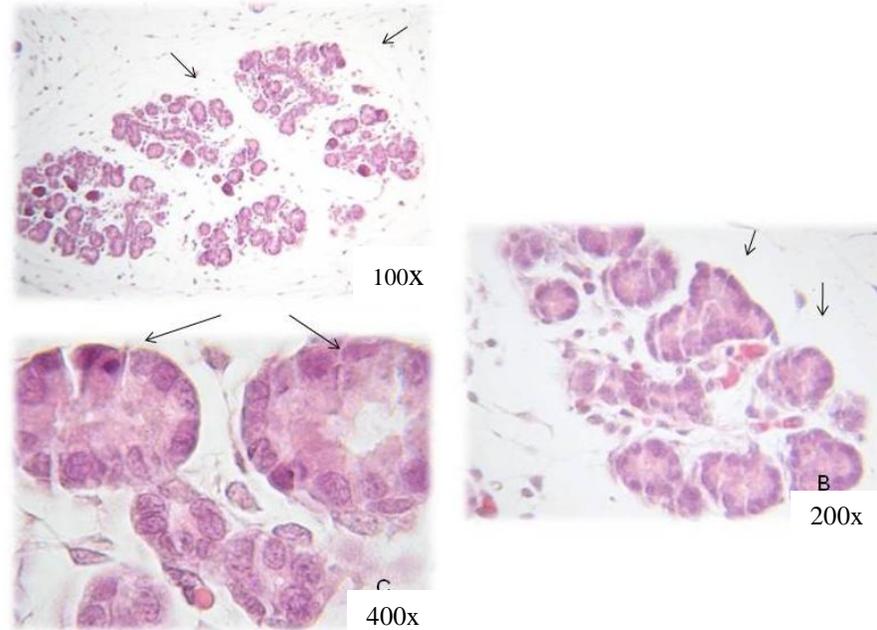


Fig. 40. Corte histológico de glándula sublingual con Tinción en hematoxilina y eosina de grupo experimental al 10%, en donde se aprecia el daño a nivel de células acinares y los conductos, se observa citoplasma eosinófilo, granuloso, con núcleos mal definidos, con cariólisis (C).

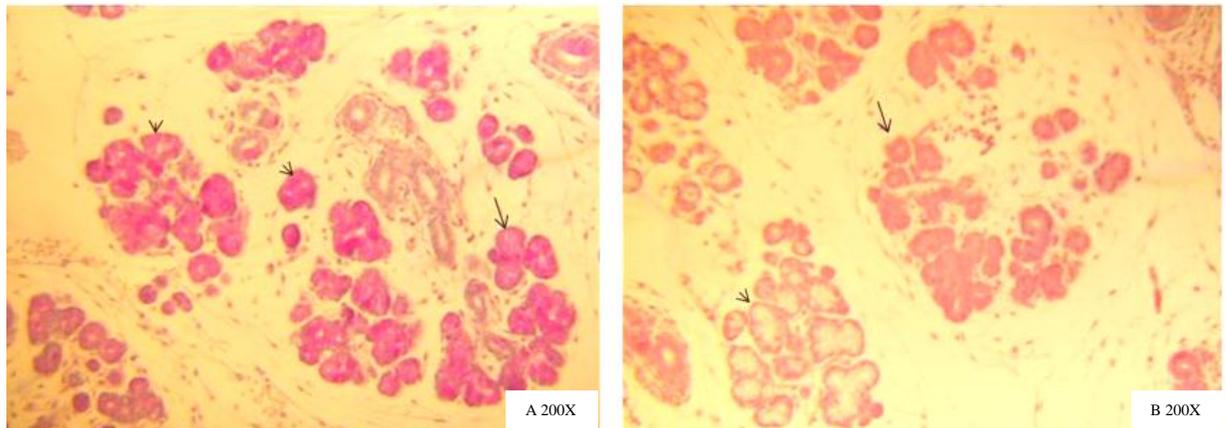


Fig. 41. Imagen histológica de glándula parótida en la que se observa cariólisis y cariórrexis, el citoplasma de las células ductales muestra una reacción leve a PAS (punta de flecha) en tanto que las células acinares son PAS positivo intensamente (flecha). B). Imagen histológica de glándula submandibular en la que se observa disminución en el número de acinos, de conductos intercalares y de conductos estriados, el citoplasma de las células ductales muestra una reacción leve a PAS (punta de flecha), en tanto que las células acinares son PAS positivo intensamente (flecha). Se observa en la misma muestra acinos mucosos (punta de flecha), y conductos estriados con luz mal delimitada (flecha) con falta de conductos excretores.

2.2.2.2. Inmunohistoquímica.

En el grupo de glándulas salivales mayores (sublingual, parótida y submandibular) se encontró de forma semejante que los conductos intercalares formados por células dismórficas, con núcleo esférico, en la porción basal, rodeados por escasas células mioepiteliales. Hay poca presencia de conductos estriados los cuales están constituidos por células de tipo columnar que presentan estrías en la porción basal, delimitados por la membrana basal, todo a su vez se encuentra delimitado por tejido conjuntivo fibroso denso y haces de fibras colágenas entre los acinos y escasos ductos con vasos sanguíneos. La presencia de el inmunomarcaje detectado por la peroxidasa en la técnica de inmunohistoquímica se hace menos evidente en el citoplasma de los conductos intercalares, estriados, y en los acinos de tipo seroso este inmunomarcaje tiene menor presencia en este grupo a diferencia del grupo control y del grupo de 5% donde se encontró en mayor proporción de el inmunomarcaje (Figs. 41, 42 y 43).



