

01483
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Ley

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

**EFFECTO DE LAS POLIAMINAS EN GLANDULA
PAROTIDA Y PANCREAS EN RATAS CON DIABETES
INDUCIDA**

FALLA DE ORIGEN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
ODONTOLOGIA (*Patología Bucal*)

PRESENTA

C.D.M.O. ELBA ROSA LEYVA HUERTA

TUTOR D en C JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO

MEXICO D.F.

1995

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Al Dr. Javier Portilla Robertson

Por la confianza que siempre depositó en mi y por su apoyo incondicional

Al Dr. José Vela Capdevila.

Por su amistad e interés por concluir este trabajo.

AL Lic. Francisco Soto

Por su interés y confianza.

Al Dr. José Domingo Méndez.

Por sus consejos y aportación científica.

Al QFB Fernando Franco Martínez y Dr. Alejandro Donohué Cornejo

Por su amistad y valiosa ayuda durante la realización de este trabajo.

A los Drs:

Beatriz C. Aldape Barrios

Daniel Quezada Rivera

Carlos Páez Valencia.

Sin su ayuda me hubiera sido imposible llegar hasta aquí

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

MANUSCRITO DE TESIS

Cualquier tesis no publicada que avale el grado de Doctorado y depositada en la Biblioteca de la Universidad, Facultad de Odontología, queda abierta para inspección y sólo podrá ser usada con la debida autorización del autor. Las referencias bibliográficas pueden ser tomadas, pero ser copiadas solo con el permiso del autor y el crédito se da posteriormente a la escritura y publicación del trabajo.

Esta tesis ha sido usada por las siguientes personas que firman y aceptan las restricciones señaladas.

La Biblioteca que presta esta tesis debe de asegurarse de recoger la firma de cada persona que la utilice.

NOMBRE Y DIRECCION

FECHA

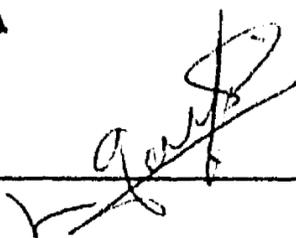
**EFECTO DE LAS POLIAMINAS EN GLANDULA
PAROTIDA Y PANCREAS EN RATAS CON DIABETES
INDUCIDA**

APROBADA POR

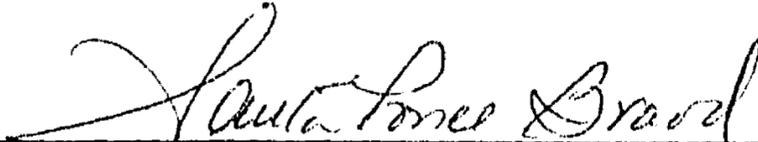
DR. ANTONIO ZIMBRON LEVY



DR. LUIS GAITAN CEPEDA



DRA SANTA PONCE BRAVO



DIRECTOR DE TESIS DR. JOSE DOMINGO MENDEZ FRANCISCO.



INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
Antecedentes.....	7
Páncreas.....	7
Páncreas exocrino.....	7
Páncreas endocrino.....	9
Células Alfa.....	12
Células Beta.....	12
Síntesis de insulina.....	13
Glándula parótida.....	18
Células mioepiteliales.....	22
Estroma Glandular.....	25
Funciones de las glándulas.....	25
Influencia de fármacos.....	26

Control hormonal y nervioso.....	26
Diabetes experimental.....	30
Estreptozotocina.....	31
Aloxana.....	33
Poliaminas.....	38
Hipótesis.....	42
Objetivo general.....	42
Objetivos específicos.....	43
Materiales y método.....	46
Resultados.....	56
Discusión.....	74
Conclusiones.....	83
Bibliografía	84
Apéndice.....	88

INDICE DE TABLAS

TABLA 1

Determinaciones bioquímicas en suero de ratas control, tratadas con aloxana, espermidina y espermina..... 57

TABLA 2

Promedio y porcentaje del resultado histopatológico en glándula parótida (Tinción hematoxilina y eosina)..... 61

TABLA 3

Resultados del análisis histopatológico de la glándula parótida con tinción de PAS (promedio y porcentaje)..... 62

