

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Odontologia**

**SEMINARIO DE TITULACION  
ODONTOPEDIATRIA**

**T E S I N A**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**CIRUJANO DENTISTA**  
**P r e s e n t a**  
**MA. ELIZABETH MORENO FLORES**

**Coordinadora: C. D. ANGELES L. MONDRAGON DE V.**  
**Asesora: IRMA J. CELIS BRAVO**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**MEXICO, D. F.**

**NOVIEMBRE 1993**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

# I N D I C E

No. de Artículo	Nombre del Artículo	Página
1	Excreción Salival de Li88-----	1
2	Análisis Funcional.-----	7
3	Activación de los Canales de Ca Sensitivos a Dihidropiridina de las Glándulas salivales parótidas por el Factor de Crecimiento Epidérmico.-----	13
4	Comparación de las concentraciones elementales en las células de las glándulas salivales labiales.-----	25
5	Inmunoreactividad de la Metionina similar a Encefalina Substancia similar P y la similar a la B-endorcina.-----	37
	Bibliografía -----	45

## INTRODUCCION

Este estudio determinará el patrón de excreción de Li en las parótidas humanas y la secreción de la submaxilar así como las concentraciones salivales sericas que vienen siendo más elevadas que las de Li, las sales de Li nos pueden servir para tratamientos de sicos maniaco depresiva.

Los estudios se harán con 5 sujetos saludables entre los 24 y 42 años durante varios días.

## PRIMER ARTICULO

### EXCRECION SALIVAL DE Li

En las secreciones de las parótidas y submaxilares, excreción salival de litio y secreciones parótidas y sus maxilares humanos, las concentraciones de litio después de la administración oral en las salivas parótidas y sus maxilares humanos así como en suero fué determinada que las concentraciones salivales fueron varias veces más elevadas que las séricas. El litio en la saliva no estimulada fue directamente proporcional a la concentración sérica, el litio en las parótidas estimuladas de la saliva tendió a ser una función negativa del rango fluctuante, las sales de litio han sido usadas desde hace más de 20 años en el tratamiento de sicosis maniaco-depresiva después de la administración oral se cree que el litio se distribuye en los fluidos corporales y alrededor del 90% de este ión es excretado en la orina.

En las 48 horas siguientes a una dosis única el litio, se ha demostrado que afecta el intercambio de sodio y potasio a nivel de la célula membranal y ha sido usado como un sustituto del sodio en neurofisiología, la excreción salival humana de litio no ha sido investigada, el propósito de este estudio fué determinar el patrón de excreción de litio en las parótidas humanas y en la secreción también submaxilar, el litio normalmente no se presenta en cantidades detectables en la sangre o saliva y debe ser administrado oralmente, la dosis diaria terapéutica es de 0.6 a 1.2 gr. en 3 o 4 dosis divididas.

### MATERIALES Y METODOS

El carbonato de litio fué preparado en dosis de 300 mg. en cápsulas de gelatina y administrados a 5 sujetos saludables entre 24 y 42 años de edad de acuerdo al siguiente programa: el primer

día 3 cápsulas fueron ingeridas a intervalos de 3 a 4 horas, en el segundo, tercero, y cuarto días, 3 cápsulas fueron administradas a intervalos de 4 horas. el quinto día una cápsula fue ingerida 2 horas antes de coleccionar la muestra.

La saliva de las parótidas no estimuladas fue colectada después de una muestra de control de 0.5 ml en unos tubos de polietileno para centrifugar el volumen de la muestra de 0.4 ml., la colecta se hizo a intervalos de una hora en el primer día previa la investigación de la primera cápsula.

El segundo día y a 2 y 10 horas después de la ingesta de la única cápsula en el quinto día fueron también usados 2 estímulos para descubrir o analizar las secreciones de las parótidas una pastilla de dulce para una menor estimulación.

Del rango de flujo y una pastilla amarga para los rangos altos de flujo a los sujetos se les permitió por un período de 5 min. acomodarse o acostumbrarse a cada estímulo antes de empezar las colectas de las muestras. La saliva de las parótidas estimuladas fue colectada en el primero y quinto día ambos en tubos de vidrio para centrifugar el volumen de la muestra fue 1.0 ml y en tubos de polietileno el volumen de esa muestra fue de 0.4 ml. La saliva de la submaxilar no estimulada fue colectada solo a partir de 2 sujetos para las medias de una prueba Block-Brottman modificada a intervalos de una hora durante 8 horas, durante el primer día de la administración de litio las muestras de saliva fueron clasificadas con H-CL al 10N y luego centrifugadas para remover las proteínas precipitadas la sangre fue obtenida por punción de una vena inicialmente y 2 horas después de cada una de las primeras 2 dosis el primer día antes de la ingesta de la primera cápsula. En el segundo día y a 2 y 10 horas después de la ingesta de la única cápsula el quinto día las determinaciones de Li, Na y K, se hicieron mediante un espectrofotómetro de absorción atómica.

## RESULTADOS

El Li. en las parótidas no estimuladas una hora después de la ingestión del Li, la concentración de este en las parótidas frecuentemente no fue detectable después de 2 o 3 horas, el Li de las parótidas fué de 2 a 1 a 3 veces la concentración sérica a las 5 horas, esto es 2 horas después de la segunda dosis de 300 mg. las concentraciones de Li de las parótidas siempre fue 2 a 5 veces mayor que las concentraciones séricas, las concentraciones fueron tan altas como 17.75 ppm. en un sujeto simultáneamente los niveles séricos fueron raramente mayores de 3 ppm. Temprano durante cinco días de la terapia continua de Li. El Li de las parotidas no estimuladas observó una concentración usualmente entre 12 y 14 ppm, al final del quinto día 10 horas después de la última dosis de carbonato de litio, la concentración fué sustancialmente reducida como se ve en la figura 1, generalmente existió un alto grado de correlación entre las concentraciones de Li en la saliva y las cantidades en el suero.

TABLA 1: Los sujetos 3 y 5 exhibieron frecuentes variaciones en los rangos de flujo y no mostraron una relación cercana a las concentraciones séricas como lo hicieron aquellos con un rango constante relativo al flujo, esas variaciones podrían ser considerables si el rango de flujo fuera normalizado.

Las concentraciones de Li aparentaron estar inversamente relacionadas al rango del flujo de la saliva las concentraciones de Na y K se encontraban dentro del rango normal para cada individuo.

El Li de la saliva de las submaxilares no estimuladas

La saliva submaxilar estimulada exhibió mayores concentraciones de Li que la saliva de las parótidas no estimuladas pero siempre fué proporcional a los cambios en las concentraciones de Li serico las concentraciones Na y K estuvieron dentro del rango normal para cada individuo.

## LITIO SERICO

Los niveles más altos de Li serico fueron observados entre las 2 horas después de cada dosis en el primer día la sangre obtenida antes de la dosis inicial en el segundo día tuvo una concentración de Li necesariamente reducida ya que el sujeto no había ingerido nada de Li aproximadamente desde hacia 16 horas la sangre colectada 2 horas después de la ingesta de la única dosis el quinto día siempre presentó un pico en la concentración serica del Li de todo el experimento por arriba de 5.75 ppm. los niveles sanguíneos 8 horas después fueron reducidas a un nivel de 2.52 ppm.

### FIGURA 1

Litio en la saliva de las parótidas estimuladas. La concentración de Li en las parótidas estimuladas no fue claramente relacionado al rango de flujo en ningún sujeto. En 2 pruebas los sujetos exhibieron un incremento en las concentraciones salivales de Li que incrementaban con el rango de flujo 4 veces demostraron un decremento y en 8 ocasiones mostraron tanto una relación positiva como una relación negativa entre las concentraciones y el rango de flujo en muestras sucesivas.

### FIGURA 2

Las concentraciones de Li fueron de 2 a 3 veces el nivel de Li serico en todos los rangos de flujo un intento por delinear posteriormente la relación entre el rango del flujo y las concentraciones de Li. La saliva de las parótidas estimuladas se colectó 2 gotas a cada tinta durante varios rangos de flujo después de las correcciones de Li para cada muestra fueron determinadas y comparadas con el rango del flujo de la saliva.

### FIGURA 3

En una serie de 3 experimentos se encontró una tendencia a observar una relación inversa entre el rango del flujo y las concentraciones de Li coeficientes de correlación personiana para concentraciones de Li contra el rango de flujo fueron de  $-0.6872$  y  $-0.9692$ .



## DISCUSION

La concentración de Li de la saliva de las parótidas no estimuladas estuvo cercanamente relacionada a las concentraciones de Li sericas del primer día resultados similares en el quinto día indican que el Li no fue almacenado y posteriormente fue secretado por las glándulas parótidas. El Li salival de las parótidas estimuladas fue altamente sensitivo a los cambios incrementados por el rango del flujo, el uso de mayores tamaños de muestra llevo a un patrón no interpretable de excreción cuando la muestra reducía la relación negativa con respecto al rango de flujo se hizo más aparente aunque esto no puede ser confirmado de manera incuestionable aún al reducir la muestra no se puede eliminar la variabilidad dentro de las muestras en el rango del flujo los cuales reducen indebidamente la correlación con la concentración de Li una relación inversa entre la concentración y el rango del flujo al rango del flujo del fluido de las parótidas es común a muchos componentes salivales tales como el ácido úrico, la urea, tiourea, el magnesio, potasio y el fosfato; únicamente el potasio y el fosfato son característicamente secretadas en concentraciones muchas veces mayor que a nivel serico, como se sabe la influencias del Li sobre el balance sodio potasio, es probable que éste sea excretado en la saliva tal y como si fuera potasio más que como si fuera fosfato el litio y el potasio estas son secretadas en concentraciones 2 o 4 veces que la concentración serica y se encuentran relacionadas negativamente al rango de flujo cuando el tamaño de la muestra es pequeña sin embargo de manera distintiva con respecto al potasio el Li no es almacenado en las glándulas, ni muestra una relación estable al rango de flujo cuando el tamaño de la muestra se incrementa; estos resultados van de acuerdo con los que fueron deportados por Burgen concernientes a la secreción de Li por las glándulas submaxilares caninas.

Investigaciones adicionales sobre los mecanismos de excreción salival de Li y una comparación de estos mecanismos con los implicados en la secreción del sodio y el potasio ayudarían o darían información válida o concerniente a la acción general del

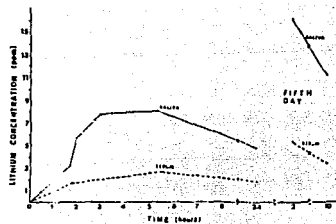


FIG 1.—Lithium concentration of unstimulated parotid saliva and serum of one subject during the first 24 hours and on the 5th day.

TABLE I  
CORRELATION BETWEEN LI CONCENTRATION IN  
UNSTIMULATED PAROTID SALIVA AND IN  
SERUM OVER FIVE DAYS

Subject	Saliva Concentration (ppm)	Serum Concentration (ppm)	r <sup>2</sup>
1	0.64-12.8	0.88-4.74	0.9975
2	5.00-14.1	3.28-5.75	0.9055
3	3.00-11.10	1.84-3.16	0.8501
4	3.20-16.00	1.68-5.32	0.9819
5	2.12-17.76	0.72-4.44	0.8497

\*  $P < 0.001$  for all correlations.

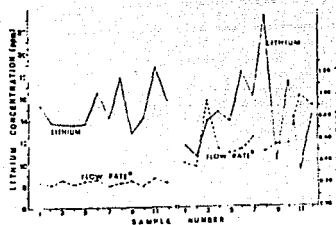


FIG 2.—Concentration of lithium and flow rate of stimulated parotid saliva (two collections from the same subject) a, low flow rate stimulus; b, high flow rate stimulus.

#### 548 SPRING AND SPIRITS

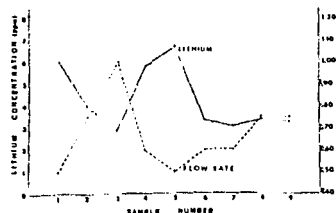


FIG 3.—Lithium concentration and flow rate of small samples (50  $\mu$ l) of stimulated parotid saliva.

#### References

1. COPPEN, A., MALLISON, A., and SHAW, D.M.: Effects of Lithium Carbonate on Electrolyte Distribution in Man, *Lancet* **1**: 682-683, 1965.
2. HODGKIN, A.L.: The Effect of Potassium on the Surface Membrane of an Isolated Axon, *J Physiol (London)* **106**:319-340, 1947.
3. SCHLAGSHAUF, G., FUPIN, J., and WHITE, R.B.: Use of Lithium Carbonate in the Treatment of Manic Psychoses, *Amer J Psychiatry* **123**:201-207, 1966.
4. SHANNON, I.L.; PRIMOETI, E.R., and CHAUNCEY, H.L.: Modified Carlson Cullenden Device for the Collection of Parotid Fluid, *J Dent Res* **41**:778-783, 1962.
5. BLOCK, P.L., and BROTHMAN, S.A.: A Method of Submandibular Salivary Collection Without Cannulation, *New York Dent J* **28**: 116-118, 1962.
6. MASON, D.K.; BOYLE, J.A.; HARDEN, R.M.; DUNCAN, A.M.; and GREGG, W.R.: Influence of Flow Rate on the Concentration of Uric Acid in Human Parotid and Submandibular Saliva, *J Dent Res* **45**:1439-1444, 1966.
7. BURGEN, A.S.V.: Secretion of Non-Electrolytes in the Parotid Saliva, *J Cell Comp Physiol* **48**:113-138, 1956.
8. WINDELER, A.S., and SHANNON, I.L.: Effect of Flow Rate on Parotid Fluid Calcium, Magnesium and Protein Concentrations in the Human, *USAF Aerospace Med* **1-5**, 1967.
9. BURGEN, A.S.V., and EMMELIN, N.G.: *Physiology of the Salivary Glands*, London: Edward Arnold & Co., 1961, pp 149-152.
10. SHANNON, I.L.: Parotid Fluid Flow Rate, Parotid Fluid and Serum Inorganic Phosphate Concentrations as Related to Dental Caries Status in Man, *J Dent Res* **43**:1029-1038, 1964.
11. BURGEN, A.S.V.: Secretion of Lithium in Saliva, *Can J Biochem* **36**:409-411, 1958.

Li sobre la membrana celular.

## CONCLUSIONES

Las concentraciones administradas oralmente de Li en la saliva de las parótidas humanas y también se las glándulas submaxilares humanas fueron determinadas. Las concentraciones de Li salival de las parótidas y submaxilares no estimuladas se encontraron muy cercanamente relacionadas a la concentración de Li serico. Las concentraciones de Li salival de las parótidas estimuladas estuvo relacionada al rango del flujo de la saliva solo cuando las muestras eran pequeñas 0.50 ul.

Hubo una correlación negativa entre el rango del flujo y la concentración de Li, después de una administración prolongada, el Li no fué almacenado y posteriormente secretado en la saliva de las parótidas la excreción salival de las parótidas de Li no recuerdan la secreción del potasio en la saliva de las parótidas.

## CONCLUSIONES

Los niveles de Li serico más elevados fueron observados entre las 2 horas después de la dosis ingerida, 4 veces fue demostrado el decremento de Li y en ocasiones mostraron tanto una relación positiva como negativa.

## INTRODUCCION

Las investigaciones de excreción salival de Li en la sangre se estudiará con una variedad en las técnicas utilizadas de Sodio, así como también incluirán una análisis de cuando se detiene el flujo de saliva, así como una inyección retrograda de inhibidores metabólicos y el uso de muchas drogas que afectan el sistema nervioso autónomo.