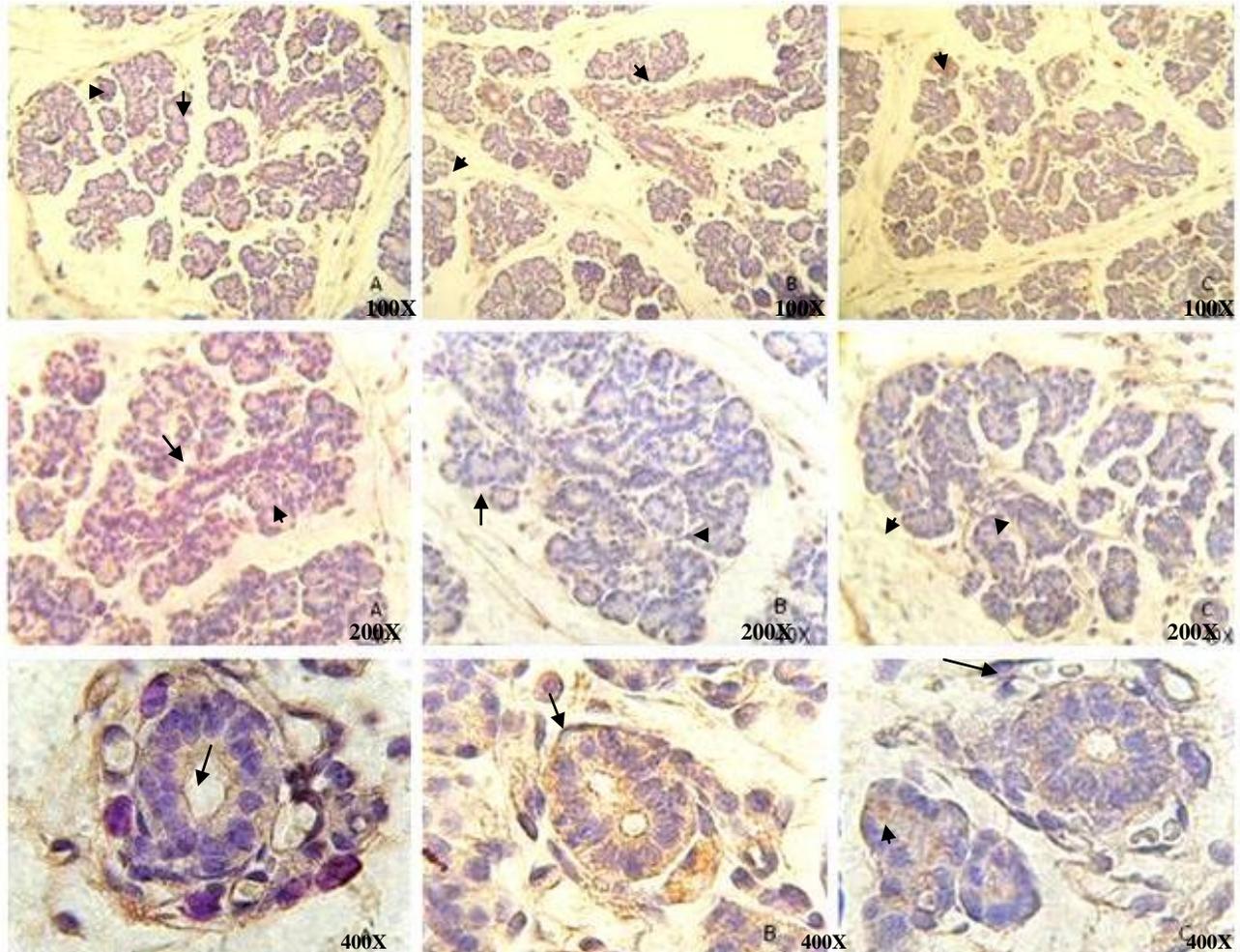


Fig. 41. La inmunohistoquímica con EGF en glándula sublingual, muestra una reacción homogénea leve sobre el citoplasma de las células acinares y ductales (A punta de flecha) y a mayor aumento se aprecia la reacción moderada sobre la membrana citoplasmática en su porción basal y la membrana basal tanto de los acinos como de los conductos (punta de flecha) C) se observa un conducto estriado con inmunoreacción en el citoplasma celular (flecha).

Fig. 42. Imagen histológica de la glándula submandibular con reacción inmunohistoquímica a EGF-R en donde la respuesta es leve en el citoplasma celular (A flecha) B) inmunomarcaje de EGF-R en conductos intercalares los cuales se ven disminuidos en el desarrollo con poca definición en la luz del conducto en la porción basal es moderada (punta de flecha). C) fotomicrografía de un conducto intercalar en el cual se observa inmunomarcaje de color marrón en forma homogénea con una presencia leve (flecha).

Fig. 43. La inmunohistoquímica con NEU es levemente positiva con distribución homogénea en todo el citoplasma celular (punta de flecha). B) inmunomarcaje en la membrana basal tanto de los acinos como de los conductos (punta de flecha). C) distribución homogénea del inmunomarcaje en un conducto estriado (punta de flecha) y en acinos serosos de glándula parótida (flecha).

3. Análisis de imágenes por densidad óptica.

3.1. Resultados de EGF.

En la medición de la densidad óptica reportada en pixeles y de acuerdo a los datos obtenidos en el inmunomarcaje de 10 áreas analizadas al azar de 3 diferentes campos en 200X y 400X de cada corte histológico inmuno teñido, se localizo una mayor presencia de factor de crecimiento epidérmico en el grupo experimental de ratas tratadas con solventes orgánicos al 5% con los solventes orgánicos. Esto puede ser comprobado por los promedios obtenidos en las mediciones en pixeles que fueron la media de todas las muestras las cuales serán utilizados en la comparación con los datos obtenidos en los otros grupos experimentales (Fig.44)

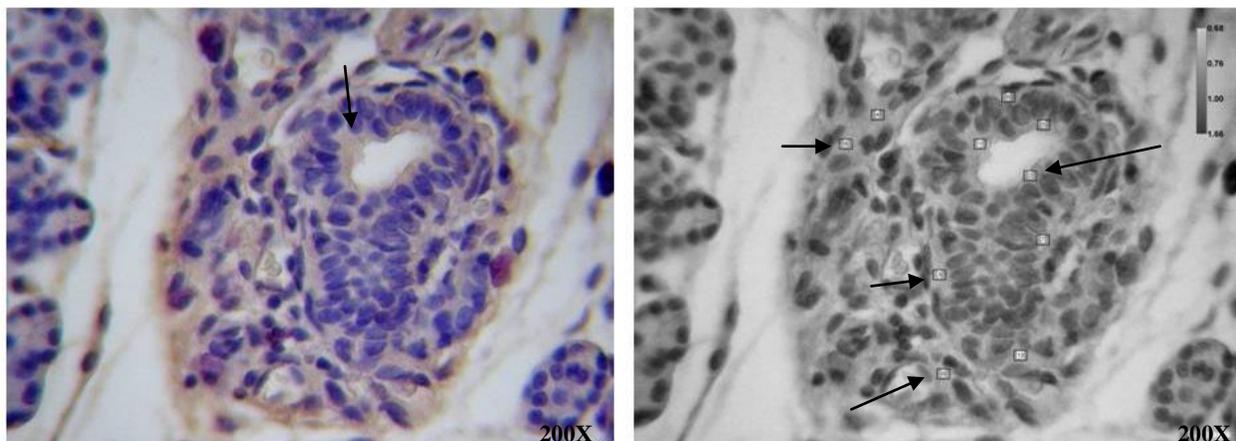


Fig. 44 A) grupo control con inmunomarcaje para EGF) Conducto estriado con presencia de reacción por inmunohistoquímica homogénea en el citoplasma (flecha) B) Imagen de conducto intercalar en mapa de 8 bits para análisis de inmunomarcaje en 10 áreas diferentes del corte histológico(flechas)

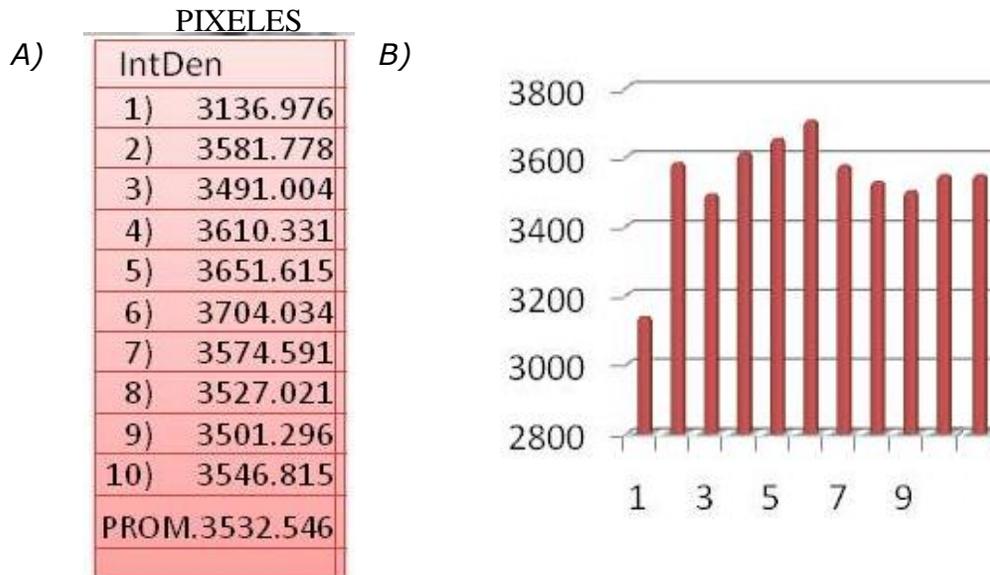


Fig 45: A)datos obtenidos de las 10 áreas tomadas al azar para el análisis de pixeles de los para su posteriores análisis de datos en una hoja de cálculo (Graph Pad InStat.). B) Datos obtenidos en medida de pixeles para elaboración de base de datos y posterior comparación con grupos experimentales.

En el grupo de solventes tratados al 5% anti EGF, se detectó aumento en el inmunomarcaje que fue analizado por medio del software en donde se determinó un aumento en la presencia de EGF con relación al grupo control. (Fig.46).