TABLA 4

Promedio y porcentaje de los hallazgos histológicos en la glándula parótida (Tinción PAS-azul alciano pH 2.5)..... 66

TABLA 5

Resultado del análisis histopatológico del páncreas en promedio y porcentaje (Tinción de hematoxilina y eosina)..... 69

TABLA 6

Promedio y porcentaje de los hallazgos histológicos en páncreas (Tinción de PAS)..... 71

TABLA 7

Promedio y porcentaje de los hallazgos histológicos en páncreas (Tinción PAS-azul alciano pH2.5)..... 73

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1

Glándula parótida normal y glándulas con la administración de los diferentes tratamientos (Tinción de Hematoxilina y eosina)..... 60

FIGURA 2

Disposición de material granular PAS(+) en la glándula parótida con la administración de los diferentes tratamientos..... 63

FIGURA 3

Distribución de los gránulos de secreción en la glándula parótida con la técnica de PAS-azul alciano pH 2.5 con la administración de los diferentes tratamientos..... 65

FIGURA 4

Aspecto histológico del páncreas normal y del páncreas posterior a la administración de los diferentes tratamientos (Hematoxilina y eosina)..... 68

FIGURA 5

Disposición de material PAS(+) en páncreas normal y con los diferentes tratamientos..... 70

FIGURA 6

Distribución de los gránulos de secreción en páncreas con la técnica de PAS-azul alciano pH 2.5 con la administración de los diferentes tratamientos..... 72

RESUMEN

La espermidina y la espermina son constituyentes naturales de muchos organismos vivos . Son sintetizadas rápidamente por células que tienen una actividad metabólica incrementada después de la estimulación celular o durante el desarrollo y crecimiento, estas moléculas se localizan en altas concentraciones en los islotes pancreáticos y su presencia es únicamente en las células Beta productoras de insulina, encontrándolas asociadas con los gránulos secretorios de estas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las poliaminas en glándula parótida y páncreas posterior a la administración de aloxana. 28 ratas Long Evans fueron tratadas con 120 mg/kg de peso de aloxana, posteriormente 5 mg/kg de espermidina o espermina fueron administradas 48,72 y 96 hrs. después del tratamiento de aloxana. Glucosa sérica, triacilglicéridos , alfa amilasa, actividad de arginasa y proteínas fueron determinadas antes y después del tratamiento. La glándula parótida y el tejido pancreático fueron disecados y procesados de manera rutinaria para histología y teñidos con HyE, PAS, PAS-azul alciano pH 2.5.

Los niveles de glucosa en sangre fueron para el grupo control 131.41 mg/dl, para las ratas tratadas con aloxana fue de 363.87 mg/dl, triacilglicéridos 47.18 mg/dl en ratas normales contra 70.83 mg/dl; lo cual es indicativo de daño pancreático.

En el examen histológico del tejido pancreático de los animales tratados con aloxana encontramos cambios en los islotes de pancreáticos, los cuales fueron, necrosis celular, núcleos gigantes y picnóticos, vacuolización y degranulación del citoplasma, las células acinares mostraron una marcada vacuolización; en glándula parótida

observamos necrosis severa con cambios nucleares, vacuolización, pérdida del patrón acinar y citoplasma predominantemente basófilo, las células ductuales presentaban vacuolización con núcleos basales y picnóticos. En las glándulas parótidas y en el páncreas los animales tratados con espermina mostraron citoplasma eosinófilo con gránulos finos, contrario al grupo tratado con espermidina, esta característica no se observó en el grupo tratado con aloxana pero es similar a la glándula normal. Con ambas poliaminas la presencia de núcleos gigantes y picnóticos decrece y la pérdida del patrón acinar disminuye al compararlo con las ratas no tratadas. En todos los tipos de conductos, la pérdida del patrón ductual está en relación con la vacuolización, la cuál no se observó en los animales tratados con espermidina y la espermina.

Nuestros resultados sugieren que la aloxana ejerce un efecto tóxico directo sobre la glándula parótida y que el tratamiento con espermidina y espermina a las ratas tratadas con aloxana puede evitar los cambios morfológicos así como el daño a la glándula parótida.