## ANALISIS FUNCIONAL

El Li salival y su actividad secretada por la glándula submaxilar del gato de manera inversa al rango de flujo a concentraciones sobre el nivel serico. Estudios de flujo detenido indicaron una secreción salival de Li por un mecanismo sensitivo a la ovabaina y al cloruro de mercurio, la secreción salival de Li no fué similar al Na pero fué similar a la de K, la sustitución por cortos periodos de Li por Na en los fluidos extracelular del nervio y el músculo ha sido bien documentada por muchos investigadores cuando los experimentos de larga duración pueden llevarse a cabo, no se encontró que el Li fluyera gradualmente al pulso de la electrogénesis.

Altas concentraciones de Li han mostrado desplazar parcialmente el Na intracelular y el K en fibras musculares derrame aislados en el flujo de Li fue solamente de un 25 a un 10 el rango de la pérdida de Na cuando el Li fue sustituido por Na en la piel aislada de rana, se observó una inhibición gradual de transporte de Na con una acumulación de Li en el epitelio la reabsorción tubular renal de Li es muy similar a la de Na aunque mucho menos eficiente schov notificado que aunque el Li es transportado a través de la membrana celular como un sustituto del Na, hay evidencias de la capacidad de la célula para distinguir el Li del Na. Intentos de sustituir el Li por el Na en la preparación de K-ATPasa en preparaciones de esta han sido de poca importancia de un adenosintrifosfotasa en la secreción del Na y K en la saliva fue propuesta por Schwartz y otros una muy activa Na y K, K-ATPasa ha sido aislada a partir de la glándula submaxilar de la rata y una preparación menos activa ha sido aislada a partir de la glándula parótida del perro, la mayoría de éstas enzimas ha sido propuesta que está localizada en la membrana celular del ducto donde los contenidos de Na y K de la solución precursora se ajusta a una concentración final el Li no sustituiría al Na en una preparación de K-ATPasa sodio-potasio a partir de la glándula submaxilar de la rata la sustitución de Li por Na en la glandulasubmaxilar de perro en pertución causo una

considerable reducción en el potencial de secreción y de volumen de la saliva, Burgen ha observado que el Li salival no recuerda del todo al Na y ha sido sugerido que el Li salival humano y de una manera más cercana recuerda al K más que otro cualquiera, otro de los componentes como la concentración de Li en la saliva es mucho mayor en la sangre, es razonable asumir que las glándulas salivales están relacionadas en el movimiento activo de Li contra el de concentración más de gradient.

Investigaciones previas sobre la excreción salival de Li no han incluido análisis de los mecanismos de transporte de Li a partir de la sangre a la saliva en el presente trabajo la excreción de Li fue estudiada con una variedad en las técnicas utilizadas en el estudio del Na de la secreción del potasio en la saliva, éstos incluyen análisis de cuando se detiene el flujo de saliva así como una inyección retrograda de inhibidores metabólicos dentro del sistema cloruro de mercurio del ducto y la ovabina y el uso de muchas drogas que afectan el sistema nervioso autónomo.

## MATERIALES Y METODOS

Ocho gatos que pesaban 2 1/2 y 3 1/2 kilogramos fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico 25 mg, se le hizo una traqueotomía y también se les introdujo una canula con un volumen interno de 60 ul la cual fue cocida a los ductos de Wharton derecho e izquierdo una infusión intravenosa baja de cloruro de sodio al 0.9% acompaño todo el procedimiento. Smalka fue inyectado. I. V. y el animal se le permitió estabilizarse por una hora antes de recolectar la muestra la estimulación parasimpática fue acompañada o más bien fue llevada a cabo por hidrocioruro de adrenalina 0.1 m por Kg y la acción simpatomolítica fue llevada a cabo con dibercilina 2 mg por kg y con propranolol 5 mg por kg la sangre venosa fue tomada a intervalos de 15 minutos durante el curso del experimento y los contenidos de Na-K fueron determinados por un espectroscopio de absorción atómica.

Los procedimientos con flujo detenido fueron llevados a cabo sujetando las canulaoas de polietileno inmediatamente después de la inyección intravenosa de pilocartina.

La canula fue obstruida durante 8 minutos y fue revisada cuidadosamente para verificar que los signos estuvieran perfectamente, además de checar que estuviera cerrada, una vez liberada de la obstrucción, las muestras secuenciales de un volumen de 40 a 60 ul fueron colectadas hasta un total de 1.0 ml. Hubiera sido secretado despues de la evaluación de estos datos, el volumen del sistema de ductos de las glándulas submaxilares fue estimado aproximadamente 5 litros, la técnica de aproximación fue la de Henriques inyección retrograda de los ductos submaxilares, se acompaño con cloruro de mercurio 0.05% por ovabaina  $5 \times 10^{-6}$  M, las cuales se dejaron dentro de los ductos por 5 minutos y la estimulación del flujo salival fue iniciado al término de éste periodo una muestra control de 1 ml fue desalojada antes de la colecta para el análisis.

## RESULTADOS

La concentración serica del Li varió con la duración del tiempo después de la inyección inicial de LiCl, los niveles observados fueron siempre menores de 2 mEq/l (13.88ppm) el Na el K serico siempre estuvieron dentro de los límites normales para cada animal.

La saliva colectada posteriormente a la inyección intravenosa de Pilocartina contuvo Li en concentraciones 2 O 3 veces que el nivel serico en una relación inversa al rango de flujo de la saliva.

FIGURA I

Los coeficientes de correlación personiana para todas las de-



terminaciones fueron menores de  $-0.9299$  la concentración de Na-K y Li después de la liberación de una oclusión de 8 minutos como se muestra en la figura 2.

Los cambios en la concentración de Li fueron paralelos al de K pero el Li siempre exhibió un menor tiempo de incremento en sus concentraciones de Na-K y Li de la saliva, estimulada con epinefrina y pilocaitina no reveló una diferencia significativa en el contenido de Li.

La Dibenzilina o el propranolol definieron el rango de flujo después de la estimulación con epinefrina y sustancialmente, alteraron las concentraciones Na, K y Li.

#### TABLA 2

Esta tabla muestra el efecto de la inyección retrograda de cloruro de mercurio o ovabam dentro del sistema de ductos de la glándula las concentraciones iónicas de los fluidos resultantes no fueron afectados por los cambios en el rango de flujo o por la oclusión de la canula que se encontraba muy cercanamente aproximada a las concentraciones sericas los análisis en las concentraciones de Li y K de la saliva que había sido estimulada con pilocartina colectada después de 1 hora del periodo restante mostraron una insignificante dependencia al rango del flujo para el Li por su parte el K exhibió sus características independencia al rango de flujo. Figura 3.

### DISCUSION

La estricta dependencia de las concentraciones de Li salival sobre el rango de flujo observadas en estudios anteriores en las submaxilares del perro y en las parotidas humanas fueron confirmadas en la secreción submaxilar del gato, las concentraciones de Li salival nunca decrecieron a los niveles sericos en relación al rango del flujo indicando un eficiente activo transporte de Li

dentro de la saliva no hubo evidencia de que el Li se almacenara por estas glándulas ya que las concentraciones salivales fueron responsivas a los cambios en las concentraciones sericas. Estudios de flujo detenido mostraron similitudes entre el Li y el K y diferencias sustanciales entre el Li y el Na las primeras muestras colectadas después de la muestra con todo representaron el volumen de la canula siempre fueron ricas en K y Li, cobre con Na, ya con la saliva en los ductos por alrededor de 8 minutos se activó sobre ella de una manera máxima por las células del ducto, las muestras subsiguientes bajas en Li y K y altas en Na representan el fluido así más el cual activó o había actuado sobre éstas mínimamente por los ductos debido a su rápida circulación a través del sistema el incremento en el K y el decremento en el ductal Na observaron las primeras pocas muestras posteriormente a la liberación de la oclusión fueron sustanciadas por un mayor número de muestras que las que mostraron un incremento en la concentración de Li esto sugiere un sitio más limitado de la transferencia ductual para el Li que para el K y para el Na.

La glándula submaxilar del gato es particularmente sensitiva a la epinefrina intravenosa, la saliva se produce a rangos lentos de flujo; concentraciones relativamente altas de Na y K, el Li no fue similarmente mayor en la saliva que los que habían sido estimulados con epinefrina que en la saliva colectada después de la estimulación con pilocartina, la inyección retrograda dentro del sistema ductual del inhibidor del sulfidrilo cloruro de mercurio causó el cese del transporte ductal activo de Na, K y Li el decremento de Li en la saliva en las glándulas tratadas indica que el Li había empezado a ser secretado en la solución precursora acinar la concentración serica y fue modificada en los ductos la ovabaina un inhibidor específico de la ATPasa Na-K, causó alteraciones similares en todos los 3 iones.

La concentración de Li encontrada en la secreción final aparentemente se debe más a la filtración inicial del plasma por las células acinares y la secreción subsecuente de Li que las células ductuales. La secreción de Li se relacionó con el modo de acción

del enzima AT.P asa Na-K ya que fueron sensitivas tanto al cloruro de mercurio como a la ouabaina, la carencia de Li en el resto transitorio en la saliva estimulada con pilocartina indica que ocurre un equilibrio de la secreción ductual de Li en una reabsorción cuando se da el tiempo suficiente aunque el K secretado como reabsorbido en los ductos cuando predomina la secreción se da un período de descanso Young y otros han propuesto 2 o más sitios de secreción ductual del K separados por los datos del flujo detenido aparentan, indican que el Li es secretado cerca del más proximal de los 2 sitios de secreción de K, esto podría ser confirmado por el uso de una inyección intraarterial cercana de Li no marcado y de K y Na marcado aparentemente el Li no marcado y de K y Na marcado como un sustituto para el Na en los estudios de fusión salival ni tampoco aparenta ser un sustituto factible del K, el Li transportado en una manera similar pero no idéntica que el K.

### CONCLUSIONES

El Li fué activamente secretado dentro de la saliva de las glándulas submaxilares del gato a concentraciones por sobre los niveles sericos, en una relación inversa al rango del flujo de saliva, los estudios de flujos detenidos indicaron que la secreción de Li dentro de la saliva por las células del ducto en la porción proximal del sistema del ducto inyección retrograda de cloruro de mercurio de ouabaina indicaron que la solución precursora contenía Li en la concentración serica y que las concentraciones de Li en la saliva en exceso de las concentraciones sericas, fué llevada a cabo en los ductos por el mecanismo sensitivo a la ouabaina y al cloruro de mercurio, la secreción salival de Li no recuerda la secreción del Na en ningún respecto, pero de algún modo es más similar a la secreción del K.

## CONCLUSIONES

La excreción salival de Li varió con la duración del tiempo después de la inyección inicial de Cloruro de Li. El flujo detenido indicó que la secreción de Li dentro de la saliva, en la solución precursora y concentraciones de Li fue llevada a cabo en los ductos por un mecanismo sensitivo a la ovabaina.

TABLE 1  
EXAMPLE OF THE IONIC CONCENTRATIONS OF SUBMAXILLARY SALIVA AFTER  
SYMPATHOMIMETIC, PARASYMPATHOMIMETIC, AND SYMPATHOLYTIC AGENTS

Stimulus	Flow Rate ml/min	Concentration (ppm)		
		Na	K <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>
Pilocarpine	0.180	206 (9.0)*	495 (22.6)*	27.5 (4.0)*
Epinephrine	0.170	535 (23.3)	830 (37.3)	22.1 (3.2)
Epinephrine and dibenzylamine	0.080	814 (35.3)	488 (22.5)	12.0 (1.7)
Epinephrine and propranolol	0.023	584 (25.4)	952 (42.4)	16.5 (2.39)

\* Figures in parentheses are  $\mu\text{M}$ .

TABLE 2  
EXAMPLE OF THE EFFECT OF RETROGRADE INJECTIONS OF  $\text{HgCl}_2$  OR  
QUABAIN ON SUBMAXILLARY SALIVA

Flow Rate ml/min	Concentration (ppm)		
	Na	K <sup>+</sup>	Li <sup>+</sup>
Control*	640 (27.8)*	235 (6.0)*	12.2 (1.76)*
HgCl <sub>2</sub> †	2175 (94.5)	169 (4.3)	5.6 (0.81)
Quabain†	1812 (79.0)	150 (5.8)	8.13 (1.17)
Serum	3812 (166.0)	196 (5.0)	5.83 (0.84)

\* Li<sup>+</sup> concentration in  $\mu\text{M}$ .

† Li<sup>+</sup> concentration in  $\mu\text{M}$ .

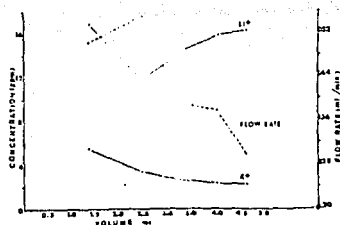


FIG. 3.—Li<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transients after intravenous pilocarpine stimulation. Abscissa, total volume of saliva secreted. Ordinate, concentration in ppm for Li<sup>+</sup>  $\times$  2 ppm/100 for K<sup>+</sup>. Pearsonian correlation coefficient for Li<sup>+</sup> versus total volume secreted = 0.1236; for K<sup>+</sup> versus total volume secreted = 0.9376.

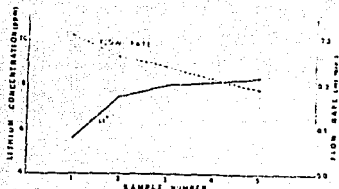


FIG. 4.—Relationship of Li<sup>+</sup> concentration and rate of flow of saliva after pilocarpine stimulation. Sample volume, 0.4 ml.

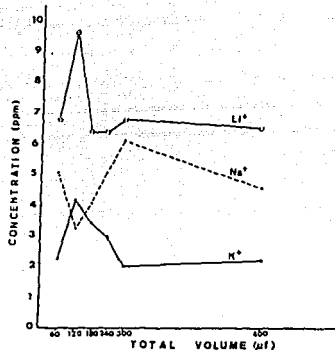


FIG. 5.—Stop-flow analysis of submaxillary saliva. Flow was stopped for eight minutes. Abscissa, total volume of saliva secreted after the release of the occlusion (internal volume of cannula 60  $\mu\text{l}$ ). Ordinate, concentration in ppm for Li<sup>+</sup> and ppm/100 for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>.