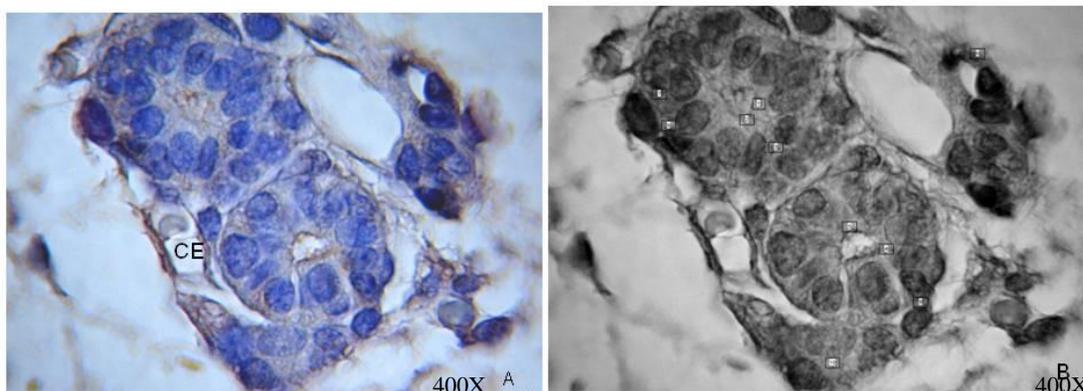


Fig. 46) A) Conducto estriado (CE) con presencia de reacción por inmunohistoquímica homogénea en el citoplasma. B) Imagen de conducto estriado en mapa de 8 bits para análisis de inmunomarcaje en 10 áreas diferentes del corte histológico.

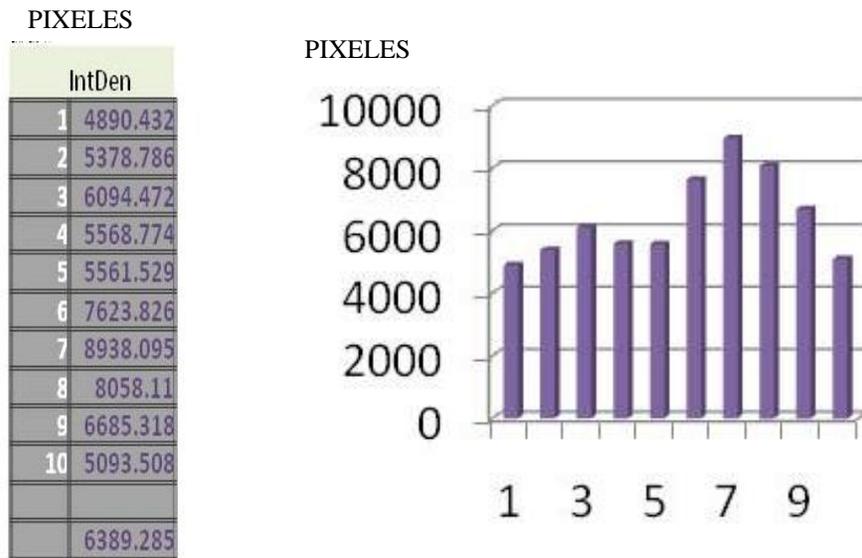


Fig 47) Datos obtenidos en medida de pixeles para elaboración de base de datos y posterior comparación con grupos experimentales. Gráfica 2) De los diferentes datos obtenidos en densidad óptica (pixeles) para análisis de datos en una hoja de cálculo. (Graph Pad InStat.)

Los resultados obtenidos en el análisis de imágenes en los 3 grupos experimentales de las fotomicrografías obtenidas al azar de las 3 glándulas salivales mayores, se encontró por medio del inmunomarcaje y en el análisis estadístico que hay una mayor expresión de EGF en los tratados a concentraciones del 5% y que disminuye cuando la dosis es elevada al 10%. Mientras que en el grupo experimental tratados con dosis del 15% no se obtuvieron fetos viables para la toma de muestras y análisis por densidad óptica. Fig. 48, 49, 50.

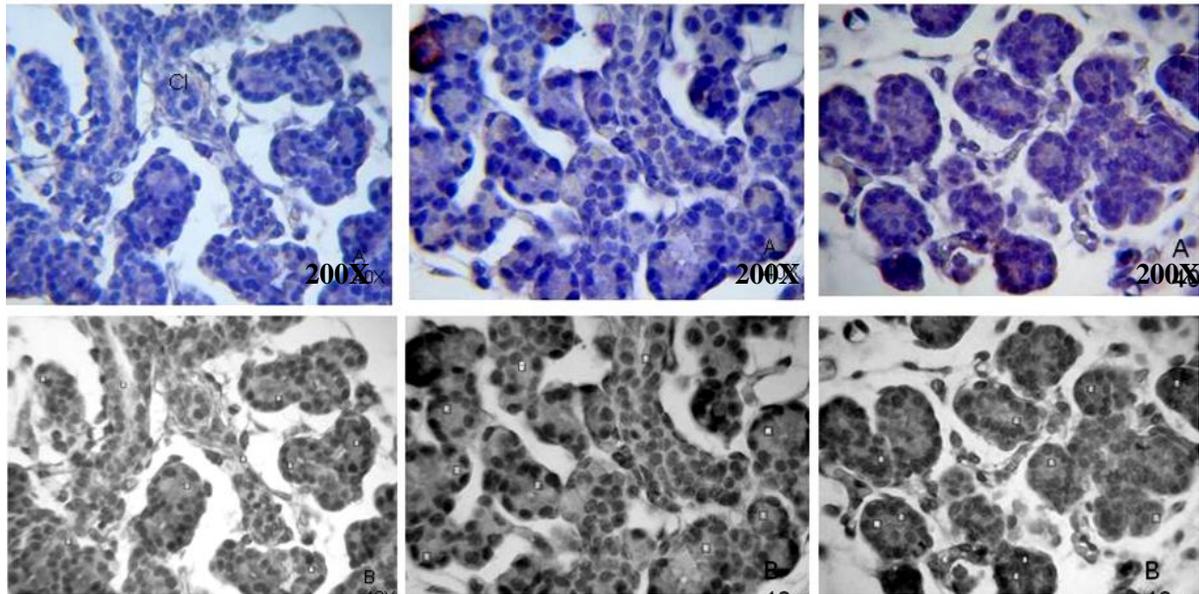


Fig. 48

Fig. 49

Fig. 50

Fig.48. A control EGF) conducto intercalar (CI), con presencia de EGF distribuida de forma homogénea en el citoplasma. B) conducto intercalar en mapa de 8 bits para el análisis de imagen.

Fig. 49. A grupo experimental de 5%) conducto intercalar, conductos estriados y acinos serosos con presencia de inmunomarcaje. B) Imagen de conductos intercalares, estriados y acinos serosos en mapa de 8 bits

Fig50. grupo experimental 10%) Acinos serosos con presencia de inmunomarcaje. B) Mapa de 8 bits para análisis de imagen.

Los resultados obtenidos del grupo experimental tratado con el anticuerpo anti-EGF (A) mostró un aumento significativo ($P < 0.01$) en el grupo del 5% comparados con el grupo control y en el grupo que se les administró solventes orgánicos al 10%, por lo tanto se concluye que los efectos de los solventes etilen glicol y metil celosolve se encuentran presentes desde las dosis de 5% donde hay un daño a nivel estructural. (Fig 51).