ABSTRACT

Spermidine and spermine are natural constituents of most living organisms. They are synthesized rapidly and markedly by cells with increased metabolic activity after cell stimulation and during developmental growth, these molecules occur in high concentrations in pancreatic islets, their presence is restricted to the insulin-producing Beta cells and it has been found that polyamines are associated with the secretory granules.

The aim of this study was to study the effects of polyamines in parotid glands and pancreas before of alloxan administration. 28 Long Evans rats were treated with 120 mg/kg of alloxan. Afterwards 5 mg/kg of spermidine or spermine were administered 48,72 and 96 hr. after alloxan treatment. Seric glucose, triacylglycerides, alpha amylase, arginase activity and protein were measured before and after treatment. Parotid glands and pancreatic tissues were excised and processed in routine manner to obtain slides, were stained with H&E, PAS and PAS-alcian blue at pH 2.5

The levels of blood glucose were of control group 131.41 mg/dl, in alloxan treatment rats were 363.87 mg/dl, triacylglycerides 47.18 mg/dl in normal rats against 70.83 mg/dl it is indicating of pancreatic damage.

Histological examination of pancreatic tissues with alloxan treatment showed changes in the islets of Langerhans, these were cellular necrosis, giant an picnotic nuclei, vacuolization and degranulation of cytoplasm, acinar cells showed marked vacuolization; in parotid glands we observed severe necrosis with nuclear changes, vacuolization, loss of the acinar pattern and predominatedly basophilic cytoplasm, ductal cells appear

vacuolization, basal and picnotic nuclei. In both parotid glands and pancreas spermine treated animal showed eosinophilic cytoplasm with fine granules the reverse as spermidine group, this feature was not observed in alloxan treatment and is similar to normal gland. With both polyamines the presence of giant and picnotic nuclei decreased and loss of acinar pattern diminished compared with untreated rats. In all duct types loss of ductal pattern was in close relation with vacuolization, when vacuolization was not observed high cubic cells raised with spermidine and spermine.

Our results suggest that the alloxan has a direct toxic effect on the parotid gland and that the treatment with spermidine and spermine to alloxan treated rats applied before the beginning of diabetic changes can prevent severe parotid gland alterations.

PALABRAS CLAVE

Diabetes experimental, Diabetes inducida, Poliaminas, Aloxana, Espermidina, Espermina, parótida, páncreas.

INTRODUCCION

La función biológica de las poliaminas, espermidina y espermina ha sido tema de muchas investigaciones, se ha demostrado que se sintetizan en grandes cantidades durante el desarrollo del tejido normal y neoplásico, además de tener efectos importantes en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas; las poliaminas pueden actuar como sustratos de las transglutaminasas, las cuales están presentes en las células productoras de insulina y desempeñan un papel importante en la liberación de ella.

Sin embargo poco se conoce acerca de la función de las diferentes poliaminas en relación con el páncreas y la función de las células Beta así como de la influencia que estas pueden ejercer sobre las glándulas salivales; se ha considerado que la acción que puedan ejercer sobre el páncreas es parecida a la de la insulina .

Las enfermedades del páncreas endocrino se asocian con alteraciones en el tamaño y función de las glándulas salivales, reportándose por lo general un agrandamiento parotídeo bilateral así como una marcada infiltración grasa, posiblemente como resultado de la alteración del metabolismo de los lípidos, así mismo se ha descrito la existencia de un material parecido a la insulina en las glándulas parótidas de las ratas y un péptido semejante al glucagón en las glándulas submaxilares de roedores y humanos desconociéndose hasta el momento si ejercen acción sobre el metabolismo de los carbohidratos, considerándose que la parótida puede ser una fuente importante de producción de insulina extrapancreática.

También se ha reportado que la administración de insulina juega un papel importante en la regulación del crecimiento y función de la

glándula parótida; en base a lo reportado en la literatura y a la semejanza histológica entre ambas glándulas el presente trabajo tuvo como finalidad evaluar el efecto bioquímico de la administración de aloxana que es indicador de daño pancreático, así como analizar histopatológicamente el daño celular ocasionado por la administración de aloxana en páncreas y glándulas parótidas de ratas.

Por otra parte consideramos que si las poliaminas están presentes en las células productoras de insulina y su biosíntesis es estimulada por la glucosa entonces ellas pueden ejercer una acción bioquímica similar al de la insulina en la diabetes experimental, así como un efecto citoprotector en la arquitectura de la glándula pancreática y en la parótida hacia los efectos causados por la aloxana en la inducción de la diabetes experimental.