## References

1. OVERTON, E.: Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. Ueber die Unentbehrlichkeit Natrium—(oder Lithium) Ionen für den Contractionsact des Muskels, *Pflueger Arch Ges Physiol* 92: 346-353, 1902.
2. HODGKIN, A.L., and KATZ, B.: The Effect of Sodium Ions on the Electrical Activity of the Giant Axon of the Squid. *J Physiol* 108:37-77, 1949.
3. SCHOU, M.: Biology and Pharmacology of the Lithium Ion. *Pharmacol Rev* 9:17-57, 1957.
4. GALLEGU, A., and LORSTE DE NÓ, R.: On the Effect of Ammonium and Lithium Ions upon Frog Nerve Deprived of Sodium. *J Gen Physiol* 35:227-244, 1952.
5. OZUKI, M., and GRUNDFEST, H.: Crayfish Muscle Fiber: Ionic Requirements for Depolarizing Synaptic Electrogenesis. *Science* 155:478-481, 1967.
6. KUSANO, K., and GRUNDFEST, H.: Action Potentials in *Tenebrio* Muscle Fibres Blocked by Li<sup>+</sup> Replacement of Na<sup>+</sup>. *Abstracts Meeting of the Society of General Physiology* 50:1092, 1966.
7. KEYNES, R.D., and SWAN, R.C.: The Permeability of Frog Muscle Fibres to Lithium Ions. *J Physiol* 147:626-638, 1959.
8. ZERAHN, K.: Studies on the Active Transport of Lithium in the Isolated Frog Skin. *Acta Physiol Scand* 33:347-358, 1953.
9. FOLKES, J., MUDGE, G.H., and GILMAN, A.: Renal Excretion of Cation in the Dog during Infusion of Isotonic Solution of Lithium Chloride. *Amer J Physiol* 168: 642-649, 1952.
10. SKOU, J.C.: Influence of Some Cations on an Adenosinetriphosphatase from Petenital Nerve. *Biochem Biophys Acta* 23:394-401, 1957.
11. SKOU, J.C.: Further Investigation on a Mg<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>-Activated Adenosinetriphosphatase, Possibly Related to the Active, Linked Transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across the Nerve Membrane. *Biochem Biophys Acta* 42:6-23, 1960.
12. SKOU, J.C., and HILBERG, C.: The Effect of Sulphydryl-blocking Reagents and of Urea on the (Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>)-activated Enzyme System. *Biochem Biophys Acta* 110:359-369, 1965.
13. GLYNN, I.M.: Activation of Adenosinetriphosphatase Activity in a Cell Membrane by External Potassium and Internal Sodium. *J Physiol* 160:18-19, 1962.
14. WHITTAM, R.: The Asymmetrical Stimulation of a Membrane Adenosinetriphosphatase in Relation to Active Cation Transport. *Biochem J* 84:110-118, 1962.
15. BAKER, P.F.: Phosphorus Metabolism of Intact Crab Nerve and Its Relation to the Active Transport of Ions. *J Physiol* 180: 383-423, 1965.
16. SCHWARTZ, A., and MATSUI, H.: "An Enzyme Mechanism for Active Cation Transport." in Schneyer, L.H., and Schneyer, C.A. (eds), *Secretory Mechanisms of Salivary Glands*. New York: Academic Press, Inc., 1967, pp. 75-97.
17. SCHWARTZ, A., and MOORE, C.A.: A Highly Active Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in Rat Submaxillary Gland Bearing on Salivary Secretion. *Amer J Physiol* 214:1163-1167, 1968.
18. YOUNG, J.A., FRÜMTER, E., SCHÖLL, E., and HAMANN, K.F.: "Micro-puncture and Perfusion Studies of Fluid and Electrolyte Transport in the Rat Submaxillary Gland." in Schneyer, L.H., and Schneyer, C.A. (eds), *Secretory Mechanisms of Salivary Glands*. New York: Academic Press, Inc., 1967, pp 11-29.
19. HENRIQUES, B.L.: A Technique of Studying Salivary Gland Function. *Amer J Physiol* 203:1086-1090, 1962.
20. YOSHIMURA, H.: "Secretory Mechanisms of Saliva and Nervous Control of its Ionic Composition," in Schneyer, L.H., and Schneyer, C.A. (eds), *Secretory Mechanisms of Salivary Glands*. New York: Academic Press, Inc., 1967, pp 56-74.
21. BURGEN, A.S.V.: Secretion of Lithium in Saliva. *Canad J Biochem* 36:409-411, 1958.
22. SPRING, K.R., and SPIRES, M.A.: Salivary Excretion of Lithium: I. Human Parotid and Submaxillary Secretions. *J Dent Res* 48:546-549, 1969.
23. HENRIQUES, B.L.: Acinar-duct Transport Sites for Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> in Dog Submaxillary Salivary Gland. *Amer J Physiol* 201:935-938, 1961.
24. MANGOS, J.A., and BRAUN, G.: Excretion of Total Solute, Sodium and Potassium in the Saliva of the Rat Parotid Gland. *Pflueger Arch Ges Physiol* 290:184-192, 1966.
25. MANGOS, J.A.; BRAUN, G.; and HAMANN, K.F.: Micro-puncture Study of Sodium and Potassium Excretion in the Rat Parotid Saliva. *Pflueger Arch Ges Physiol* 291:99-106, 1966.
26. BURGEN, A.S.V., and EMMELIN, N.G.: *Physiology of the Salivary Glands*. London: Edward Arnold & Co., 1961, p 53.
27. BURGEN, A.S.V.; TERRONX, K.G.; and MARTIN, K.: The Sites of Transfer of Sodium, Potassium and Iodide in the Parotid System of the Dog. *Canad J Biochem* 37:359-370, 1959.

## INTRODUCCION

Activación de los canales de Ca sensitivos a dihiropiridina de las glándulas salivales parótidas por el Factor de Crecimiento Epidérmico.

El complejo de los canales de Ca será aislado con membranas de células acinares y dentro de vésiculas dependiente del Factor de Crecimiento Epidérmico regulando así la homeostasis, el mantenimiento de la concentración intracelular así como la proliferación celular y la secreción.

## T E R C E R   A R T I C U L O

### ACTIVACION DE LOS CANALES DE LAS SENSITIVAS A DIHIDROPIRIDINA DE LAS GLANDULAS SALIVALES PAROTIDAS POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO

El complejo de los canales de Ca de las glándulas parótidas fue aislado con membranas de las células acinares solubilizadas mediante una cromatografía de afinidad sobre aglutinina de germen de trigo, los canales después de ser marcados en el sitio receptor antagonista con PN200110 triteado fue reconstituido dentro de vesículas de fosfatidilcolina que exhibían una toma activa de Ca, esta ingesta independiente de Na y K lo cual indica su electroneutralidad. Los canales respondieron de una manera dependiente a la dosis del antagonista de Ca condihidropiridina, el PN200110, a una concentración de 0.4 mM ejercía un efecto inhibitorio máximo de 75% sobre la toma de Ca un incremento del 46% en la toma del Ca ocurrió con el activador específico del canal de Ca, el BAY-K8644 con respecto a la unión del factor de crecimiento epidérmico en la presencia de ATP hubo un incremento en la fosforilación de la tirosina de las proteínas de 55 y 170 KDa de los canales es de Ca.

Estos canales fosforilados después de ser reconstituidos dentro de las vesículas mostraron una toma mayor de Ca de un 61%, indicando que la tirosina-kinasa envuelve la activación de los canales de Ca dependientes del factor de crecimiento epidérmico en la regulación de la homeostasis del Ca en las glándulas salivales.

## INTRODUCCION



Entre los factores implicados en la regulación de las respuestas secretorias en las glándulas salivales se encuentra el mantenimiento de la concentración intracelular del Ca. El Ca es un regulador importante en muchos procesos celulares incluyendo la contracción, la diferenciación y la secreción y su influjo de potencia, al daño celular bajo condiciones fisiológicas normales, la entrada de Ca dentro de la mayoría de las células secretorias y excitatorias es cuidadosamente controlada y envuelve los canales dependientes de receptores y de voltaje, los canales presentan en la mayoría de los diferentes tipos celulares incluyendo las células acinares parotidas son conocidos como tipo de elecandiosis en la hidropiridina, debido al factor que sea capaz de afectar la expresión de la actividad en los canales de Ca podrían ser importantes para los procesos de la secreción de los fluidos salivales.

Primero entre estos esta el factor de crecimiento epidérmico, un potente mitogeno elaborado por las glándulas salivales y es reconocido por su influencia en una variedad de funciones asociadas con la proliferación celular y la secreción. El factor de crecimiento epidérmico es mediado por los receptores localizados en la superficie celular de las células blanco, la unión del factor de crecimiento a los receptores activa la tirosina-kinasa intrínseca y lleva a la fosforilación en los receptores de los residuos de tirosina, esta autofosforilación es central para los efectos proliferativos de factor de crecimiento epidérmico. Aquí a partir de las membranas de las células acinares de las glándulas parótidas y examinamos los efectos de la fosforilación de las proteínas de los canales estimulados con factor de crecimiento epidérmico sobre la ingesta o toma de Ca dentro de las vesículas de fofolípidos que contenían los canales de Ca reconstituidas.

## MATERIALES Y METODOS

Los materiales que se usaron fueron ratas macho de la línea

Sport Pauly que pesaban entre 180 y 200 gramos, estas fueron obtenidas de la granja de Paconit.

El cloruro de Ca marcado radioactivamente, el metal triteado PN200110 a partir de la compañía nuclear de Inglaterra y el factor de crecimiento epidérmico marcado con  $I^{125}$  a parte Amersay Corporation.

La fosfatidilcolina y el factor de crecimiento epidérmico a partir de Sigma el PN200110 fue donado por el Doctor Joly Jan en el Instituto de Investigación de Sandax.

La cejarosa de aglutinina de germen de trigo fue obtenida a partir de la farmacia Discatihuay y los reactivos SDS Page fueron comprados a partir de Bioray en Kitts de prueba para las proteínas a partir de Pierre Vedford: El 5Br, 4Cl, 3 indolfosfato y el azul nitrotetrasolio a partir del Instituto de Ciencias de Oncología en Maja Nueva York founotirosina fueron obtenidas a partir de las inmunoglobulinas de Eclinger en Indianápolis.

La inmunoglobulina G Nucleonal contra fosfotirosina a partir de la compañía Tuxtey de tecnología de Nueva York.

Las membranas de las células acinares de las glándulas parótidas humanas y las glándulas salivales parótidas frescas recién disecadas libres de tejido conectivo y grasa fueron cortadas en pequeños segmentos y puestos sobre buffer congelado que consistía en 2.5 mM de Kitts son ácido clorhídrico y un PH de 7 sucrosa al 250 mM LTA al 2.5 mM y PMSF al 1 mM mgr/ml sobre ml la proteína y un miligramo sobre ml de leupectina esté por un minuto en un homogeneizador politrón los homogenados fueron centrifugados a 400 gravedades por 15 minutos a 4°C y sulfato de magnesio y cloruro de sodio fueron adicionados a los sobrentes para formar una concentración final de 0.1 a 2.1 mM respectivamente, después de la centrifugación de los sobrenadantes a 40,000 gravedades por una hora a 4°C los peleps fueron resuspendidos en 0.1 M de buffer de fosfato de Sodio a un PH de 7.2 y las porciones de estas membranas

preparadas fueron guardadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta sus concentración de proteínas de peleps presuspendido fueron estimadas usando un Kitts de prueba para proteínas BCA.

## AISLAMIENTO DE CANALES DE CALCIO

Las preparaciones de membranas celulares o acinares, fueron centrifugadas durante 20 minutos a 10,000 gravedades a  $4^{\circ}\text{C}$  y el pelep solubilizado usando un buffer con 50 mM de Kitts ácido clorhídrico a un PH de 7.4 cloruro de sodio 0.5 M chaps, 20 mM 10% de glicerol, 100 unidades internacionales sobre ml de proteína y 1 microlitro de leupetina, 1 mM de PMSF después de una hora a  $4^{\circ}\text{C}$  las mezclas fueron centrifugadas, 105,000 gravedades por 60 minutos y el sobrenadante resultante fue colectado 1 nanomolar de MP200

110 triteado fue adicionado y encubado a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos las preparaciones fueron luego aplicados a una columna de la aglutinina de gérmen de trigo unida con cefarosa, la columna fue lavada con 3 ml de buffer que consistía en 50 Mm de Kitts con ácido clorhídrico a un PH 7.4 conteniendo 20 mM de fluoruro de Sodio y 0.5 molar de Cloruro de Sodio y el PN200 110 triteado y las proteínas de los canales marcados con éste, fueron vendidos con buffer que contenía 300 mM de N acetil nicosamina la unión de un cuarto de hidropiridina todos los estudios de unión fueron hechos en 50 mM de Kitts con ácido clorhídrico 0.1 mM de PMSF un PH de 7.4 conteniendo 0.5% de albumina de suero bovino, las preparaciones de los canales de Ca de las membranas de las cel acinares contenían 50,500 microgramos de proteína, fueron divididos dentro de dos grupos, unos fueron tratados con 10 nanomolar de PN200 110 triteado al 10 nanomolar y el otro con 10 nanomolar de PN200 110 triteado y micrómetro PN200 110 frío o sea sin marca las mezclas fueron encubadas a temperatura ambiente, durante una hora las reacciones fueron detenidas adicionando 120 Mm de tris con ácido clorhídrico centrifugado disuelta en 0.1 Mm de cloruro de sodio y un buffer de fosfato al 0.05 molar en un PH de 7.4 y la unión de proteínas marcada PN200 110 triteado medida por un espectrometro

de centeno a la unión de factor de crecimiento epidérmico.

Las pruebas de unión de Factor de Crecimiento Epidérmico se hicieron incubando las muestras de las membranas 300 microgramos de proteína por cada prueba con factor de crecimiento epidérmico marcado con  $I^{125}$  0.18 nanomol y 5 mM de Kitts con ácido clorhídrico Ph de 7 y sucrosa 125 mM cloruro de sodio de 75 mM cloruro de calcio, 0.5 mM y 0.5% de suero de albumina bovina para obtener un volumen final de 200 microlitros de factor de crecimiento epidérmico no marcado se adicionaba a las incubaciones para formar una concentración final de 0.25 mM en los experimentos donde no se inició empezó a ser estimada las incubaciones durante una hora a la temperatura ambiente y luego mantenidas adicionando 1 minimolar de Kitts tris con ácido clorhídrico a un PH de 7 y albumina de suero bovina al 0.5%.

La unión de la membrana de factor de crecimiento epidérmico marcado con yodo fueron separadas a partir de las no unidas al factor de crecimiento epidérmico mediante la centrifugación a 10,000 gravedades durante diez minutos a una temperatura de 4°C. La pastilla fue lavada con 1 ml de buffer bien frío centrifugado y sus radiaciones con un contador gamma en efecto de los antagonistas al calcio de hidropinina PN200 110 son la unión de factores de crecimiento epidérmico puede llevarse a cabo después de una pentubación en la preparación de las membranas con PN200 110 de ceda a 200 micromolar y a temperatura ambiente durante 30 minutos.

La fosforilación de las proteínas de los canales de Ca estimulados por factor de crecimiento epidérmico.

En la preparación de canales de Ca en cromatografía purificada de afinidad contenían de 200 a 300 microgramos de proteína estos fueron encubados con etes al 50 milimolar a un PH de 7.6 y sulfato de magnesio al 10 minimolar PMSF al 1 minimolar y con oxin factor de crecimiento epidérmico al 2 micromolar o con 0.1 minimolar de D osfo unotidoxina después de 30 minutos a 25°C la fosforilación se inició por la adición de una solución que

contenia 10 micromolar de ATP  
1 minimolar de DTP, 8 minimolar de cloruro de manganeso 20  
minimolar de cloruro de magnesio 2 minimolar de banadato de sodio,  
las incubaciones se mantuvieron durante 10 minutos a 4°C después  
del cual la preparación de canales de Ca fue recubierta usando una  
comatografía de afinidad sobre aglutinina de germen de trigo para  
wmpesh de SDS en la mezcla de reacciones fue tratada con 170 mini-  
molar de buffer que contenia Kitts con ácido clorhídrico con un PH  
de 6.8 que contenia 10% doble Kitts de sulfato de sodio y 100  
minimolar de Litio triditol y calentado a 100°C durante 8 minutos  
las muestras fueron luego corridas sobre un gel al 7.5% después de  
su electroporesis las proteínas fueron transferidas electropore-  
ticamente a una membrana intracelulosa al 0.2 micrometros luego  
el porcentaje de albumina de suero de orina fue usado para  
bloquear las membranas.

Las inmunoglobulinas G monoclonales de ratón antifosfotiro-  
sina al 10 mgr/ml durante una hora cuando daban los anticuerpos y  
también un anticuerpo anti inmunoglobulina de ratón que se usaron  
como segundo anticuerpo la visualización se hizo con 5 bromo, 4  
cloro, 3 indolfosfato, 4 azul microtetrasolita.