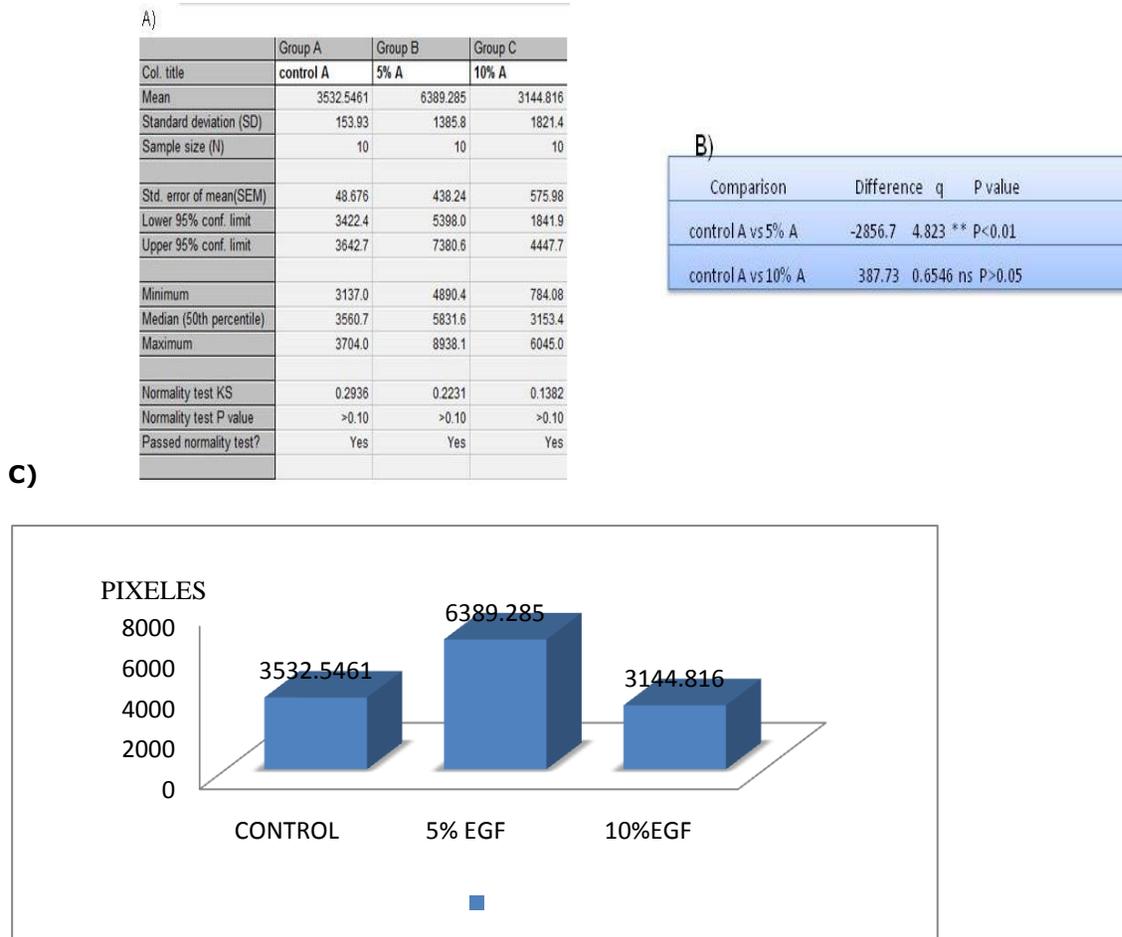


Fig 51 A) Comparación estadística de los tres grupos experimentales. B) Diferencias significativas encontradas en los tres grupos experimentales (Graph Pad InStat.). C) Comparación de los tres grupos experimentales de los datos obtenidos de el inmunomarcaje con EGF.

3.2. RESULTADOS EGF-R

Los resultados obtenidos con el grupo experimental tratados con solventes al 5% e incubado con el anticuerpo anti-EGF-R, mostraron significativa disminución (**P<0.01) comparado con los grupos control y con el grupo al que se le administró solventes orgánicos al 10%, también se encontró una disminución significativa de EGF-R. Por lo tanto se puede concluir que los efectos de los solventes etilen glicol y motil celosolve se encuentran presentes a dosis de 5% donde hay un daño a nivel de receptores y en dosis de 10% encontramos el daño más severo sugiriendo que los daños están

presentes en receptores como en ligandos , lo que permite comprobar que en las dosis de 5% en EGF hay un aumento de este factor de crecimiento y en las dosis del 5 % para EGF-R se encontró una disminución de los receptores, concluyendo que existe una afectación en el sistema de receptor-ligando del factor de crecimiento epidérmico. (Figs. 52, 53, 54)

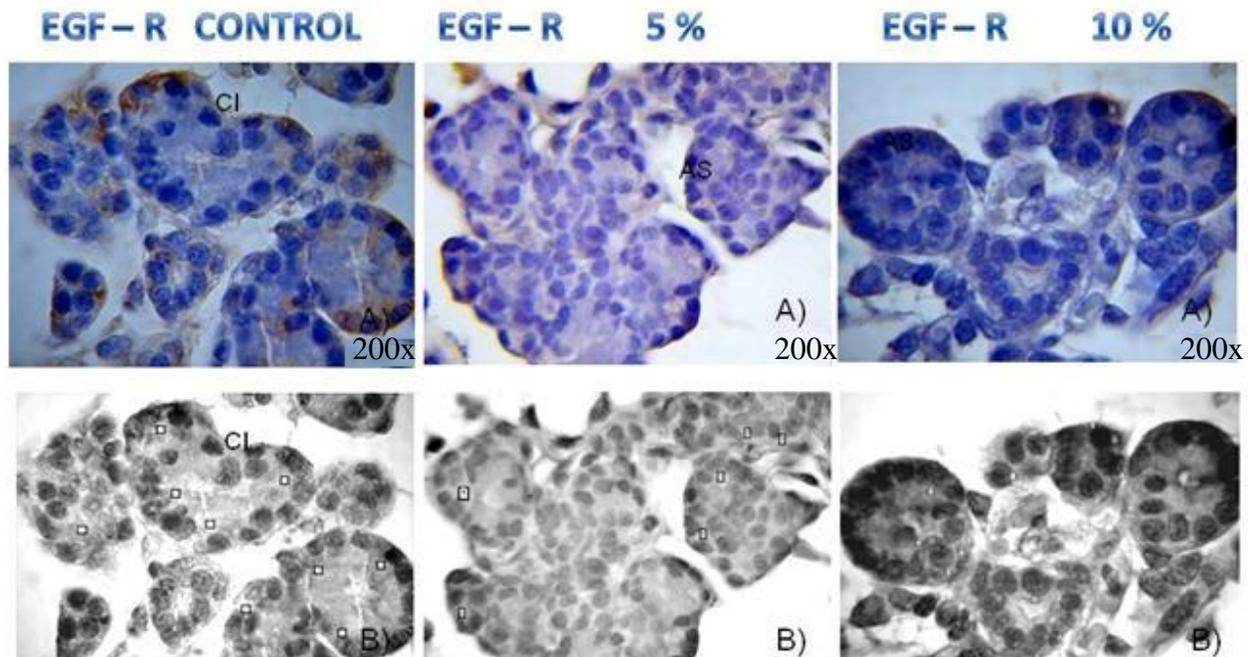


Fig.52. A inmunohistoquímica con EGF-R del grupo control) conducto intercalares (CI), con presencia de EGF-R distribuido de forma localizada en la periferia de los CI y de los acinos serosos. **B)** CI en mapa de 8 bits. **Fig.53. A** inmunohistoquímica de el grupo 5% de EGF-R) Acinos serosos con presencia de inmunomarcage leve en la periferia de los acinos **B)** Acinos serosos en mapa de 8 bits **Fig.54** inmunomarcage del grupo de 10% con EGF-R) acinos serosos con presencia de inmunomarcage leve en la periferia e los acinos serosos. **B)** mapa de 8 bits para análisis de imagen.
bits para el análisis de imagen.

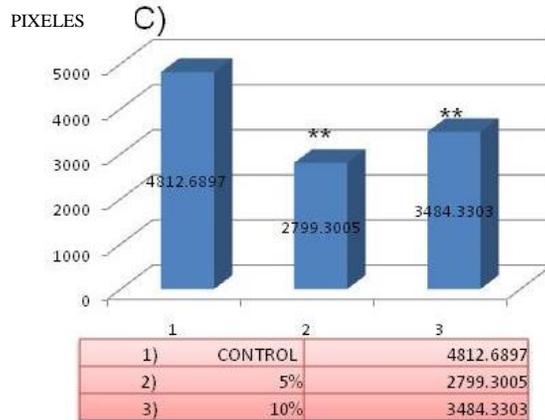
Fig. 55) Comparación estadística del grupo control y los dos grupos experimentales con inmunomarcaje para EGF-R. B) Diferencias significativas encontradas en el grupo control y en los dos grupos experimentales. C) Comparativas de los tres grupos experimentales (Graph Pad InStat.).