ANTECEDENTES

PANCREAS

Está compuesto por dos tipos de tejido glandular bien diferenciados que se encuentran topográficamente en íntima relación, la porción exocrina y la endocrino; la porción exocrina ocupa la mayor parte del espesor pancreático y en su interior se encuentran acúmulos de células endocrinas que constituyen los islotes pancreáticos ¹.

PANCREAS EXOCRINO

Las células secretoras acinares son de forma piramidal y se disponen en grupos redondeados y tubulares, en cada porción secretora se inserta un tubo intercalar estrecho, tapizado por células centroacinares cúbicas bajas y que más distalmente son substituídas por cúbicas altas o cilíndricas, contiene conductos interlobulares rodeados por tejido areolar con algunas fibras musculares lisas y fibras nerviosas ¹.

Las células acinares zimógenas exocrina tienen un núcleo basal con citoplasma basófilo, en la porción apical supranuclear tiene un aparato de Golgi rodeado de numerosos gránulos de secreción que contienen las enzimas de secreción pancreática, también contiene células ganglionares y cordones de células epiteliales relativamente indiferenciadas las cuales son pluripotenciales para reposición de células exocrinas que degeneran y probablemente para reposición de las células de los islotes pancreáticos¹⁻³, la **Figura 1** muestra la ultraestructura del páncreas exocrina y el mecanismo de control de la secreción.