La reconsideración de los canales de calcio, los liposomas  
fueron separados por el método de Neilans la preparación de los ca-  
nales de Ca purificados por cromatografía de afinidad en su forma  
intacta y después la foforilación estimulada por factor de creci-  
miento epidérmico fueron solubilizados con buffer que contenia 20  
minimolar de Chaps 5 minimolar Cloruro de Ca 50 minimolar de Kitts  
con ácido clorhídrico a un PH 7.4 y 10% de glicerol y mezclados  
con 1 ml de octilgluscosido conteniendo 1% de fosfatilcolina, a  
partir de clara de huevo el detergente fue removido por dialisis  
contra un buffer salino durante 24 horas a 4°C para obtener los  
liposomas. Para las purificaciones posteriores se suma suspensión de  
liposomas la cual fue hecha con 45% de sucrosa con 2 ml de sucrosa  
al 30% y 1 ml de sucrosa al 10% y luego centrifugadas a 4°C  
durante 18 horas a 45,000 gravedades en un rotor Degman CW50.

Los liposomas purificados que contenían la marca de PN200 110 triteado de las proteínas de los canales marcados fueron recubiertas con una banda blanca a la parte superior de la capa de sucrosa al 10%.

La ingesta o toma de Ca dentro de las vesículas para medir la toma de Ca dentro de las vesículas libres de proteína, o sea controles y las vesículas que contenían los canales Ca reconstituidos, los cationes divalentes externos fueron removidos aplicando 200 microlitros a una columna de sefadex 3ml de sefadex con un grosor de  $\approx$  50 equilibrados con sucrosa al 0.34 molar y 10 minimolar de Mops tetrametil amonio con un PH de 7 la toma de entre las vesículas 100 microlitros en medio de sucrosa iniciado por la adición de 50 microlitros de enmedio de sucrosa contenían 0. minimolar de cloruro de Ca más 2 microcuriosde Ca marcado, la mezcla fue encubada a 37°C durante varias ocasiones hasta 1 hora y las reacciones fueron terminadas con cloruro de Mg al 150 minimolar y buffer de etes Kitts al 10 minimolar a un PH de 7.4 los efectos de los antagonistas del receptor de los canales de Ca con PN 200 110 y el activador de los canales de Ca BAYK 8644 sobre la toma de Ca fueron medidas después de una preincubación de las vesículas a temperatura ambiente durante 20 minutos con PN200 110 de 0 a 1 micromolar o BAYK 8644 de 0 a 10 micromolar las mezclas fueron luego aplicadas a una columna de Geles 100 0.5 a 5 cm equilibrada con medio de sucrosa que contenía. 1 microgramo por ml de albumina de suero bovino las vesículas fueron eludidas a partir de la columna con 1 ml de medio de sucrosa con albumina de suero bovina y la toma de Ca específica fue determinada sustrayendo la toma inicial dentro de las vesículas libres de proteínas. A las que si contenían la proteína de la toma de Ca.

## ESPECIFICIDAD DE LA TOMA DE Ca

La especificidad de la toma de Ca dentro de los liposomas con canales reconstituidos fue observada en experimentos con desplazamiento del antano y variando el gradiente cationico el efecto del

antano marcado relativamente sobre el desplazamiento de Ca fue evaluado usando 100 microlitros muestras de 100 microlitros de vesículas prerregistradas durante 20 minutos a temperatura ambiente con cloruro de Ca al 0.1 minimolar y 2 microcurios de Ca marcado, las vesículas luego fueron diluidas y el medio de incubación que contenían diferentes concentraciones de 0 a 1 minimolar de oxido del antano al 0.7 minimolar fueron encubados a temperatura ambiente durante 5 minutos y buscadas sobre una columna de Gels 100 las vesículas diluidas a partir de la columna con el medio de albumina de suero de bovino y sucrosa fueron luego medidas para su contenido de Ca, el efecto de los gradiente catiónicos sobre la toma de Ca fueron también medido usando muestras de 100 microlitros de vesículas preencubadas por 5 minutos a temperatura ambiente ya sea con buffer que consistía en 0.34 molar de sucrosa y 10 minimolar de Naps tetrametil amonio. Pesh a PH de 7 o con el mismo buffer que contenía diferentes concentraciones de cloruro de potasio de 5 a 150 minimolar y cloruro de sodio 45 a 50 minimolar la toma de Ca luego fue iniciada por la adición de 0.1 minimolar de cloruro de Ca y 2 microcurio de Ca marcado la toma fue terminada después de 10 minutos adicionando buffer con 10 minimolar a un PH de 7.4 conteniendo cloruro de magnesio al 150 minimolar la muestra fue luego buscada o registrada según la columna de Gels 100 las vesículas diluidas con 0.34 molar de sucrosa 10 minimolar de tetrametilamónio a un PH de 7 conteniendo a 1 miligramo por mililitro de albumina de suero bovino que estas fueron medidas para observar su contenido de Ca.

## ANALISIS ESTADISTICO

Todos los experimentos fueron hechos por duplicado y los resultados expresados por sus medios más menos la desviaciones standar, una prueba de Tedens Crudens fue usada para determinar el significado y los valores de P 0.05 a menos fueron considerados significantes.

## RESULTADOS

Las membranas de células acinares son solubilizadas o prelavadas con PN200 110 triteada un antagonista del canal receptor de Ca dihydropyridina y sujetadas a una cromatografía sobre aglutinina de germen de trigo unida a cefarosa fue diluida con buffer que contenía 300m MN- acetylglucosamina para obtener el complejo de proteínas de los canales marcados con PN200 110 triteada con respecto al SDS-Page bajo condiciones reductoras, la preparación dieron 3 bandas de proteínas mayores las cuales migraron a 170-90 y 55 K.D.a con respecto a la fosforilación inducida por el factor de crecimiento epidérmico hubo un incremento en la fosforilación de tirocina en las proteínas en la región de 170 y 55 KDa con un posterior inicio más pronunciado, la figura 1 muestra los efectos de las proteínas de los canales de Ca purificadas sobre la unión de dihydropyridina del canal de Ca el PN200 110, los resultados indican una unión dependiente de la concentración PN200 110 con un incremento en la concentración de proteínas alcanzando un valor máximo de 400 ug proteínas. Los datos sobre el efecto de PN200 110 sobre la unión de los receptores de las acinares parotidas del factor de crecimiento epidérmico.

La unión de factor de crecimiento epidérmico después de la preincubación del antagonista del canal de Ca, fue de alguna manera no significativamente diferente, a partir del que esta ausente de PN200 110.

La función de los canales de Ca aislados fue valuado después de la incorporación del complejo canal de proteína dentro de la vesícula fosfatidil colina las cuales conformaron una estructura de proteína que se unía a la membrana después de la purificación de un gradiente de la sucrosa, las vesículas aisladas fueron usadas para medir la toma de Ca bajo las condiciones de prueba, los complejos de canal de proteína de Ca de las cel acinares reconstituidas exhibieron 6.5 veces una mayor toma de Ca dentro de las vesículas cuando eran comparadas con las vesículas libres de proteínas



La toma de Ca dentro de las vesículas conteniendo la proteína de la membrana fue proporcional al tiempo de incubación y alcanzaron su máximo a los 30 minutos las vesículas conteniendo los canales de Ca reconstituidos respondieron de una manera dependientes de la concentración a la PN200 110 un antagonista de Ca de dihidropiridina tanto como el BAY K8644 el activador específico del canal de Ca. El máximo efecto inhibitorio lo alcanzó 0.4  $\mu$ M de PN200 110 a cuya concentración el antagonista se observó un 75% de decremento en la toma del Ca.

Mientras que el BAY K8644 causó un incremento máximo del 46% en la toma del Ca a los 8 mM. El nivel de inhibición debido al PN200 110 sugiere que la toma de Ca en las vesículas reconstituidas fue mediada por unos canales de Ca funcionales con las propiedades farmacológicas de los canales de Ca sensitivos a la hidropiridina.

Para elucidar si la toma de Ca por las vesículas representa el transporte dentro del espacio activo osmoticamente y no sola la unión entre la superficie de Ca vesicular, las vesículas prelavadas de Ca fueron tratadas con el antano para desplazar el Ca a partir de la superficie de las vesículas a su concentración óptima 0.7 mM por ml pero el antano causó un desplazamiento en el Ca de aproximadamente de 13.5%.

Esto indicaba que la mayoría del Ca estaba presente dentro del espacio intravesicular y era inaccesible al desplazamiento por el antano, las pruebas de la toma de Ca en la presencia de Sodio gradiente Sodio y Potasio, no mostraron diferencias significativas sugiriendo que este proceso fue electricamente neutro.

La toma de Ca dentro de las vesículas que contenían las proteínas de los canales de Ca purificados fueron foforilados se muestra en la figura 6.

## DISCUSION

El factor de crecimiento epidérmico es un mitógeno potente de origen salival capaz de estimular las respuestas secretoras de las células epiteliales; los efectos biológicos del factor de crecimiento epidérmico son mediados por receptores localizados sobre la superficie de las células blanco y envuelve la activación de la tirosina kinasa estrínseca un evento esencial para la posterior traducción de la señal.

Mientras muchos de los efectos proliferativos del factor de crecimiento epidérmico son considerados como una consecuencia directa de la activación de la fosfolipasa C por la hidrólisis de los fosfolinosípidos y la liberación de Ca a partir de almacenes intracelulares hay una fuerte indicación de que una respuesta más temprana a la activación de los receptores del factor de crecimiento epidérmico, la cual envuelve al Ca incluso recientes trabajos con CclA431 sigieren que la activación de los receptores al factor de crecimiento epidérmico esta mediado u operado por receptores es una respuesta operada por receptores de canales de Ca. Aquí proveemos la evidencia para la presencia de canales de Ca independiente del voltaje en las membranas celulares de las cel acinares parótidas y mostramos que la fosforilación de los residuos de tirosina a través de la activación de los receptores del factor de crecimiento epidérmico era una estimulación de la actividad del canal del Ca, los complejos de canales de Ca solubilizados marcados con PN200 110 triteado y purificado por cromatografía de afinidad sobre la aglutinina de germen de trigo y posteriormente la incorporación de las vesículas de la fosfatidicolina exponen una toma concentrada de Ca y responden de manera dependiente de la concentración al PN200 110 a antagónica de Ca. Hidropiridina también como el BAY K8644 con un activador específico de los canales de Ca más que esto como en los receptores de canales de Ca frente de los tejidos de las vesículas que estaban libres de proteínas por otro lado en las condiciones bajo el efecto del SDS-Page las condiciones de los canales de Ca preparadas que corre a 170.90 y 55 KDa de los canales de Ca frente de otras fuentes. Esto se

observa como receptor antagonico de Ca aislado tiene propiedades típicas de las proteínas que se encuentran en la medida en las membranas y manifiestan mucha similitud a otros receptores conocidos de antagonistas de Ca conocidos ya del factor de crecimiento epidérmico en presencia de ATP se observan en los canales de Ca de las células acinares respondiendo incrementando la fosforilación de las proteínas de tirosina. Examinación de las proteínas usando con anticuerpos de fosfotirosina se revela que este incremento en la fosforilación fue principalmente en las proteínas de 55 y 170 KDa.

Las vesículas que contienen las proteínas de los canales fosforilado muestran un 51% mayor de la toma de Ca, estos anticuerpos indican que esta envuelto en este proceso la tirosina kinasa en el proceso de los canales de Ca corresponden del factor de crecimiento epidérmico, estos desprendimientos junto con los que se han obtenido de la tec. Patch-Clamp a nivel de canales iónicos singulares o aislados sugieren la especificación de los canales de Ca que dependen no solo de los eventos controlados de fosforilación por la protein kinasa A y protein kinasa C sino también tiene que ver con la fosforilación alcanzada por la activación de receptores del factor de crecimiento epidérmico el hecho de la activación de canales de Ca reconstituidos a partir de las células acinares podrían estar relacionadas o mediadas a través de la activación de receptores del factor de crecimiento epidérmico lo que renueva más el punto de importancia del factor de crecimiento epidérmico en la regulación del influjo de Ca un evento significativo para los procesos de secreción salival.

## CONCLUSIONES

El factor de crecimiento epidérmico es un mitógeno potente de origen salival capaz de estimular las respuestas secretoras de las células epiteliales.

Las vesículas que contienen proteínas indican que están envueltas en el proceso de la tirosina-quinasa.

Las células acinares están relacionadas a través de la activación de los receptores de los procesos salivales

## INTRODUCCION

Serán observadas dos tipos de células acinares en glándulas labiales humanas con microscopía óptica y electrónica convencional y analítica. Así como las glándulas salivales menores labiales también se harán trabajo con biopsias y con muestras congeladas en seco.

COMPARACION DE LAS CONCENTRACIONES ELEMENTALES EN LAS CELULAS  
ACINARES DE LAS GLANDULAS SALIVALES LABIALES

Dos tipos de células acinares fueron observadas en glándula labial humana con microscopía óptica y electrónica convencional y analítica, el tipo predominante contenía glándulas secretorias prominentes y grandes que eran fuertemente positivas Armina con osin DIASTASA y el 2<sup>o</sup> tipo contenía glándulas secretorias pequeñas y estas células eran menos positivas a estos colorantes o a esos marcadores, el contenido elemental de esto dos tipos de granulos fueron medidos usando microscopía electrónica analítica usando mapeo digital y un análisis de punto aplicado a crio secciones preparadas congeladas in seco a partir de rebanadas de glándulas encubadas in vitro bajo condiciones no estimuladas los granulos secretorios grandes tenían significativamente concentraciones mayores de calcio, azufre y magnesio y significativamente menores de concentraciones de cloro y potasio de granulos pequeños. La diferencia de los contenidos elementales probablemente reflejan diferencias en el contenido de las macromoléculas secretorias específicamente el contenido de azufre, se cree que reflejan las propiedades aniónicas de las macromoléculas secretorias. Mientras que los niveles de cationes divalentes se cree que estan determinados por los requerimientos de electroneutralidad para un almacen de macromoléculas no se encontraron diferencia en las concentraciones elementales nucleares o citoplasmáticas entre los dos tipos de células.

## INTRODUCCION

El uso de glándulas salivales menores labiales humanas con una preparación experimental e incrementada como también los descubrimientos a partir de modelos animales han sido probados en tejidos humanos, las glándulas labiales son especialmente fáciles

de usar para ese trabajo tanto como las biopsias necesarias son significativamente menos invasivas que aquellas en las glándulas salivales mayores. Nosotros medimos concentraciones elementales intracelulares y describimos, la regulación autonómica y liberación del potasio y de niveles de nucleóticos cíclicos en glándulas normales y en glándulas a partir de pacientes con fibrosis quística, sin embargo la interpretación de estos estudios funcionales es complicada por la presencia de células acinares en las glándulas labiales se sabe relativamente poco acerca de las diferencias funcionales entre estas células y existen puntos de vista que conflictúan, nosotros observamos o decidimos hacer un estudio comparando los contenidos elementales en los compartimientos subcelulares de 2 tipos de células usando microscopía electrónica y analítica.

Los estudios fueron posibles debido al incremento en nuestra experiencia preparando cuyas secciones congeladas en seco a partir de glándulas labiales nos han llevado de una manera rutinaria a producir citosecciones en las cuales 2 tipos de células pueden ser distinguidos.