A)

	Group A	Group B	Group C
Col. title	CONTROL	5%	10%
Mean	4812.6897	2799.3005	3484.3303
Standard deviation (SD)	211.72	428.80	822.95
Sample size (N)	10	10	10
Std. error of mean(SEM)	66.953	135.60	260.24
Lower 95% conf. limit	4661.2	2492.6	2895.7
Upper 95% conf. limit	4964.1	3106.0	4073.0
Minimum	4605.5	1965.2	2592.8
Median (50th percentile)	4722.5	2905.6	3414.3
Maximum	5162.2	3399.1	5504.7
Normality test KS	0.2580	0.2426	0.2303
Normality test P value	>0.10	>0.10	>0.10
Passed normality test?	Yes	Yes	Yes

B)

Comparison	Difference	q	P value
CONTROL vs 5%	2013.4	8.193 **	P<0.01
CONTROL vs 10%	1328.4	5.405 **	P<0.01
	Mean	Lower	Upper
	Difference	Difference	95% CI
CONTROL - 5%	2013.4	1439.5	2587.2
CONTROL - 10%	1328.4	754.52	1902.2



3.3. RESULTADOS NEU.

Los resultados obtenidos del grupo experimental incubados con el anticuerpo anti-EGF (A) mostró un aumento significativo ($P < 0.01$) en el grupo tratado con solventes al 5% comparado con los grupos control y con el grupo tratado con de solventes orgánicos al 10%, por lo tanto los efectos de los solventes etilen glicol y metil celosolve se encuentran presentes desde las dosis de 5% donde hay un daño a nivel estructural y en dosis de 10% además de daño

estructural existe daño a nivel molecular al estar dañados los receptores como los ligandos. (Fig.56, 57, 58)

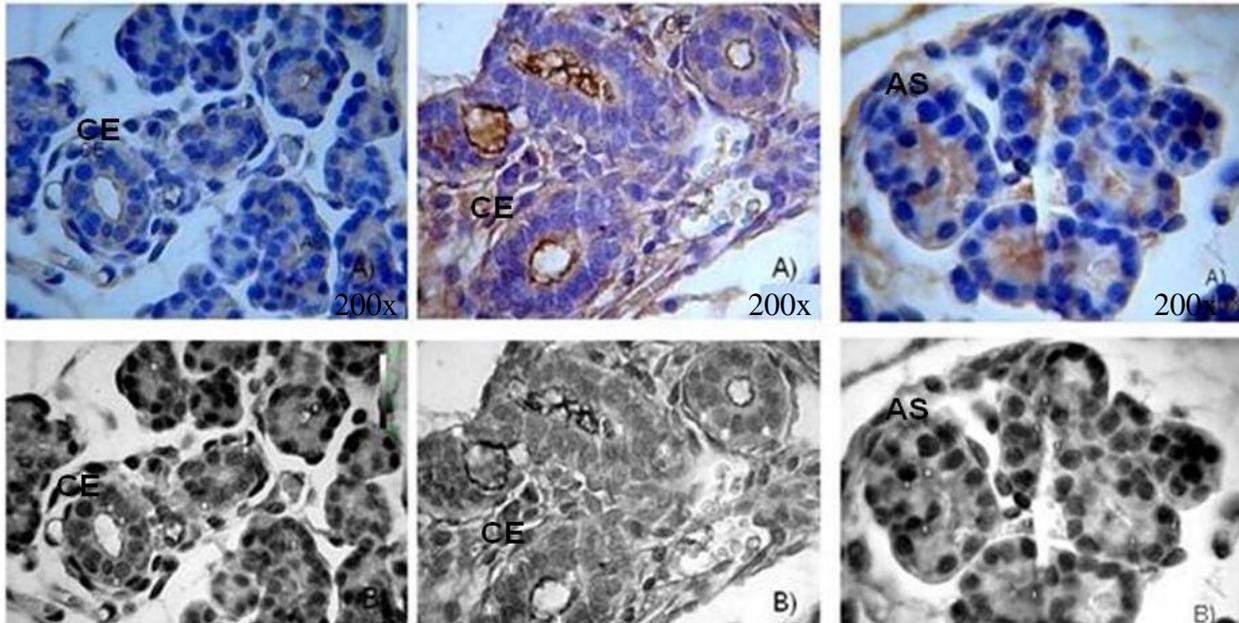


Fig.56,

Fig57,

Fig.58

Fig.56. A) Conducto estriado (CE), con presencia de EGF distribuido de forma homogénea en el citoplasma. B) Conducto estriado en mapa de 8 bits para el análisis de imagen.

Fig.57. A) Conducto estriado (CE), con presencia de inmunomarcaje localizado en el citoplasma y en la periferia de los conductos. B) Conductos estriados en mapa de 8 bits.

Fig. 58) Acinos serosos con presencia de inmunomarcaje localizado en el citoplasma de forma homogénea. B) Mapa de 8 bits para análisis de imagen.

Los datos obtenidos de la medición de la densidad óptica en píxeles, en el inmunomarcaje realizado en 10 áreas obtenidas al azar de 3 diferentes campos de 400X de cada corte histológico de las laminillas mostraron un aumento en la presencia de NEU en el grupo de 5% experimental de las ratas que fueron tratadas con los solventes orgánicos, en comparación con los grupos control y con el cual hubo una disminución en el 10.

4. Resumen de resultados.

Con los resultados obtenidos de los grupos experimentales se puede observar que el grupo tratado con solventes orgánicos al 5%, para EGF mostró una diferencia significativa de $*p < 0.05\%$ en el aumento del Factor de Crecimiento, mientras que el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico presentó una disminución cuando las dosis alcanzaban el 5% y el 10% teniendo su nivel más bajo con las dosis de 5%. Con respecto a NEU hubo un aumento significativo con respecto al grupo control y una disminución, en el grupo experimental para 10% por debajo de los parámetros mostrados en el control. Esto indica que el daño ocasionado por los solventes es de tipo estructural en las dosis del 5% ya que se presenta primero a nivel celular y que el aumento en las dosis de 5% en los factores de crecimiento y la disminución en la dosis de 5% para el receptor es por el daño estructural, también se presenta a nivel molecular dañando estructuras bioquímicas como lo son factores de crecimiento, los daños celulares ocasionados en dosis bajas durante la administración del Etilén Glicol y Metil Celosolve son de tipo acumulativas y el tipo de daño que estos agentes ocasionan es de tipo irreversible (Fig 60).



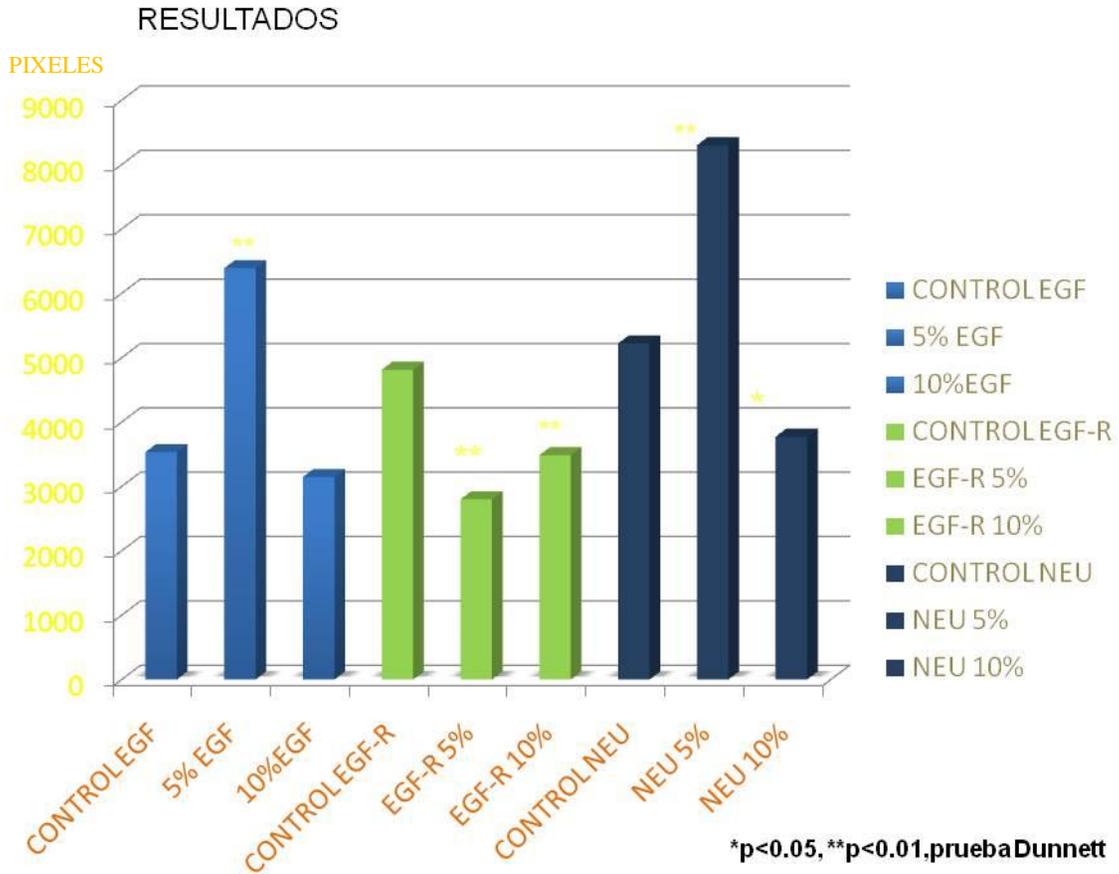


Fig 60) Análisis estadístico de las diferencias encontradas entre los grupos control y grupos experimentales.