## MATERIALES Y METODOS

Las muestras de las glándulas labiales fueron obtenidas a partir de 3 hombres saludables entre los 18 y 25 años de edad por biopsia, las piezas para análisis elemental fueron limpiadas de tejido conectivo o bien cortadas en rebanadas de 1 mm. y preencubadas durante 15 minutos a 37°C en una solución de incubación oxigenada que contenía 118 minimolar y 25 mM de Carbonato de Sodio 1.28 mM de Cloruro de Calcio 5mM de ácido beta hidroxibutírico luego se incubaron alrededor de 5 minutos en la misma solución pero 10 mM de cloruro de sodio y el cual fué reemplazado con 10 mM de CoEDTA con Sodio, un marcador extra celular, así también como un marcador para baño celular, las soluciones fueron gaseadas con una mezcla de 95% de Oxígeno, 5% Bióxico de Carbono durante todo el tiempo, el tejido fue congelado y se prepararon

criosecciones congeladas en seco, las criosecciones fueron examinadas y analizadas para observarlas. Concentraciones elementales en un gel JEOL-JEM-1200 EX. Que es un microscopio electrónico equipado un cristal de Silicio, Litio de 30 mm<sup>2</sup> LINK EDS, detector de rayos X con una apertura amplia de rayos X sobre el espécimen y un sistema analizador AN 10,000 las células fueron escogidas para análisis se excluían en el marcador CoEDTA y si ellas contenían un grupo intacto en el cual fueron claramente discernibles los 2 tipos celulares de células acinares. Las condiciones de análisis típicas fueron de 100 KV de voltaje acelerado y el tiempo de conteo de 200 seg. de  $5 \times 10^{-9}$ . Aproximadamente con un concurrente oscurecimiento de un punto de observación de la especie en 40° las exposiciones electrónicas para los análisis de puntos fueron de orden de  $10^2-10^3$  C/cm<sup>2</sup> o campos X cm<sup>2</sup> las concentraciones fueron calculadas como mínimos por kilogramo de peso seco a partir de un pico e integral continuas usando el procedimiento de <HALL ANDERSON>, después de una filtración digital y un ajuste de cuadrados mínimos del espectro usando perfiles elementales así como primeras y segundas derivadas de los picos mayores para corregir los errores de calibración en la edición de LINK 10,000 uso un esquema de calibración de 2 pasos para corregir los cambios en los picos o en la amplitud de los picos y posición de cada espectro los cuales fueron calibrados en su propio pico de cobre, luego el algoritmo del tamaño del pico se uso para extrapolar a los desconocidos, a los espectros standares alacenados. Una región continúa 0.98 - 1.39 KeV se usaron a traves de este estudio el sistema de calibración se hizo a dosis bajas usando albumina de bovino y standares de sales binarios como las que fueron descritas por SHUMAN SOMLYO AND SOMLYO, los picos fueron corregidos para la contribución de la película y la corrección de pérdida de masa se basó con los resultados de <Cantino 1986>.

Todos los análisis de punto fueron hechos con un rastreador de imagenes análogo del modo STEM, excepto el oscurecimiento estacionario que fué usado cuando hizo la medición espacial de la distribución de los elementos a traves de los granulos secretorios y el citoplasma adyacente, un rastreador pequeño de (800 x 1500



Å, fué usado para evitar el tamaño rastreador no fue tan crítico para los análisis citoplasmicos, los cuales se hicieron sobre retículo endoplásmico. En este punto debe ser notable que el Fósforo y el Potasio en sus concentraciones tendieron a ser mayores sobre el retículo endoplásmico que en los espacios citoplásmicos adyacentes a los granulos secretorios, obsérvese la figura 1 y 2 en WONG y otros. El estudio de Test y en la prueba de medidas no paramétrica fueron utilizadas para establecer las insignificancias, estadística y saber si hay alguna diferencia en las concentraciones elementales entre los dos grupos de granulos secretorios solo en los resultados de análisis de punto se analizaron estadísticamente las imágenes elementales digitales de rayos X a 128 x 128 resolución PIXEL, fueron generados usando 2 segundos las cuentas de tiempo vino y el paquete LINK RQ el cual hizo una filtración digital y el ajuste de cuadrados mínimos para cada pixel de los dos fueron filmados o corregidos para pérdida de masa y se expresaron concentraciones de masa seca el correspondiente Pixel de los granulos secretorios fué seleccionado sobre las bases de las juntas de calcio, las mediciones fueron también hechas las distribuciones elementales dentro de 7 glándulas secretorias representativos seleccionando 2 tipos el espectro fué conectado usando una prueba estacionaria de 0.05 Mm de diámetro de granulos, fueron colocados y distribuidos a lo largo de una línea a traves de granulos de las terminaciones del citoplasma 5 de 12 espectros fueron colectados a partir de cada granulo a intervalos de 0.035 - 0.063  $\mu$ .

Las muestras al ser examinadas para microscopía electrónica convencional fueron incubadas como se describe arriba incluyendo la expulsión de 5 minutos en la solución Na. Co. EDTA de cobalto, sodio y fijadas con fijativa aldeida del 2% de Paraformaldeido y 0.5% de Glutaraldeido 1.13%, buffer de fosfato milonig, dejandose a temperatura ambiente o durante toda la noche y después fijadas con Tetra-óxido de Osnio en 1.13% buffer de fosfato milonig por una hora y media, las muestras fueron deshidratadas y graduadas con metanol y en medidas en MED-CAST, las secciones ultradeidas de <400-600Å> fueron cortadas usando un cuchillo de diamante sobre un

microtomo Sorvall-MT-II. Las secciones fueron marcadas con acetato de granillo y Reynold's, los lóbulos de las glándulas labiales para observaciones histoquímicas fueron fijadas en formalina buferada al 10% inmediatamente después de la excisión deshidratadas pasando a través de alcoholes graduados y xileno y en medidas en parafina 5 microsecciones fueron cortadas, desparafinizadas y marcadas con mucicarmina o con PAS con o sin Diastasa y observados con un microscopio Olympus de 10-1000x.

## RESULTADOS

### DESCUBRIMIENTOS MORFOLOGICOS

Los dos tipos de células acinares fueron discernibles en tanto las secciones congeladas en seco, las células con los granulos secretorios prominentes y grandes fueron relativamente más abundantes que la pequeñas con granulos de apariencia frágil más que esto el número de granulos pequeños por célula fue usualmente considerado menor que el número de granulos grandes, con microscopio de luz los granulos grandes fueron fuertemente positivos a la mucicarmina y PAS con y sin diastasa mientras que en las células con granulos pequeños de positividad con estos marcadores.

### DESCUBRIMIENTOS ANALITICOS EN LAS GRANULAS

Las imágenes digitales a partir de las quirosecciones congeladas en seco de las glándulas ya estimuladas mostraron graficamente la distribución elemental y mostraron de manera cualitativa las concentraciones de calcio y azufre y algunas veces de magnesio estas fueron mayores en los granulos secretorios más grandes.

Las mediciones cuantitativas y las concentraciones elementales en los dos tipos de granulos como se obtuvieron a partir del análisis de punto y el mapeo digital confirmaron y extendieron

estos descubrimientos cualitativos y los métodos cuantitativos mostraron que los granulos más grandes tuvieron marcadamente más altas concentraciones de azufre, calcio y magnesio y menores concentraciones de cloro y potasio que los granulos pequeños los análisis del punto mostraron que estas diferencias fueron significativamente estadísticas ( $p < 0.01$ ).

La examinación de la distribución espacial de los elementos dentro de los dos tipos de granulos tuvieron ciertamente similitudes y ciertas diferencias las similitudes envolvían la distribución de fosfato, azufre y calcio en ambos tipos de granulos las concentraciones de fósforo fueron relativamente altas y al límite de los granulos aproximadamente, iguales que las encontradas en el citoplasma esta caída dentro de los granulos. las concentraciones de azufre y calcio fueron mayores que en el citoplasma de los bordes e incrementaron después hacia los centros de ambos tipos de granulos en contraste las distribuciones intragranulares de potasio fueron diferentes para los dos tipos en los granulos grandes la distribución fue similar a la observada para el fósforo cerca de los valores citoplásmicos a los extremos o bordes y decrementaban dentro del interior en los granulos pequeños, las concentraciones de potasio fueron similares a los valores citoplásmicos a lo largo del granulo entero.

## DESCUBRIMIENTOS ANALITICOS EN EL NUCLEO DEL CITOPLASMA

Las concentraciones elementales en los espacios nucleares y citoplásmicos de ambas células acinadas fueron relativamente altas para el potasio, bajas relativamente para el sodio y el cloro no hubo diferencias significativas en las concentraciones elementales nucleares o citoplásmicas entre las células con granulos grandes o pequeños.

## DISCUSION

Las diferencias en los contenidos elementales de los granulos grandes y pequeños. Usando la microscopia electrónica analítica encontramos que los granulos secretorios grandes tenían concentraciones mucho más altas de calcio, azufre y magnesio y concentraciones bajas de potasio y cloro que en los granulos pequeños, y los grandes aparecían en los tipo de células separadas estas diferencias también fueron evidentes con imagenes digitales y con analisis de punto, las significancias fisiológicas de estos descubrimientos no se han establecido pero probablemente refleja diferencias en las cargas protegidas, asociadas con las moléculas secretorias diferentes que contiene los dos tipos de granulos más específicamente nuestra microprueba electrónica, estima al nivel de azufre en los dos tipos de granulos son razonablemente consistentes con las determinaciones químicas previas del contenido de azufre en el moco por ejemplo LOOMIS y otros encontraron que el contenido del sulfato de 2 componentes musinicos o de la musina a partir de la saliva humana sublingual y submandibular fué de 7% y 1.6% respectivamente el 7% correspondería a un sulfato o a las concentraciones del sulfato del peso seco de 729 mmol. de masa seca un valor consistente con Kg. Las concentraciones de azufre encontramos en los granulos, nosotros no podemos hacer una comparación exacta entre los contenidos de azufre del moco medio químicamente y por la microprueba ya que las estimas químicas no valúan otras formas de azufre y también debido a que la composición exacta o del moco de esta glándula no se conoce , sin embargo los descubrimientos a partir de la microscopia analítica son razonablemente consistentes con los valores precedidos también la diferencia en las concentraciones de azufre entre los dos tipos de células más bien de granulos secretorios es probablemente atribuible a las diferencias en sus productos secretorios y que los granulos grandes pueden contener un moco con un contenido de sulfato alto como estos granulos también tienen concentraciones correspondientemente elevadas de calcio y magnesio esto podría ser que estos 2 cationes neutralicen las cargas negativas asociadas con los iones de sulfato y llevan

almacenamiento de las moléculas de moco para el posterior almacenamiento en los granulos como fue sugerido por (Verdugo y otros), nuestros descubrimientos predicen que los granulos secretorios pequeños contendrían menor cantidad de productos sulfatados y también deberían tener menores concentraciones de cationes divalentes esta interpretación se apoya por la correlación positiva encontrada entre los cationes divalentes y las concentraciones de azufre.

### DISTRIBUCION INTRAGRANULAR

Los patrones de las distribuciones elementales dentro de los dos tipos de granulos muestran que nuestro método puede resolver concentraciones intragranulares y extragranulares por ejemplo los incrementos en las concentraciones de azufre dentro del interior de ambos tipos de granulos con respecto a los valores citoplásmicos en contraste el fósforo y el potasio decremantan dentro del interior de los granulos grandes mientras que el fósforo, pero no el potasio decremantan dentro del interior de los granulos pequeños va en contra de la posibilidad de que las concentraciones de potasio tan altas sean una consecuencia artificial de una incapacidad para analizar las diferencias entre los rayos "X" a partir de los granulos pequeños y los que vienen de la parte circunvecina del citoplasma ya que tanto el potasio como el fósforo se encuentran elevados en el citoplasma además estas diferencias tanto en el potasio como en el fósforo dentro de los 2 tipos de granulos como las mediciones en granulos individuales son consistentes con los resultados obtenidos para todos los granulos debido a que el nivel medio de fósforo es bajo y no difiere en los 2 tipos de granulos mientras que el de potasio es mayor en los granulos pequeños es también de interés que no haya diferencias en las concentraciones elementales en el citoplasma y en el núcleo de los 2 tipos celulares aún pensando que las concentraciones elementales de sus granulos secretorios fueron diferentemente significativos.

Comparaciones con descubrimientos anteriores, nuestro traba-

jo indica que hay 2 tipos de células acinares, las cuales contienen granulos secretorios y glándulas labiales humanas estos tipos pueden ser distinguibles al menos bajo condiciones no estimuladas sobre las bases de la composición elemental de sus granulos secretorios, así como por su morfología la comparación de nuestros descubrimientos con microscopía electrónica convencional al compararlos con (DOGGETT y otros 1971). Nos llevan a concluir que las células con granulos secretorios grandes y prominentes corresponden a las células marcadas de manera obscura por DOGGETT's quién lo hizo sobre las bases del marcaje con azul de alcian y que fueron caracterizadas como las productoras de mucosubstancias acídicas de modo similar las células con granulos pequeños corresponden a las células claras determinadas por DOGGETT's, en las bases con Pas y que fueron caracterizadas como las productoras de mucosubstancias neutras, elementos definitivos son consistentes con los de EVERSOLE Y HARRISON y con los de TANDLER; quiénes clasificaron todas las glándulas labiales Y todas las células acinares con mucosas y con nuestro recubrimiento de mucicarmina y PAS dentro de las células glándulares labiales, el significado de estas diferencias no es claro una posibilidad es que los granulos esten asociados con dos tipos celulares maduros e independientes DOGGETT y otros prefirieron esta interpretación ya que ellos observaron que su excitosis de granulos secretorios a partir de ambos tipos celulares en contraste TANDLER y otros han sugerido que los 2 tipos son estadias funcionales, diferentes del mismo tipo celular la resolución de este número requiere estudios de la distribución del DNA, radio marcado y generaciones subsecuentes de los 2 tipos celulares nuestros descubrimientos elementales son también consistentes con los descubrimientos histoquímicos de DOGGETT y otros así como sus observaciones en las concentraciones de electrolíticos críticos y sus marcajes con azul de alcian indican que las células obscuras tienen altos contenidos de sulfato más que las células claras aquí nuestras mediciones por microscopía analítica soportan o apoyan la premisa histoquímica que el mantenimiento de la unión con el azul o el marcaje azul con el alcian va de acuerdo al incremento en las concentraciones de cloruro de magnesio lo cual refleja incremento en los grados de

sulfatación. EVERSOLE mostró que las células mucosas de la glándula labial pueden ser además subclasificadas usando técnicas histoquímicas pero tales diferencias no son aparentes con nuestro método.

Efectos previos al descubrimiento, la existencia de los 2 tipos de células acinares en la glándula labial humana afecta algunas de nuestras observaciones previas en diferentes concentraciones elementales intracelulares en las glándulas a partir de pacientes con fibrosis quística, luego nosotros no podríamos distinguir entre los 2 tipos de células acinares y encontramos que no había diferencia relacionada con el mal en las concentraciones elementales ni nucleares o citoplasmicas pero si encontramos evidencia a un incremento asociado al mal en las concentraciones de sodio y azufre en los granulos secretorios con este descubrimiento no encontramos diferencias en las concentraciones elementales ni en el citoplasma, ni en el núcleo de los 2 tipos de células acinares en la glándula normal los descubrimientos anteriores de no observar cambios relacionados con la enfermedad en una población mixta de los 2 tipos celulares siguen siendo válidos pero nuestros descubrimientos anteriores para los granulos secretorios ahora son sospechosos debido a un cambio en la forma de hacer la muestra con muestreo de más de los granulos grandes en la fibrosis quística que en los tejidos normales, lo cual nos pudo haber dado la impresión de un incremento en la concentración de azufre, sin embargo cualquier tipo de muestreo no nos podía haber servido para ver las diferencias con la enfermedad de la fibrosis quística y las concentraciones de sodio, la existencia de 2 tipos celulares de células acinares también complica la interpretación de los resultados para la liberación de Potasio a partir de las rebanadas de la glándula labial humana, las primeras interpretaciones fueron un estima del porcentaje promedio de la liberación de potasio total de la glándula obviamente si solo uno de los 2 tipos de células acinares libera potasio después de la acción de antagonistas específica entonces los cambios intracelulares, en las concentraciones de potasio serían apreciablemente mayores que el promedio calculado además

sería importante en estudios futuros establecer específicamente la respuesta a la liberación de potasio para los 2 tipos de células acinares de la glándula labial.

Comparaciones con concentraciones elementales en otros granulos secretorios. Las concentraciones de calcio de  $162 \pm 7$  mmol/kg de masa seca para las glándulas secretorias grandes de las glándulas labiales humanas se acerca a los valores de 147 mmol/kg de masa seca obtenidas de granulos mucosos en la glándula submandibular de perro por SAAKI y colaboradores 1983. Pero aparentemente difiere a partir de los 78 mmol/kg de masa seca obtenida de las glándulas mucosas en las glándulas submandibulares de la rata por MULLER y colaboradores de modo similar, las concentraciones de calcio en 1985.

Nuestras glándulas grandes se acercan a los valores de los  $105 \pm 18$  con una desviación estandar de mmol/kg de masa seca obtenida en granulos mucosos a partir de las células de GOBLET, en las secciones de la tráquea de congelamiento rápido (VILLALON M. VERDUGO P. Y JOHNSON D.). Las concentraciones más altas de Ca fueron después reportadas en granulos mucosos la cual es de 2.3 mol/kg de masa seca en granulos secretorios a partir de la Ario-limax, COLUMBIANUS VERDUGO y colaboradores además las concentraciones de Ca en granulos mucosos estan relacionada razonablemente a lo largo de los tejido de los mamíferos hay relativamente pocas estimas con micropruebas electrónicas de las concentraciones de azufre en todos los tipos de granulos secretorios nuestros descubrimientos de 775 mmol/kg de masa seca en los granulos grandes es significativamente mayor que los 166 mmol/kg de masa seca reportada por Muller y colaboradores para los granulos mucosos de las glándulas submanila mucosas de rata (ISUTSU AND JOHNSON, 1986) y también de los 390 mmol/kg de masa seca en las glándulas arteriales de la rata los 82 mmol/kg de masa seca en los granulos zynogenos pancreáticos de rata también es de interés el contenido de azufre de los granulos serosos de las parótidas de rata 536 mmol/kg de masa seca es considerablemente mayor que en granulos pequeños de las glándulas labiales humanas 327 mmol/kg de



masa seca.

El Ca y el azufre son importantes características que distinguen a diferentes tipos de granulos secretorios y las concentraciones de Ca y azufre son generalmente significativamente mayores en la mucosa que en granulos serosos, nuestros descubrimientos son de que los granulos secretorios en los 2 tipos de células acinares de las glándulas secretorias salivales labiales humanas contienen marcadamente diferentes concentraciones elementales, la cuales probablemente reflejan diferencias marcadas en sus productos de excreción, el contenido granular de azufre, se cree que refleja el contenido de sulfato en los granulos; se cree que proviene de requerimientos de electroneutralidad al almacenamiento de las macromoléculas, estos principios probablemente son aplicables a otros granulos secretorios de glándulas salivales también.

Table 1. Comparison of elemental concentrations in cytoplasm, nuclei and secretory granules in the two types of labial gland acinar cells

Cell type	Elemental concentrations (mmol/kg dry mass)						
	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca
Acinar cells with large granules							
Cytoplasm ( $n = 23$ )	$113 \pm 10$	$41 \pm 3$	$471 \pm 24$	$180 \pm 14$	$108 \pm 9$	$423 \pm 23$	$12 \pm 3$
Nucleus ( $n = 14$ )	$103 \pm 9$	$50 \pm 3$	$485 \pm 31$	$176 \pm 14$	$178 \pm 16$	$580 \pm 36$	$0 \pm 1$
Granules ( $n = 59$ )	$74 \pm 6$	$79 \pm 5^*$	$112 \pm 6$	$775 \pm 29^*$	$108 \pm 9^*$	$213 \pm 12^*$	$162 \pm 7^*$
Acinar cells with small granules							
Cytoplasm ( $n = 22$ )	$128 \pm 14$	$52 \pm 1$	$573 \pm 25$	$180 \pm 14$	$119 \pm 9$	$518 \pm 18$	$7 \pm 1$
Nucleus ( $n = 15$ )	$85 \pm 9$	$54 \pm 4$	$537 \pm 29$	$161 \pm 18$	$180 \pm 18$	$624 \pm 38$	$0 \pm 1$
Granules ( $n = 58$ )	$95 \pm 6$	$48 \pm 4$	$125 \pm 11$	$327 \pm 13$	$182 \pm 10$	$391 \pm 18$	$81 \pm 4$

\* $p < 0.01$  by both the Student's  $t$ -test and the non-parametric median test. Values are means  $\pm$  SEM.

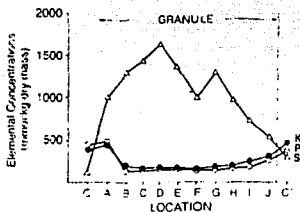


Fig. 4. Spatial distribution of S, K and P across a representative large secretory granule. Note that S is high within the interior of the granule, while K and P are lower than in the cytoplasmic space adjacent to the granule (C' and C').

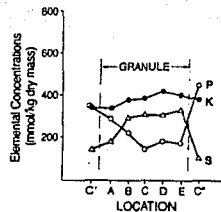


Fig. 5. Spatial distribution of S, K and P across a representative small secretory granule. Note that S is high relative to cytoplasmic levels (C', C'), that P is low, and that K is close to cytoplasmic levels within the interior of the granule.

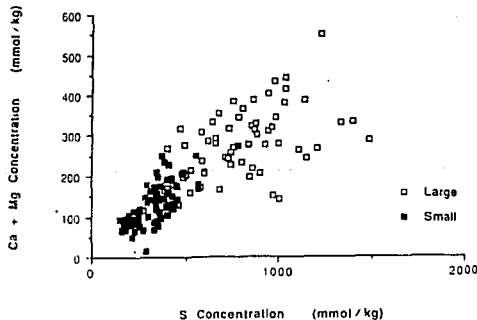


Fig. 6. Relationship between sum of Ca and Mg concentrations versus S concentrations in large and small secretory granules in labial gland acinar cells from a representative subject. The significant correlation ( $p = 0.0001$ ,  $R^2 = 0.61$  for all granules,  $R^2 = 0.51$  for small granules and  $R^2 = 0.32$  for large granules) supports the hypothesis that the divalent cations neutralize charges associated with sulphate in mucus molecules, thereby allowing molecular condensation within granules. Similar regression relationships were obtained for results from the other two subjects.

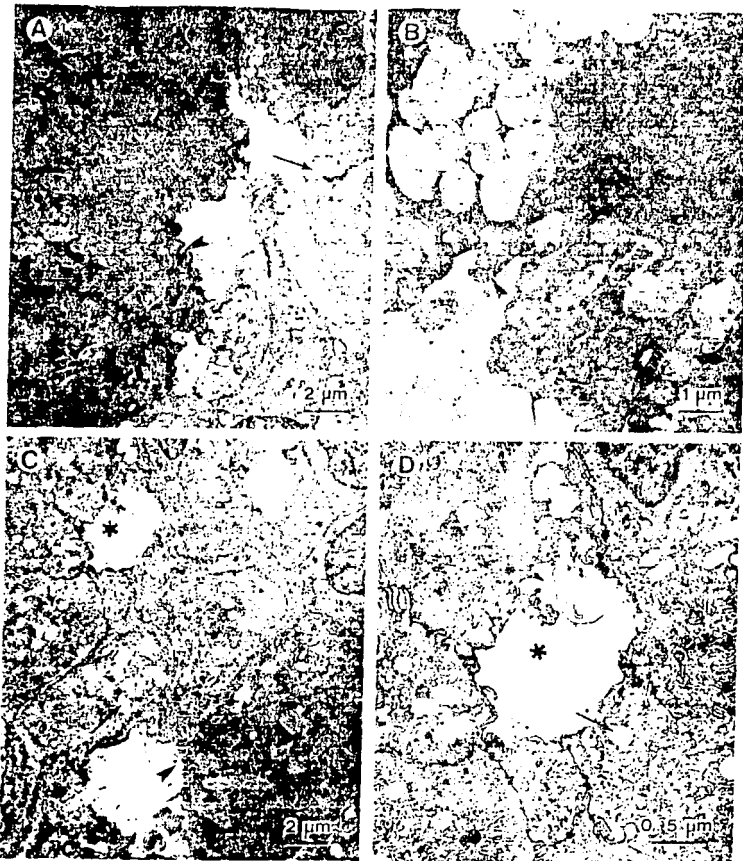
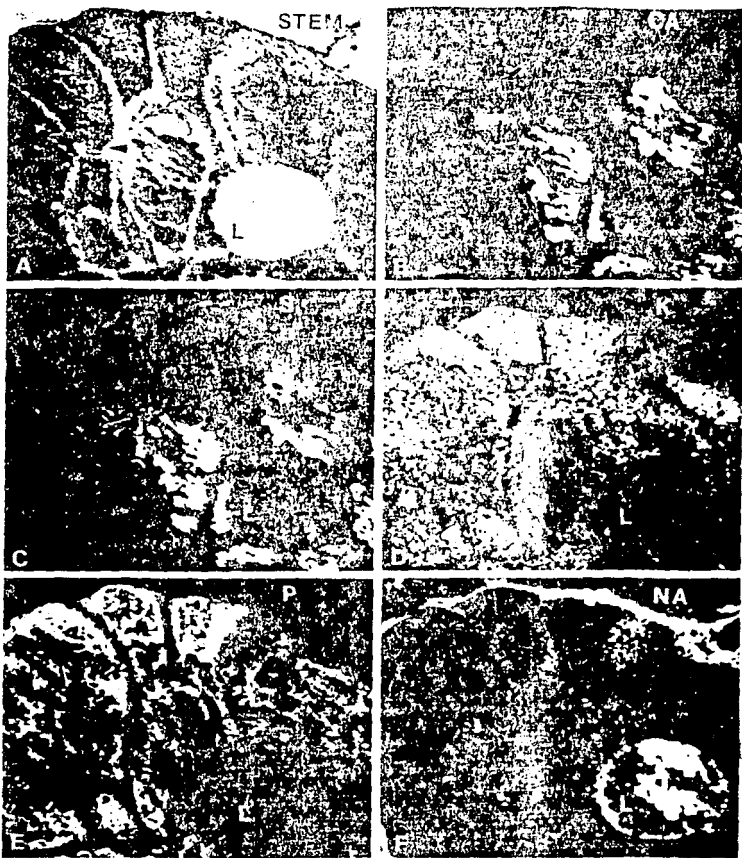


Plate 1



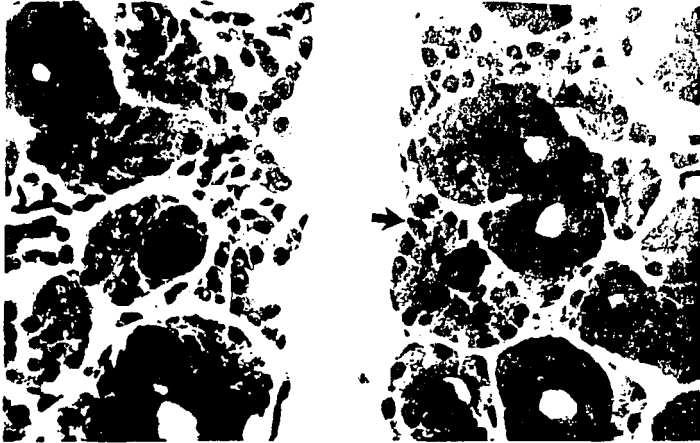


Plate 3

## REFERENCES

- Allan B. J., Izutsu K. T., Ramsey B. W., Schubert M. M., Ensign W. Y. and Truelove E. L. (1990) Cyclic AMP and cyclic GMP responses of labial glands from controls and cystic fibrosis patients. *Am. J. Physiol.* **258**, R1320-R1326.
- Balrzi S. and Selinger Z. (1973) Enzyme secretion mediated by the epinephrine  $\beta$ -receptor in rat parotid slices. *J. Biol. Chem.* **248**, 356-360.
- Bhaskar S. N. (1980) *Orban's Oral Histology and Embryology*. C. V. Mosby Co., St Louis, MO.
- Bridge J. H. B., Bersohn M. M., Gonzalez F. and Bassingthwaite J. B. (1982) Synthesis and use of radio cobaltic EDTA as an extracellular marker in rabbit heart. *Am. J. Physiol.* **242**, H671-H676.
- Cantino M. E., Wilkinson L. E., Goddard M. K. and Johnson D. E. (1986) Beam induced mass loss in high resolution biological microanalysis. *J. Microsc.* **144**, 317-327.
- Doggett, R. G., Bentinck B. and Harrison G. M. (1971) Structure and ultra-structure of the labial salivary glands in patients with cystic fibrosis. *J. clin. Path.* **24**, 270-282.
- Eversole L. R. (1972) The histochemistry of mucosubstances in human minor salivary glands. *Archs oral Biol.* **17**, 1225-1239.
- Hall T. A. and Gupta B. L. (1982) Quantification for the X-ray microanalysis of cryosections. *J. Microsc.* **126**, 333-345.
- Hall T. A., Anderson H. C. and Appleton T. (1973) The use of thin specimens for X-ray microanalysis in biology. *J. Microsc.* **99**, 177-182.
- Harrison J. D. (1974) Minor salivary glands of man: enzyme and mucosubstance histochemical studies. *Histochem. J.* **6**, 633-647.
- Izutsu K. T. and Johnson D. E. (1986) Changes in elemental concentrations of rat parotid acinar cells following pilocarpine stimulation. *J. Physiol.* **381**, 297-309.
- Izutsu K., Johnson D., Schubert M., Wang E., Ramsey B., Tamarré A., Truelove E., Ensign W. and Young M. (1985) Electron microprobe analysis of human labial gland secretory granules in cystic fibrosis. *J. clin. Invest.* **75**, 1951-1956.
- Izutsu K. T., Schubert M. M., Truelove E. L. and Johnson D. E. (1987) Use of human minor salivary glands in basic and applied secretion research. *J. dent. Res.* **66**, 654-659.
- Izutsu K., Ensign W., Ramsey B., Schubert M., Allan B. and Truelove E. (1988) Autonomic regulation of potassium release from human labial salivary glands *in vitro*. *Archs oral Biol.* **33**, 519-523.
- Izutsu K. T., Ensign W. Y., Ramsey B. W., Schubert M. M., Allan B. J. and Truelove E. L. (1989) Potassium release in labial glands from controls and patients with cystic fibrosis. *Lab. Invest.* **60**, 155-160.
- Johnson D., Izutsu K., Cantino M. and Wong J. (1988) High spatial resolution spectroscopy in the elemental microanalysis of biological systems. *Ultramicroscopy* **24**, 221-236.
- Kitazawa T., Shuman H. and Somlyo A. P. (1983) Quantitative electronprobe analysis: problems and solutions. *Ultramicroscopy* **11**, 251-262.
- Loomis R. E., Prakobphol A., Levine M. J., Reddy M. S. and Jones P. C. (1987) Biochemical and biophysical comparison of two mucins from human submandibular-sublingual saliva. *Archs Biochem. Biophys.* **258**, 452-464.
- Mangos J. A. (1981) Isolated parotid acinar cells from patients with cystic fibrosis. Functional characterization. *J. dent. Res.* **60**, 797-804.
- Muller R. M., Kuijpers G. A. J., Bardón A., Ceder O. and Roomans G. M. (1985) The chronically pilocarpine-treated rat in the study of cystic fibrosis: investigations on submandibular gland and pancreas. *Expl. Molec. Path.* **43**, 97-106.
- Ornberg R. L., Kuijpers G. A. and Leapman R. D. (1958) Electron probe microanalysis of the subcellular compartments of bovine adrenal chromaffin cells. Comparison of chromaffin granules *in situ* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **263**, 1488-1493.
- Sasaki S., Nakagaki I., Mori H. and Imai Y. (1983) Intracellular calcium store and transport of elements in acinar cells of the salivary gland determined by electron probe X-ray microanalysis. *Jap. J. Physiol.* **33**, 69-83.
- Sheehan D. C. and Hrapchak B. B. (1973) *Theory and Practice of Histochemistry*, pp. 92-93. C. V. Mosby Co., St Louis, MO.
- Shuman H., Somlyo A. V. and Somlyo A. P. (1976) Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: methods and validity. *Ultramicroscopy* **1**, 317-339.
- Somlyo A. V., Broderick R., Shuman H., Buhle E. L. and Somlyo A. P. (1988) Atrial specific granules *in situ* have high calcium content, are acidic and maintain anion gradients. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 6222-6226.
- Statham P. J. (1987) Quantitative digital mapping with drift compensation. *Analyt. Electron Microsc.* pp. 187-190.
- Tandler B., Denning C. R., Mandel I. D. and Kutscher A. H. (1969) Ultrastructure of human labial salivary glands. I. Acinar secretory cells. *J. Morph.* **127**, 383-408.
- Verdugo P., Deyrup-Olsen I., Aitken M., Villalon M. and Johnson D. (1987) Molecular mechanism of mucin secretion: I. The role of intragranular charge shielding. *J. dent. Res.* **66**, 506-508.
- Wong J. G., Cantino M. E., Wilkinson, L. E., Izutsu K. T. and Johnson D. E. (1987) Quantitative elemental analysis of digital X-ray images. *Analyt. Electron Microsc.* pp. 191-194.
- Wong J. G., Wilkinson L., Chen S., Izutsu K., Johnson D. and Cantino M. (1989) Quantitative imaging in the analytical electron microscope. *Scanning* **11**, 12-19.