VI. DISCUSIÓN.

Las glándulas salivales son un tejido importante para la salud y buen funcionamiento del aparato gastrointestinal ya que la secreción vertida por ellas contiene diferentes proteínas y sustancias importantes en el desarrollo y reparación de tejidos de la cavidad bucal, entre estas proteínas encontramos los factores de crecimiento, los cuales son importantes mitógenos que actúan durante el ciclo celular ocasionando la proliferación, apoptosis y reparación de tejidos⁸. Cuando un agente teratogénico actúa en el desarrollo de los tejidos se producen cambios a nivel estructural en órganos como, riñones, hígado, dientes entre otros y en las glándulas salivales donde encontramos alteraciones que se manifiestan como pérdida de la morfología celular^{4,5,9} tanto en los acinos mucosos, serosos y como en el desarrollo de los conductos estriados e intercalares, donde se encontró una aparente disminución de los acinos, y conductos glandulares.

Se ha demostrado que los solventes orgánicos etilen glicol y metil celosolve se encuentran en productos de uso cotidiano como tintes de cabello, anticongelantes, refrigerantes y en la elaboración de pistas de hielo en donde se utiliza de manera indiscriminada siendo manejados sin protecciones físicas por los empleados y desechados al medio ambiente^{25,26}. Cuando estas sustancias se encuentran en contacto con el hombre pueden llegar a afectar estructuras importantes que intervienen en el metabolismo de proteínas como el factor de crecimiento epidérmico del factor de crecimiento nervioso o de sus receptores los cuales son necesarios para el desarrollo normal de las glándulas salivales y de otros tejidos que utilizan estos factores para su funcionamiento^{1,2}. En el estudio encontramos que los niveles de EGF tomados por la densidad óptica se elevan durante concentraciones al 5% y en concentraciones de 10% encontramos una disminución de la densidad óptica con respecto al control indicando que el EGF se ve afectado cuando las



concentraciones de los solventes aumentan, esto podría sugerir que los tejidos encargados de el metabolismo de estas proteínas se encuentran dañados y por lo tanto no son reconocidos por las técnicas de inmunomarcaje y por lo tanto no son expresadas de manera visible, lo que se comprueba cuando se hace el inmunomarcaje de los receptores de este factor el cual se ve disminuido cuando la concentración del 5% es aplicada y que hay un aumento del inmunomarcaje cuando la concentración es del 10% lo que podría sugerir que las concentraciones afectan de forma directa a los receptores de membrana desde los niveles mas bajos de exposición a estos glicoles, durante las pruebas de inmunomarcaje de NEU encontramos un aumento de este factor y que se ve disminuido con las dosis más altas sugiriendo que los factores de crecimiento no son reconocidos por los receptores de membrana necesarios para la inducción del ciclo celular, apoptosis o regeneración de tejidos^{17,18,19}.

Esto se comprueba cuando con las técnicas de tinción de rutina encontramos cambios de tipo estructural manifestados en la morfología celular donde en las concentraciones de 5% sobre los acinos serosos mucosos y mixtos cuasan aparente disminución, y en concentraciones de el 10% la estructura celular se pierde en todos los tipos celulares con falta de desarrollo de conductos estriados e intercalares. Cuando las concentraciones del 15% son administradas los fetos no son viables y el desarrollo de los tejidos glandulares es nulo, siendo imposible determinar en tejidos con estas características los niveles de EGF, EGF-r o NEU.



VII. CONCLUSIONES.

1. Los solventes Etilén Glicol y Metil Celosolve probado en diferentes concentraciones al 5, 10 y 15 %, y administrados por vía oral a los modelos de estudio, afectan la presencia del EGF, EGF-R y NEU en glándulas salivales mayores.
2. La administración vía oral de los solventes orgánicos al 5% en ratas presentaron mayor expresión de EGF con diferencia significativa de $p < 0.01^{**}$ que con el solvente al 10 % en donde se encontró disminución de su expresión con diferencias significativas $p < 0.05$ * con relación al grupo control.
3. La administración de 5% de solventes orgánicos vía oral en modelos experimentales de estudio mostraron una disminución en la presencia de EGF-R con una diferencia significativa de $p < 0.01$ a diferencia de las concentraciones de 10% en donde encontramos un aumento en el inmunomarcaje con diferencias significativas de $p < 0.01$. Por lo tanto EGF-R mostró daño estructural al ser tratado con los solventes orgánicos a diferentes concentraciones.
4. Durante la administración vía oral de los solventes orgánicos al 5% en los modelos de estudio se encontró mayor expresión del inmunomarcaje para NEU con una diferencia significativa de $p < 0.01^{**}$, mientras que al 10% se encontró disminución en el inmunomarcaje con diferencias significativas $p < 0.05$ * comparado con el al grupo control, concluyendo que el efecto observado a mayores concentraciones de solventes orgánicos afectan la presencia de los factores de crecimiento, afectando así la función normal de los tejidos.



VIII. REFERENCIAS.

1. Saavedra-Ontiveros D, Arteaga- Martínez M. Teratogenesis caused by industrial organic solvent occupational exposure. Salud Pública Mex 1996;38:3-12.
2. Martínez HL- Efectos de los solventes orgánicos en el cartílago, hueso, músculo esquelético, hígado y riñón en un modelos experimental. México, D.F. tesis. F.O.-UNAM.,2001.
3. Noya PT. Análisis morfométrico de estructuras faciales en fetos de ratas en el síndrome de éteres de glicol (Síndrome de Saavedra). México, D.F. Tesis.F.O.-UNAM.,2003.
4. Morales SI. Efectos teratogénicos de los solventes orgánicos etilén glicol y metil celosolve en la odontogenesis empleando un modelo experimental. México,D.F. Tesis.F.O.-UNAM.,2006.
5. Piedras CS.Manifestaciones clínicas del síndrome de etilén glicol y metil celosolve (Síndrome de Saavedra). México,D.F. Tesis.F.O.-UNAM.,2003.
6. Vega RII. Estudio comparativo de las diferencias craneofaciales entre el síndrome de éteres del glicol y el síndrome del feto alcoholizado. México,D.F. Tesis.F.O.- U.N.A.M.,2003.
7. Velasco 2003. UV.Cambios citomorfológicos en los tejidos de la lengua en el síndrome de etéres del glicol.México,D.F. Tesis.F.O.-U.N.A.M.,.
8. Gómez F.M. 2002 Histología y embriología bucodental.España.Edit. Panamericana PP154-187.
9. Constantino CA. 2008. Estudio estructural y ultraestructural del epitelio interno en el germen dental de ratas expuestas a etilén glicol y metil celosolve. Tesis. Facultad de Odontología.- U.N.A.M.,.
- 10.Rios MA. 2007. Secuencia del desarrollo de glándulas salivales mayores en un modelo experimental. Tesis. F.O.- U.N.A.M.,.