## CONCLUSIONES

La diferencia encontrada en los contenidos elementales con microscopía electrónica analítica encontraron granulos secretorios grandes que tenían concentraciones altas de Ca, S, Mg.

Mediante este método se resuelve concentraciones intragranulares y extragranulares.

Los granulos grandes era un tipo de célula acinar oscura que producía mucosubstancia acidica y los granulos pequeños a el otro tipo de célula acinar clara productoras de mucosubstancia neutra.

## INTRODUCCION

Determinarán las funciones neuroreguladoras de la substanci P y la B-endorfina y una serie de funciones fisiológicas incluyendo estados emocionales, cual es su composición, distribución, lugar de localización, así como algunos materiales de estudio.



## QUINTO ARTICULO

# INMUNOREACTIVIDAD DE LA METIOTINA SIMILAR A ENCEFALINA SUBSTANCIA SIMILAR P Y LA SIMILAR A LA B-ENDORSINA EN LA SALIVA DE LAS PAROTIDAS HUMANAS

### INTRODUCCION

La sustancia P, la encefalina Met-encefalina y la B-endorsina son europeptidos con funciones neuroregulatorias, estos peptidos se cree que estan envueltos en una serie de funciones fisiológicas incluyendo estados emocionales coordinación de procesos vasculares, procesos hormonales y la regulación de la temperatura, sin embargo ellos son tal vez más ampliamente reconocidos por sus papeles en la recepción de la sustancia P es un peptido tacikinino que se cree que es un neuro transmisor liberandolo a partir de las fibras que estan envueltas en la transmisión del dolor la met-encefalina y la B-endocina son peptidos opioides endogenos que se cree que inhiben la liberación de la sustancia P a partir de fibras del dolor modulando la transmisión de impulsos de dolor al cerebro la amplia distribución de los neuropeptidos en sus multifacéticos papeles fisiológicos han llevado a los investigadores a buscar por distintas fuentes de neuropeptidos que pueden ser muestreados rapidamente con técnicas invasivas mínimas, los recientes intereses se enfocan a la saliva humana debido a que esta puede ser colectada de una manera mucho menos invasiva a partir del fluido cerebro espinal o el plasma dos fluidos muy usualmente utilizados para monitoriear las funciones fisiológicas.

La inmuno-reactividad de la encefalina y la sustancia P, a dos peptidos similares han sido medidos en su totalidad de saliva pero su secreción a partir de una glándula en particular no ha sido encontrada. Hemos hecho un estudio exploratorio y descriptivo de neuropeptidos opioides endogenos y la tacikinina en la saliva de la parotida humana.

La saliva de la parotida fue muestreada en lugar de la saliva total debido a que se quería una muestra glándular más pura.

## SUBSTANCIA P

La Substancia P es un peptido de 11 amino-acidos derivado a partir de un precursor llamado protacina se distribuye en todo el sistema nervioso periférico central la inmunoreactividad del peptido similar a la substancia P ha sido medido en fluido cerebro espinal humano plasma, pulpa de los dientes y saliva. La substancia P se cree que esta envuelta en una serie de funciones biológicas.

Actividad sialógica, efectos vasculares, la contracción del músculo liso, analgesia, despolarización de las motoneuronas espinales, regulación del hipotálamo hipófisis un rol excitatorio en los ganglios simpáticos un rol inhibitorio en paraneuronas adrenales y las células medulares y un incremento de la fagocitosis por macrófagos de ratón y leucocitos polimorfonucleares humanos. La Met-enkefalina este es un pentapeptido derivado a partir de preproenkefalina a la Met-enkefalina y la inmunoreactividad de un peptido similar a la Met-enkefalina han sido medidos en el fluido cerebro-espinal humano en el plasma en la pulpa de los dientes en la porción mineralizada del diente y en la saliva. Las enkefalinas pueden mediar el dolor, las respuestas emocionales y las funciones cardiorespiratorias ellas también se cree también que juegan un papel importante en los sistemas interneuronales en la regulación neuroendocrina y en la función de los ganglios basales las enkefalinas son comunmente reconocidas como neurotransmisores en los sistemas endogenos inhibidores del dolor y pueden posiblemente inhibir la liberación de substancia P decreciendo el rango de disparo de las fibras de dolor que contienen substancia P. La B-endorfina humana consiste en una secuencia de 31 amino-acidos derivados a partir de una prohormona llamada proopiomelanocortina, esta distribuida en el sistema nervioso periférico central la inmunoreactividad de un

peptido similar a la B-endorfina ha sido detectada en el páncreas, la placenta, el fluido cerebro espinal, el plasma, el semen y la pulpa de los dientes esta B-endorfina se cree que juega un papel moduladorio en muchos procesos fisiológicos, en la regulación hormonal en la percepción del dolor en la modulación de la temperatura del cuerpo y en el grado de transformación de algunas substancias neurotransmisoras en las estructuras del cerebro.

## MATERIALES Y METODOS

Las muestras salivales de las parotidas fueron colectadas a partir de individuos saludables libres de dolor usando tazas estériles de Carlson-Crittenden hechas a partir de polietileno de ultra alto peso molecular 1900 de resina y 1900 de polietileno con tubos de acero que conectaban a estos.

El grupo consistió de 17 mujeres y 14 hombres con una edad de 22 y 61 años con una media de 31.4, algunos individuos fueron utilizados más de una vez, los aparatos de Carlson-Crittenden fueron fijados sobre el ducto de Stenson's de cada sujeto el flujo salival fue estimulado colocando piezas de dulce de limón en el piso en la parte baja de la boca el flujo salival fue mucho mayor al combinar ácido acético y azúcar más que en los primeros intentos con una solución de 2% de ácido cítrico colocado sobre la lengua las muestras salivales fueron acidificadas después de ser colectadas con ácido acético congelado glacial para minimizar la degradación de los neuropeptidos, las muestras fueron congeladas a 14°C bajo cero después de su colecta, 2 muestras de 3 ml fueron colectadas en la mañana de 7 a 9 a. m. y en la tarde de 5 a 7 p. m. del mismo día para cada sujeto las muestras de la mañana y de la tarde fueron guardadas de manera separada para observar las diferencias diurnas en un principio lo que se deseaba era obtener diferencias individuales con el paso del tiempo pero las pruebas iniciales mostraron que el radioinmuno análisis no podría detectar los neuropeptidos aún a partir de muestrs de 10 ml no sabiendo que tanto volumen de saliva se necesitaba de una manera conservativa

combinamos los grupos de 9 sujetos para un total de 5 grupos en retrospectiva con 20-25 ml de la saliva de las parotidas por cada sujeto será suficiente para cuantificar los 3 neuropeptidos.

## EXTRACCION DE SALIVA

Las fracciones ricas en peptidos a partir de las muestras salivales fueron obtenidas para radio inmuno análisis usando un Sep-Pak de  $C_{18}$  en paquetes desechables y otro Sep-Pak con fase reversa también de  $C_{18}$  se preparó con lavados secuenciales de 4 ml de metanol, 4 ml de líquido de cromatografía de alto grado,  $H_2O$  y 8 ml de 0.1% de TFA, las muestras acidificadas de saliva fueron puestas y aplicadas al Sep-Pak lavadas por 4 ml de una muestra de un diluyente al 0.1% de TFA y eluidas con 3.4 ml de acetonitrilo al 100%, el eluido fue colocado de una manera manual y evaporado bajo gas de Nitrógeno, las muestras fueron almacenadas a  $-70^{\circ}C$  hasta su estudio.

## RADIOINMUNOANALISIS

Los Kits de radioinmunoanálisis comercial fueron usados, el procedimiento para Met-enkefalina un buffer uso fosfato de BSA, albumina de suero de bovino un estandar sintético de Met-enkefalina y un antisuero contra Met-enkefalina P.

Met-enkefalina marcada radioactivamente marcada con  $I^{125}$  y un precipitante de gama globulina de conejo y un saturado con amonio y sulfato el esquema usado para la substancia P uso un buffer de peptona de albumina de suero de bovino un estandar de substancia P sintético antisuero contra substancia P de conejo, substancia P marcada radioactivamente con  $I^{125}$  y un precipitador de gamma globulina de conejo y fueron saturados. con amonio, sulfato el procedimiento para B-endorcina tambien uso 1% de un buffer de albumina de suero bovino con borato de BSA un standar de B-endorcina

sintético un antisuero contra B-endorcina de conejo B-endorcina marcada con  $I^{125}$  y un precipitador de suero de conejo, las muestras fueron procesadas y vistas que tenían B-encefalina y substancia P incubadas por biceptores a 4.5° se usaron curvas standares a 45°C diluciones seriadas de los neuropeptidos sintéticos las mediciones fueron marcadas como inmunoreactividad de los peptidos similares a los neuropeptidos originales más que por los especificos nombres debido a que los peptidos fueron cuantificados usando un radio-inmuno-análisis de otras técnicas capaces de obtener la secuencia de aminoácidos es necesario antes de que las substancias puedan ser definidas, cuantificadas de una manera inequívoca.

## RESULTADOS

Relativo a la edad y género los sujetos fueron asignados de una manera asarosa a uno de los cinco grupos cada uno contenía 9 sujetos, un análisis de varianzas fue calculado para probar la edad por grupo, no hubo diferencias significativas en las edades con un F 0.5 y una P 0.76 de manera similar el rango de variación de los grupos no fue significativamente diferente.

Los datos de la mañana y de la tarde medidos en la mañana y en la tarde se enlistan en la tabla número 1 y el resumen estadístico en la tabla número 2 cuando se analizaron para observar los cambios dividimos en concentraciones una prueba variada, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de peptidos similares B-encefalina o para B-endorcina.

En contraste se encontró una diferencia significativa para la inmunoreactividad de la substancia similar a la substancia con las concentraciones de la mañana que empezaban a ser mayores.

El análisis de correlación fue usado para probar la posible asociación entre las diferentes medidas, esto es si existía

cualquier dependencia biológica entre las concentraciones de la inmunoreactividad de cualquiera de los péptidos y con respecto a los otros, los coeficientes de correlación entre las concentraciones de las sustancias Met-enkefalina y la similar a la sustancia P no fue significativa con una  $r$  de 0.34 y una  $P$  de 0.34 tampoco la correlación entre las concentraciones de Met-enkefalina y B-endorfina fue significativa una  $r$  de 0.29 y una  $P$  de 0.42 entre las concentraciones de las sustancias P y de la B-endorfina en sus actividades de estas una  $r$  de 0.63 y una  $P$  de 0.05 que se ve en la figura 1, esta asociación positiva para un tercio de la variación entre las medidas para estos dos neuropeptidos.

## DISCUSION

Uno de los méritos de analizar la saliva es como un indicador potencial fisiológico, la saliva puede ser colectada de una manera fácil y repetidamente y su colección es esencialmente no invasiva recientemente los niveles de neuropeptidos han sido medidos en la saliva para estudiar la transmisión del dolor en los humanos la inmunoreactividad de sustancias similares a la enkefalina y a la sustancia p han sido medidas en la saliva total el método activo para la colecta de saliva, puede ser muy útil en la evaluación de diagnósticos y tratamientos de dolores crónicos de individuos y tal vez con condiciones fisiopatológicas similares o diferentes a esto de manera corriente en la actualidad no existe un marcador objetivo fácil de obtener para correlacionar el dolor crónico.

## PAROTIDA CONTRA SALIVA TOTAL

La saliva total contiene muchos materiales aparte de las secreciones glandulares incluyendo el fluido crevicular gingival de células epiteliales orales, microorganismos, remanentes de comida y leucocitos los cuales pueden interferir con la identificación de neuropeptidos y proteínas debido a que ellos contienen enzimas llamadas peptidasas los cuales pueden degradar las sustancias

antes de que ellas puedan ser detectables hay más enzimas de la saliva total que se originan principalmente a partir de microorganismos y de las células propederas degenerativas. Inmunoreactividad de los peptidos similares a los neuropeptidos originales.

Las inmunoreactividades para la substancia P, la Met-enkefalina y la B-endorfina fueron detectadas en todas las muestras salivales de parotidas muestreadas, estas se ven en la tabla 1 los rangos fueron entre 6.6 y 11.7 fmol de peptidos similar a Met-enkefalina por cada inmunoreactividad por ml y 6.1 a 12.6 fmol de substancia P y 1.2 a 3.6 fmol de B-endorfina debido a que la medición de la inmunoreactividad de los peptidos similares a los neuropeptidos mencionados no ha sido previamente reportados en la saliva de las parotidas humanas nuestros resultados pueden ser comparados solamente con aquellos que provienen de la saliva total. Tepperman y colaboradores reportaron un rango de inmunoreactividad en los peptidos similar a la enkefalina en la saliva total humana de un 72-604 fmol/ml que no era significativo con diferencias en edades y géneros.

Parris y colaboradores reportaron una inmunoreactividad importante de la substancia P para la saliva total humana 112 mol/ml Nicolodi y Bianco encontraron un rango para esa substancia de 3.1 a 70 fmol/ml en la inmunoreactividad de la P-enkefalina en la saliva humana no ha sido reportada por nuestro mejor conocimiento en general los niveles de inmunoreactividad de substancias parecidas a los neuropeptidos que nosotros encontramos fueron debajo de las reportadas en la saliva total, esto no es sorprendente ya que los resultados para la metencefalina fueron abajo de la inmunoreactividad de la enkefalina reportada por Tepperman y colaboradores ya que ellos usaron un anticuerpo que reconoce tanto lo me YGG+M Leuencefalina YGGFL de hecho el anticuerpo fue reportado como para tener el doble de mayor afinidad para Leu como para Met-enkefalina las diferencias en la inmunoreactividad de los diferentes neuropeptidos en las parotidas humanas y en la saliva total podría ser atribuido a muchos factores incluyendo diferencias en las fuentes de la saliva en las

diferentes glándulas las muestras de los sujetos, las técnicas de colecta las preparaciones de las muestras el procesamiento de ellas y la especificidad de los anticuerpos usados.

## LA INMUNOREACTIVIDAD DE B-ENDORFINA

Con una P de 0.12, podría ser significativamente mayor actividad en la mañana más que en la media hora con una P de 0.01 de la tarde los cambios diurnos en la actividad de met-enkefalina han sido encontrados en el cerebro de rata y en el tejido de la pituitaria los cuales fueron mayores cerca de la media noche anteriores de obscuridad medida y no hubo cambios mayores cerca de la actividad de la Met-enkefalina en el plasma humano sobre el interior mayor de 24 horas los cambios dimos en la inmunoreactividad de la defermentina se ha visto en el plasma humano en el fluido humano cerebro espinal en el plasma de la rata y en el lóbulo intermedio de hipófisis de la rata todos los estudios encontraron una concentración más elevada en la mañana.

En la radioactividad de la sustancia P no han sido reportadas en estudios, ni con animales, ni con humanos, otros aspectos de importancia en comportamiento matutino de neuropeptidos permanece en la mayoría de los casos en un solo nivel.



Table 1. Methionine-enkephalin-like (ME-li), substance P-like (SP-li) and  $\beta$ -endorphin-like (BE-li) immunoreactivities measured in five groups of parotid saliva samples (fmol/ml)

Group	Time	ME-li	SP-li	BE-li
1	a.m.	9.5	9.6	3.2
	p.m.	10.0	6.1	1.7
2	a.m.	11.7	10.5	2.7
	p.m.	10.1	7.9	3.6
3	a.m.	7.1	9.6	2.5
	p.m.	7.7	6.5	1.2
4	a.m.	8.3	10.9	3.4
	p.m.	6.6	8.9	2.2
5	a.m.	11.5	12.6	3.4
	p.m.	10.6	10.0	1.8

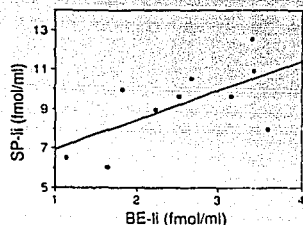


Fig. 1. Bivariate plot showing the positive association ( $r = 0.63$ ) between concentrations of  $\beta$ -endorphin-like (BE-li) and substance P-like (SP-li) immunoreactivity.

Table 2. Descriptive statistics from the radioimmunoassays

Time	Mean (fmol/ml)	SD	Range
<i>Methionine enkephalin-like immunoreactivity</i>			
a.m.	9.6	2.0	3.1-11.7
p.m.	9.0	1.7	6.6-10.6
All Samples	9.3	1.8	6.6-11.7
<i>Substance P-like immunoreactivity</i>			
a.m.	10.7	1.2	9.6-12.6
p.m.	7.9	1.6	6.1-10.0
All Samples	9.3	2.0	6.1-12.6
<i><math>\beta</math>-Endorphin-like immunoreactivity</i>			
a.m.	3.0	0.4	2.5-3.4
p.m.	2.1	0.9	1.2-3.6
All Samples	2.6	0.8	1.2-3.6

#### REFERENCES

- Barreca T., Siani C., Franceschini R., Francaviglia N., Messina V., Perra C. and Rolandi E. (1986) Diurnal beta-endorphin changes in human cerebrospinal fluid. *Life Sci.* **38**, 2263-2267.
- Blumberg S. and Teichberg V. I. (1982) *Regulatory Peptides: from Molecular Biology to Function* (Eds Costa E. and Trabuechi M.), p. 455. Raven Press, New York.
- Chauncey H. H., Borkan G. A., Waylor A. H., Feller R. P. and Kapur K. K. (1981) Parotid fluid composition in healthy aging males. *Adv. Physiol. Sci.* **28**, 323.
- Clement-Jones V., Lowry P. J., Rees L. H. and Besser G. M. (1980) Development of a specific extracted radioimmunoassay for methionine enkephalin in human plasma and cerebrospinal fluid. *J. Endocr.* **85**, 231-243.
- Comb M., Seeburg P. H., Adelman J., Eiden L. and Herbert E. (1982) Primary structure of the human met-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* **295**, 663-666.
- Cosman R. A., Fitzgerald R. J. and Schaefer S. J. (1976) Role of salivary factors in the nitrogen metabolism of plaque-forming oral streptococci. In *Proceedings Microbial Aspects of Dental Caries* (Eds Stiles H. M., Loesche W. J. and O'Brien T. C.), Vol. 2, p. 465. Informatics, New York.
- Cox B. M. and Baizman E. R. (1982) Physiological functions of endorphins. In *Endorphins: Chemistry, Physiology, Pharmacology, and Clinical Relevance* (Eds Malick J. B. and Bell R.), pp. 113-196. Marcel Dekker, New York.
- Dent R. R. M., Guilleminault C., Albert L. H., Posner B. I., Cox B. M. and Goldstein A. (1981) Diurnal rhythm of plasma immunoreactive  $\beta$ -endorphin and its relationship to sleep stages and plasma rhythms of cortisol and prolactin. *J. Clin. Endocrin. Metab.* **52**, 942-947.
- Desiderio D. M. (1984) *Analysis of Neuropeptides by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry*, pp. 16-19. Elsevier, Amsterdam.
- Desiderio D. M. (1991) Mass spectrometry of biologically important neuropeptides. In *Mass Spectrometry of Peptides* (Ed. Desiderio D. M.), pp. 367-400. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Desiderio D. M., Kai M., Tanzer F. S., Trimble J. and Wakely C. (1984) Measurement of enkephalin peptides in canine brain regions, teeth, and cerebrospinal fluid with high performance liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **342**, 245-250.
- Ekström J. (1989) Autonomic control of salivary secretion. *Proc. Finn. Dent. Soc.* **85**, 323-331.
- von Euler U. S. and Pernow B. (1977) *Substance P*. Raven Press, New York.

- Gaivne R., Petsche U., Lembeck F. and Jansson G. (1982) Capsaicin applied to peripheral nerve inhibits axoplasmic transport of substance P and somatostatin. *Brain Res.* **239**, 447-462.
- Gibbins I. L. (1990) Target-related patterns of co-existence of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide, enkephalin and substance P in cranial parasympathetic neurons innervating the facial skin and exocrine glands of guinea-pigs. *Neuroscience* **38**, 541-560.
- Hall M. E. and Stewart J. E. (1983) Substance P and behavior: opposite effects of N-terminal and C-terminal fragments. *Peptides* **4**, 763-768.
- Heimer L. (1983) *The Human Brain and Spinal Cord: Functional Neuroanatomy and Dissection Guide*. Springer, New York.
- Henry J. L. (1976) Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord. *Brain Res.* **114**, 439-451.
- Hökfelt F., Johansson O., Kollerthor J. O., Ljungdahl A. T., Nilsson G., Nygård A. and Pernow B. (1977) Immunohistochemical distribution of substance P. In *Substance P* (Eds von Euler U. S. and Pernow B.), pp. 117-145. Raven Press, New York.
- Holladay J. W. (1965) *Endogenous Opioids and their Receptors*. The Upjohn Co., Kalamazoo, MI.
- Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A. and Morris H. R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **258**, 577-569.
- Jessell T. M. (1983) Nociception. In *Brain Peptides* (Eds Krieger D. T., Brownstein M. J. and Martin J. B.), pp. 315-328. Wiley, New York.
- Junquera I. C. et al. (1983) *Basic Histology*, 4th edn, pp. 441-346. Lange Medical Publications, Los Altos, CA.
- Kakidani H., Furutani Y., Takahashi H., Noda M., Morimoto Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Nakanishi S. and Numa H. (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-endorphin/dynorphin precursor. *Nature* **298**, 245-249.
- Kandel D. R. and Schwartz J. H. (1985) *Principles of Neural Science*, 2nd edn, p. 338. Elsevier, Amsterdam.
- Kerr A. C. (1961) *The Physiological Regulation of Salivary Secretions in Man: A Study of the Response of Human Salivary Glands to Reflex Stimulation*, pp. 61-73. Pergamon Press, Oxford.
- Krieger D. T. (1982) Endorphins and enkephalins. *DM* **28**, 1-53.
- Krieger D. T., Brownstein M. J. and Martin J. B. (1983) *Brain Peptides*. Wiley, New York.
- Kumar M. S. A., Chen C. L., Sharp D. C., Liu J. M., Kalra P. S. and Kalra S. P. (1982) Diurnal fluctuations in methionine-enkephalin levels in the hypothalamus and preoptic area of the male rat: effects of pinealectomy. *Neuroendocrinology* **35**, 28-31.
- Leach S. A. and Critchley P. (1966) Bacterial degradation of glycoprotein sugars in human saliva. *Nature* **209**, 506.
- Mandel I. D. and Wortman S. (1976) The salivary secretions in health and disease. *Oral Sci. Rev.* **8**, 25-47.
- Miletic V. and Randic M. (1977) Effect of substance P in cat dorsal horn neurons activated by noxious stimuli. *Brain Res.* **128**, 164-169.
- Millington W. R., Blum M., Knight R., Mueller G. P., Roberts J. L. and O'Donohue T. L. (1986) A diurnal rhythm in proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid that varies concomitantly with the content and secretion of beta-endorphin in the intermediate lobe of the rat pituitary. *Endocrinology* **118**, 829-834.
- Nakamura M. and Slots J. (1983) Salivary enzymes. *J. periodontol. Res.* **18**, 559-569.
- Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A. C. Y., Cohen S. N. and Numa S. (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- $\beta$ -lipotropin precursor. *Nature* **278**, 423-427.
- Nicolodi M. and Del Bianco E. (1990) Sensory neuropeptides (substance P, calcitonin gene-related peptide) and vasoactive intestinal polypeptide in human saliva: their pattern in migraine and cluster headache. *Cephalgia* **10**, 39-50.
- Parris W. G., Tanzer F. S., Fridland G. H., Harris E. F., Killmar J. and Desiderio D. M. (1989) Effects of orthodontic force on methionine-enkephalin and substance P concentrations in human pulp tissue. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **95**, 479-489.
- Parris W. C. V., Kambam J. R., Naukam R. J. and Rama Sastry B. V. (1990) Immunoreactive substance P is decreased in saliva of patients with chronic back pain syndromes. *Anesth. Analg.* **70**, 63-67.
- Rimon F., Le Greves P., Nyberg F., Heikkilä L., Salmela L. and Terenius L. (1984) Elevation of substance P-like peptides in the cerebrospinal fluid of psychiatric patients. *Biol. Psychiatry* **19**, 509-516.
- Robinson Q. C., Killmar J. T., Desiderio D. M., Harris E. F. and Fridland G. H. (1989) Immunoreactive evidence of beta-endorphin and methionine-enkephalin-arg-gly-leu in human tooth pulp. *Life Sci.* **45**, 987-992.
- Rölla G. (1966) Neurenamidase in human sputum. *Acta odont. scand.* **24**, 431-442.
- Shanks M. F., Clement-Jones V., Linsell C. J., Mullen P. E., Rees L. H. and Besser G. M. (1981) A study of 24-hour profiles of plasma met-enkephalin in man. *Brain Res.* **212**, 403-409.
- Shannon I. L., Prigmore J. R. and Chauncey H. H. (1962) Modified Carlson-Crittenden device for the collection of parotid saliva. *J. dent. Res.* **41**, 78-83.
- Sicuteri F., Fanciullacci M., Nicolodi M., Geppetti P., Fusco B. M., Marabini S., Alessandri M. and Campagnolo V. (1990) Substance P theory: a unique focus on the painful and painless phenomena of cluster headache. *Headache* **30**, 69-79.
- Takahashi T. and Otsuka M. (1975) Regional distribution of substance P in the spinal cord and nerve roots of the cat and the effect of dorsal root section. *Brain Res.* **87**, 1-11.
- Takayama M., Mori K., Takayama F., Kondo K., Kitagawa K. and Fujii N. (1990) Enzyme immunoassay of a substance P-like immunoreactive substance in human plasma and saliva. *Pharm. Soc. Jap.* **38**, 3494-3496.
- Tansen A., Sakurada T., Wahlström A., Terenius L. and Hartvig P. (1982) Postoperative demand for analgesics in relation to individual levels of endorphins and substance P in cerebrospinal fluid. *Pain* **13**, 171-183.
- Tang F., Tang J., Chou J. and Costa E. (1984) Age-related and diurnal changes in met-enkeph-arg-phe and met-enkephalin contents of pituitary and rat brain structures. *Life Sci.* **35**, 1005-1014.
- Tanzer F. S., Tolun E., Fridland G. H., Dass C., Killmar J., Tinsley P. W. and Desiderio D. M. (1988) Methionine-enkephaline peptides in human teeth. *Int. J. Pept. Protein Res.* **32**, 117-122.
- Tenovou J. O. (1989) *Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology*, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Tepperman F. S., Jarvis A. and Hirst M. (1988) Detection of enkephalin-like immunoreactive material in human saliva. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **12**, 285-289.
- Walker J. A. Jr, Tanzer F. S., Harris E. F., Wakelyn C. and Desiderio D. M. (1987) The enkephalin response in human tooth pulp to orthodontic force. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **92**, 9-16.
- Yanaihara C., Sato H., Hirohashi M., Sakagami M., Yamamoto K., Hashimoto T., Yanaihara N., Abe K. and Kaneko T. (1976) Substance P radioimmunoassay using N<sup>1</sup>-tyrosyl-substance P and demonstration of the presence of substance P-like immunoreactivities in human blood and porcine tissue extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 457-463.

## CONCLUSIONES

Las funciones reguladoras son emocionales de coordinación, procesos vasculares, procesos hormonales y regulación de la temperatura estan formadas por 31 aminoácidos. Se encuentran en el páncreas, placenta, fluido cerebro espinal, plasma, semen y la pulpa dental.

B I B L I O G R A F I A

REVISION BIBLIOGRAFICA DE ARTICULOS REFERENTES DE SALIVA

PRIMER ARTICULO

JOURNAL DENT. REST

Nombre del autor: Kenneth R. Spring y Morris A Spirtes

Nombre del titulo: Excreción Salivar de Li

Año: 1969

Páginas: 546-549

SEGUNDO ARTICULO

JOURNAL DENT. REST

Nombre del autor: Kenneth R. Spring y Morris A Spirtes

Nombre del titulo: Análisis Funcional

Año: 1969

Páginas: 550-554

TERCER ARTICULO

JOURNAL DENT. REST

Nombre del autor:

Nombre del titulo: Activación de los canales de Ca sensitivos a dihidropiridina de las glándulas salivales parótidas por el factor de crecimiento epidérmico.

Año:

Páginas:

CUARTO ARTICULO

JOURNAL AREHS ORAL BIOL.

Nombre del autor: Kenneth Izutzu, Dale Johnson, Linda Wilkinson, etc.

Nombre del titulo: Comparación de las concentraciones elementales en las células acinares de las glándulas salivales labiales.

Año: 1991

Páginas: 727-735

QUINTO ARTICULO

JOURNAL ARCHS ORAL BIOL

Nombre del autor: D. L. Picula E. F. Harris, D. M. Desiderio, etc.

Nombre del titulo: Inmunoreactividad de la Metionina similar a  
Encefalma Substancia similar P y la similar a  
a la B-endorcina.

Año: 1992

Páginas: 705-709