11. Sadler, T. W. Langman 2007: Embriología médica con orientación clínica 10° ed. Panamericana .pp 230-245 .
12. B.K.B. Berkovitz.G.R.Holland.BJ.Moxham 1995.. Anatomía Oral. Histología y Embriología. 2ª ed. Edit. Mosby/Doyma libros. Madrid,
13. Velayos JL; Santana Díaz, H Anatomía de la cabeza. Madrid España. Médica 3ª edición Panamericana.2001..
14. Vazquez RL. Efectos de los solventes orgánicos etilén glicol y metil celosolve en glándulas salivales de un modelos experimental. México, D.F. Tesis. F.O.-UNAM.,2003.
15. Garret, J.R. Emmelin,N. 1979. Activities of salivary myoepithelial cells. A review. Medical Biology. 57, 1-28.
16. Mandel, I.D., Wotman,. 1976. The salivary secretions in health and disease. Oral surg Rev. 8, 25-47.
17. Cohen, R.E;Aguirre, A.; Neiders, M.E.; Levine, M.J.;Jones, P.C.; Reddy,M.S. and Haar, J.G. (1990). Immunohistochemistry of high molecular- weight human salivary mucin. Arch Oral Biol. 35 (2), 127-136.
18. Palmer, R.M 1198. The identification of myoepithelial cells in human salivary glands. A review and comparison of light microscopical method. J Oral Pathol med. 15, 221-229.
19. Mandel, I.D. 1987. The functions of saliva. J Dent Res. 66 (spec. iss.) 623-627.
20. Martinez-Madrigal, F. Micheau, C. 1989. Histology of the major glands. Am j Surg Pathol 13 (10), 879-899.
21. The Laboratory Rat volume I 1980. Edit. American College of Laboratory Animal Medicine Series. San Diego, New York.
22. Cohen R, Noble M. Neiders M, and Comeau R 1995. Mononuclear cells in salivary glands of normal and isoproterenol-Treated Rats. Archs Oral Biol. 40. pp. 1015-1021,.



23. Ten Cate, A.R. (1989). Oral Histology. Development, Structure and Function. The Salivary Glands. C.V. Mosby Company. 3rd Edition 452pp.
24. Baker H J, Rusell L J, Weisbroth S H, The Laboratory Rat Biology and Diseases. Edit. American College of Laboratory Animal Medicine Series, San Diego. 1980.
25. Thomas JA, DeSesson JM 2004. NTP-CERHR. Expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of ethylene glycol. *Reprod Toxicol*; 18:457-532.
26. Encyclopedia de la salud y seguridad en el trabajo. Disponible en http://www.mtas.es/insht/EncOIT/pdf/tomo4/104_06.pdf.
27. Carney EW. An 1994 Integrated perspective on the developmental toxicity of ethylene glycol, *reprod toxicol*; 8:99-113.
28. Sigma-Aldrich 2006. Hoja de datos de seguridad. 293237 ethylen glycol, 99+% version 1.10.
29. Sigma-Aldrich. 2006 Hoja de datos de seguridad. 270482 2 methoxyethanol, 99.9 % version 1.8,
30. Church AS ,Wittin MD 1997. Laboratory Testing in Ethanol, Methanol, Ethylene Glycol and isopropanol toxicities. *J Emerg Med*; 15: 687-92
31. Burkhart K. 1997. Methanol and ethylene glycol toxicity. *J oxicol Clin Toxicol*; 35:149-50.
32. Davis DP, Bramwell KJ, Hamilton RS, Williams SR. 1997. Ethylene glycol poisoning: case report of a record-high level and a review. *Jemerg Med*; 15:653-67.
33. Browning RG, Curry SC: Clinical toxicology of ethylene glycol monoalkyl ethers. *Hum exp Toxicol* 1994;13:325-35.



34. TOXICOLOGICAL SCIENCES 2004 doi:10.1093/toxsci/kfh178Advance
Access publication May 24.
35. Burd L. Diagnosis of FAS: 2003 a Comparison of the fetal alcohol syndrome diagnostic checklist and the institute of medicine criteria for fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol Teratol*.
36. Casci T; Freeman M. 1999. Control of EGF Receptor Signalling: lessons from fruitflies. *Cancer Metastasis Review*, 18 (2): 181-201.
37. Hide G; Gray A; Harrison CM; Tait 1989 A. Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Aug, 36 (1): 51-9.
38. Borst P; Fairlamb AH 1998. Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. *Annual Review of Microbiology*, 52: 745-78.
39. Muskavitch MA; Hoffmann FM 1990. Homologs of vertebrate growth factors in *Drosophila melanogaster* and other invertebrates. *Current Topics in Developmental Biology*, 24: 289-328.
40. Alroy I; Yarden Y 1997. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *Federation European Biochemical Societies Letters*, 410 (1): 83-6.
41. Soltoff SP 1998. Related adhesion focal tyrosine kinase and the epidermal growth factor receptor mediate the stimulation of mitogen-activated protein kinase by the G-protein-coupled P2Y2 receptor: phorbol ester or [Ca²⁺]_i elevation can substitute for receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (36): 23110-7.
42. Carpenter G; Cohen S. 1979. Epidermal growth factor. *Annual Review of Biochemistry*, 48: 193-216.
43. Massagué J. Transforming growth factor- α . A model for membrane-anchored growth factors. *J of Biol Chem*, 1990 265 (35): 21393-6.



44. Massagué J; Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Ann Rev of Biochem*, 1993, 62: 515-41.
45. Groenen LC; Nice EC; Burgess AW 1994. Structure-function relationships for the EGF/TGF- α family of mitogens. *Growth Factors*, 11 (4): 235-57.
46. Boonstra J; Rijken P; Humbel B; Cremers F; Verkleij A; Van Bergen en Henegouwen P 1995. The epidermal growth factor. *Cell Biology*, 19 (5): 413-30.
47. Chang H; Riese DJ; Gilbert W; Stern DF; McMahan UJ. 1997 Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature*, 387 (6632): 509-12.
48. Carraway KL; Weber JL; Unger MJ; Ledesma J; Yu N; Gassmann M; Lai C. 1997 Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature*, 387 (6632): 512-6.
49. Gray A; Dull TJ; Ullrich A. 1983 Nucleotide sequence of de epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000 molecular weight protein precursor. *Nature*, 303 (5919): 722-5.
50. Bell GI; Fong NM; Siempien MM; Wormsted MA; Caput D; Ku LL; Urdea MS; Rall LB; Sanchez-Pescador R. 1986 Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression *in vitro* and gene organization. *Nucleic Acids Research*, 14 (21): 8427-46.
51. Massagué J; Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annual Review of Biochemistry*, 1993, 62: 515-41.
52. Boonstra J; Rijken P; Humbel B; Cremers F; Verkleij A; Van Bergen en Henegouwen P 1995. The epidermal growth factor. *Cell Biology International*, 19 (5): 413-30.
53. Taylor JM; Mitchell WM; Cohen S. 1972 Epidermal growth factor. Physical and chemical properties. *J of Biol Chem*, 247 (18): 5928-34.
54. Schlessinger J. 1988 Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends in Bio Science*, 13 (11): 443-7.



55. Fiddes RJ; Campbell DH; Janes PW; Sivertsen SP; Sasaki H; Wallasch C; Daly RJ. 1998 Analysis of Grb7 recruitment by heregulin-activated erbB receptors reveals a novel target selectivity for erbB3. *J of Biol Chem*, 273 (13): 7717-24.
56. Ullrich A; Coussens L; Hayflick JS; Dull TJ; Gray A; Tam AW; Lee J; Yarden Y; Libermann TA; Schlessinger J; Downward J; Mayes ELV; Whittle N; Waterfield MD; Seeburg PH 1984. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 309 (5967): 418-25.
57. Weiss A; Schlessinger J. 1998 Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, 94 (3): 277-80.
58. http://bvs.sld.cu/revistas/med/vol43_1_04/med10104.pdf
59. Pérez R, Lage A. Los factores de crecimiento y sus relaciones con la transformación maligna. *Interf y Biotecn* 1986;13 (3):179-209.
60. Shields R. Growth factors for tumors. *Nature* 1978;267:670-1.
61. Scott J, Urdea M, Quiroga M, Sánchez-Pescador R, Fong N, Selby M et al. Structure of a mouse
62. submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science* 1983;221:236-40.
63. Gray A, Dull TJ, Urich A 1983. Nucleotide sequence of EGF cDNA predicts a 128 000-molecular weight protein precursor. *Nature*;303:722-5.
64. Bell GI, Fong NM, Wornstead MA, Coput DF, Ku L, Urden MS et al. 1986 Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acid Res*;14:8427-46.



65. Mroczkowski B, Ball R. 1990 EGF: biology and properties of its gene and protein precursor. En: Habenicht A (ed). Growth Factors, Differentiation Factors and Cytokine. New York: Springer-Verlag;.p.18-30.
66. Bringman TS 1987, Linndquist PB, Derynck R. Different TGF- α species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor. Cell;48:429-40.
67. Barchman R, Lindquist PB, Nagashima M, Kohr W, Lipan T, Napier M et al. 1989;Transmembrane TGF- α precursors activate EGF/TGF α receptors. Cells 56:691-700.
68. Anklesaria P, Teixido J, Laiho M, Pierce JH, Greenberger JS, Massague J. 1990 Cell-Cell adhesion mediated by binding membrane- anchored transforming growth factor α to EGF redeptors promotes cell proliferation. Proc Nalt Acad Sci USA;87:3289-93.
69. Rettenmier CW. 1989 Biosynthesis of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1): defferencial processing of CSF-1 precursors suggests alternative mechanisms for stimulating CSF-1 receptors. Curr Top Microbio Immunol;149:129-41.
70. Nexo E, Jorgensen PE, Hansen MR. 1992 Human epidermal growth factor on molecular forms present in urine and blood. Regulat Peptides; 42: 75-84.
71. Mrczkowski B, Reich M. 1993 Identification of biologically active epidermal growth factor precursor in human fluids and secretions. Endocrinology; 132:417-25.
72. Mrczkowski B, Reich M, Chen K, Bell GI, Cohen S 1989. Recombinan Human epidermal growth factor precursor is a glycosilated membrane protein with biological activity. Mol Cell Biol; 9:2771-8.
73. Brown CF, Teng CT, Pentecost BT, Di Augustine RP 1989. Epidermal growth factor precursor in mouse lactating mammary gland alveolar cells. Mol Endocrinol ;95:1077-83.



74. Schaudies RP, Grimes J, Wray HL, Koldovsky O.1990. Identification and characterization of multiple forms of biological active epidermal growth factor in rat milk. *Am J Physiol* ;259: G1056- G1061.
75. Heldi CH 1991. SH2 domains: elements that control protein interactions during signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*,16 (12): 450-2.
76. Margolis; B. 1992. Proteins with SH2 domains: transducers in the tyrosine kinase signaling pathway. *Cell Growth and Differentiation*,3 (1): 73-80.
77. Van der Geer P; Pawson T. 1995. The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 20 (7): 277-80.
78. Wood KW; Sarnecki C; Roberts TM; Blenis J.1992 .Ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell*, 68 (6): 1041-50.
79. Stein D; Wu J; Fuqua SA; Roonprapunt C; Yajnik V; D'Eustachio P; Moskow JJ; Buchberg AM; Osborne CK; Margolis B. 1994. The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *European Molecular Biology Organization Journal*,13 (6): 1331-40.
80. <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeCinco/Articulos/BiologiaCelular.htm>
81. Hashimoto A; Kurosaki M; Gotoh N; Shibuya M; Kurosaki T. 1999. Shc regulates epidermal growth factor-induced activation of the JNK signaling pathway. *J of Biol Chem*, 274 (29): 20139-43.
82. Chin YE; Kitagawa M; Su WC; You ZH; Iwamoto Y; Fu XY. 1996 Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 mediated by STAT1.,272: 719-22.
83. Chin YE; Kitagawa M; Kuida K; Flavell RA; Fu XY. 1997. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol and Cell Biol*, 17: 5328-37.



INDICE DE FIGURAS.

- Fig. 1. Imagen de un niño con síndrome de Saavedra.
- Fig. 2. Esquema de la formación del brote.
- Fig 3. Esquema en el que se muestra la formación y crecimiento del cordón celular.
- Fig 4. Esquema en el que se observa el inicio de la bifurcación de la glándula.
- Fig 5. Esquema en el que se observa la formación de lóbulos.
- Fig 6. Esquema que demuestra el proceso de formación de la luz de los conductos y la formación de los lóbulos.
- Fig 7. Proceso de citodiferenciación.
- Fig. 8 Fotomicrografía con técnica de PAS de un acino seroso.
- Fig. 9. Fotomicrografía en técnica de PAS de acinos mucosos.
- Fig 10. Fotomicrografía en técnica de H&E.
- Fig 11. Corte histológico con técnica de H&E de glándula salival.
- Fig 12. Conducto estriado con técnica H&E.
- Fig 13. Formula de Etilén Glicol.
- Fig 14. Formula de Metil celosolve.
- Fig 15. Vía de señalización de EGF.
- Fig 16. Esquema de molécula EGF humano.
- Fig.17. Esquema de molécula activa de EGFR humano.
- Fig 18. Diferentes modos de acción de los ligandos de receptores ErbB.
- Fig 19. Regulación del ciclo de Ras por el EGFR.
- Fig 20. Metodología.
- Fig 21. Regulacion del ciclo de Ras por el EGFR.
- Fig 22. Sacrificio y obtención de muestras.
- Fig 23. Calibración de los 18 tonos de gris para la obtención de oscuridad y claridad del inmunomarcaje.
- Fig 24. Apariencia macroscópica normal de la glándula salival mayor de un feto de 19 días de gestación.
- Fig 25. Imagen macroscópica de los fetos del grupo control con características físicas normales.
- Fig 26. Características físicas de los grupos experimentales en las diferentes concentraciones.
- Fig. 27. Corte histológico a 200X, teñido con H y E.
- Fig 28. Corte histológico de glándula parótida teñida con PAS.
- Fig 29. Glándula submandibular con presencia de mucina.
- Fig. 30. Inmunohistoquímica con EGF en glándulas.
- Fig 31. inmunohistoquímica con EGF-R en glándula parótida
- Fig 32. La respuesta inmunohistoquímica en la glándula submaxilar con NEU.
- Fig 33. Corte histológico de glándula parótida teñida con Hematoxilina y Eosina.

Fig 34. En el grupo experimental de 5% de solventes en glándula.
Fig 35. En glándula submandibular.
Fig 36. Glándula submaxilar en el grupo experimental con administración de la mezcla acuosa al 5%.
Fig 37. Corte histológico con inmunomarcaje de EGF del grupo experimental al 5%.
Fig. 38. Inmunoreacción moderada a EGF-R.
Fig. 39. La glándula sublingual con NEU.
Fig 40. Corte histológico de glándula sublingual con tinción en H&E.
Fig 41. Imagen histológica de glándula Parótida.
Fig 42. Imagen histológica de glándula submandibular.
Fig 43. Imagen de inmunohistoquímica con NEU.
Fig.44.Grupo control con inmunomarcaje para EGF.
Fig.45.Datos obtenidos de las 10 áreas tomadas al azar para el análisis de pixeles de los para su posterior análisis de datos en una hoja de cálculo (Graph pad InStat).
Fig 46. Conducto estriado.
Fig 47.Datos obtenidos en medida de pixeles para elaboración de base de datos y posterior comparación con grupos experimentales.
Fig 48. Control EGF.
Fig 49. A grupo experimental de 5%.
Fig 50. rupo Experimental al 10%.
Fig. 51. omparación estadística de los tres grupos experimentales.
Fig 52. Inmunohistoquímica con el EGF-R del grupo control.
Fig 53. Inmunohistoquímica del grupo 5%con EGF-R.
Fig 54. Inmunomarcaje del grupo 10% del EGF-R.
Fig 55. Comparacion estadística del grupo control y de los dos grupos experimentales con inmunomarcaje para EGF-R.
Fig 56.Conducto estriado.
Fig 57.Conducto estriado.
Fig 58.Acinos serosos.
Fig 59. A) comparación estadística del grupo control y los dos grupos experimentales con Neu.
Fig 60) análisis estadístico de las diferencias encentradas entre los grupos control y grupos experimentales.