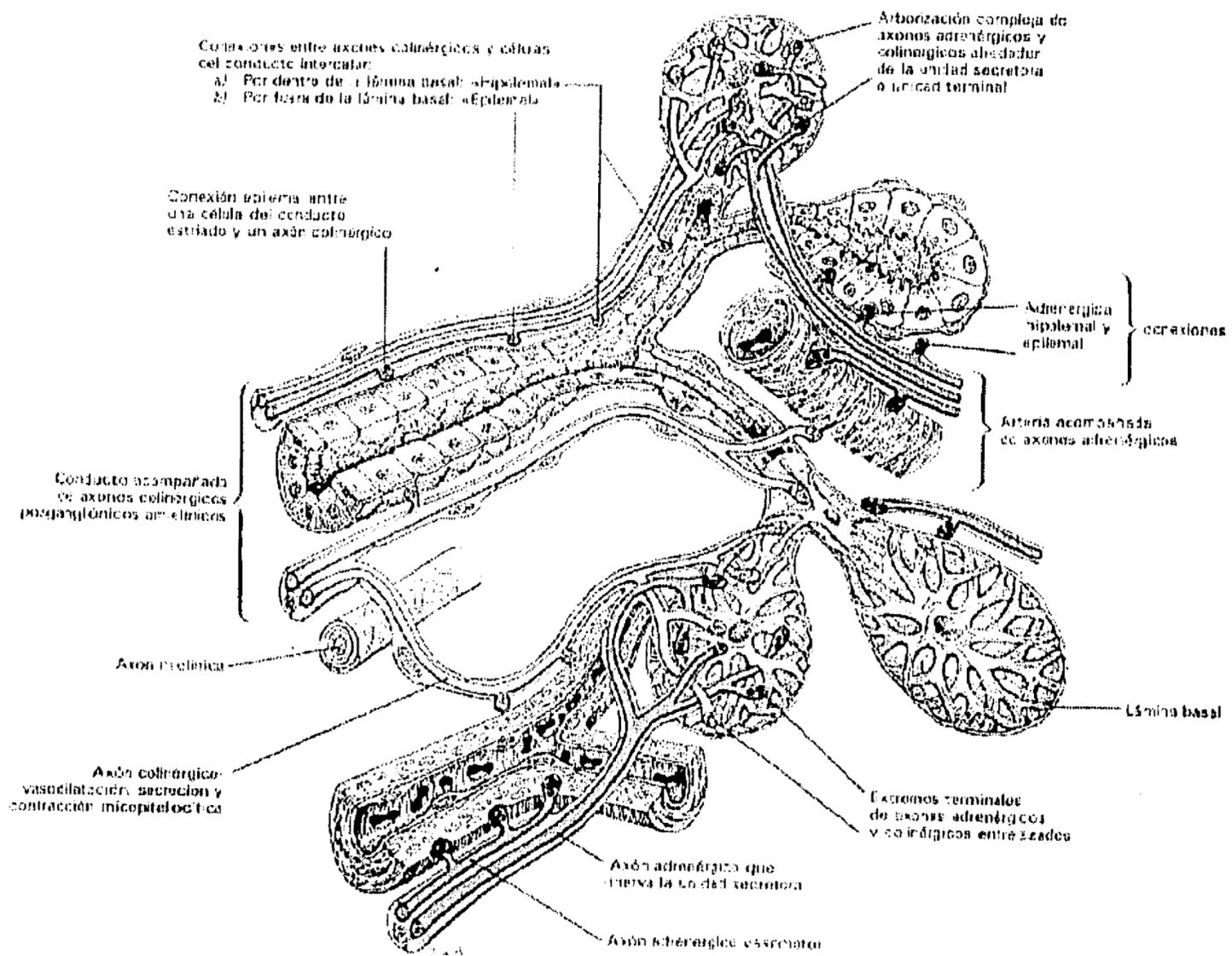


Figura 5. Inervación de las unidades secretorias y conductos de la glándula salival (Tomado de anatomía de Gray 1992)

El páncreas es la principal fuente de enzimas como la alfa amilasa y el quimotripsina, que actúan en el duodeno, el yeyuno y en menor cantidad en el íleon. En los seres humanos la síntesis de enzimas pancreáticas es de aproximadamente 10 g de proteína por día. El páncreas de rata que sólo contiene 0.2 g de proteína en sus tejidos sintetiza cerca de 0.4 g de proteína enzimática en 24 horas. El páncreas también secreta bicarbonato, el cual neutraliza el contenido ácido que el estómago pasa al duodeno. Esta secreción lleva el pH a un valor de 6-7 en el duodeno lo cual permite que las enzimas digestivas actúen con mayor eficacia ³.

PANCREAS ENDOCRINO

Formado por los islotes pancreáticos o de Langerhans, que son acúmulos esferoidales distribuidos irregularmente en la porción exocrina, se pueden contar hasta un millón de islotes en el individuo normal. Cada islote está formado por células endocrinas poliédricas con una red de capilares o sinusoides e inervación autónoma ^{1,2}.

Las principales y más numerosas células endocrinas son el tipo **A** que secretan glucagon y el tipo **B** que secretan insulina, constituyendo del 60 al 80% del total de las células de los islotes ², por lo general las células **A** se localizan en la periferia de los islotes mientras las **B** son de localización central. Un tercer tipo de células endocrinas son las células **D** describiéndose que son productoras de gastrina, la localización de ellas en los islotes es periférica al igual que las células **A**; recientemente se ha demostrado la presencia de somatostatina o un péptido similar ¹⁻³, la **Figura 2** muestra la histología, ultraestructura y fisiología del páncreas endocrino.

Recientemente se han identificado en el páncreas humano unas células secretoras de péptidos con gránulos citoplásmicos más pequeños que los de las células **A**, **B**, y **D**, existen al menos 2 tipos; la célula **PP** que contiene una hormona polipéptido pancreática y la célula **D1** cuya función todavía no es clara pero que ultraestructuralmente son similares a las células **D1** de la mucosa gástrica. Las células **D1** y **PP** no están restringidas a los islotes sino que también se encuentran dispersas en el compartimiento predominantemente exocrino del páncreas ^{1,3}.

Los islotes pancreáticos desempeñan un papel importante en el control del metabolismo, ya que además de insulina producen tres hormonas que son: glucagón que es una proteína antagonista de la acción de la insulina pues eleva los niveles de glucosa en la sangre, el polipéptido pancreático que regula la liberación de las enzimas digestivas pancreáticas y la somatostatina proteína que inhibe la secreción de las hormonas producidas por los islotes ³.

Se ha sugerido que los islotes podrían dividirse en 2 regiones funcionalmente distintas; una medular formada por células principalmente **B** que secretan la insulina con una tasa de respuesta relativamente constante, por ejemplo ante la presencia de glucosa en el líquido intercelular circundante y una cortical de células **A**, **B** y **D** ⁴,

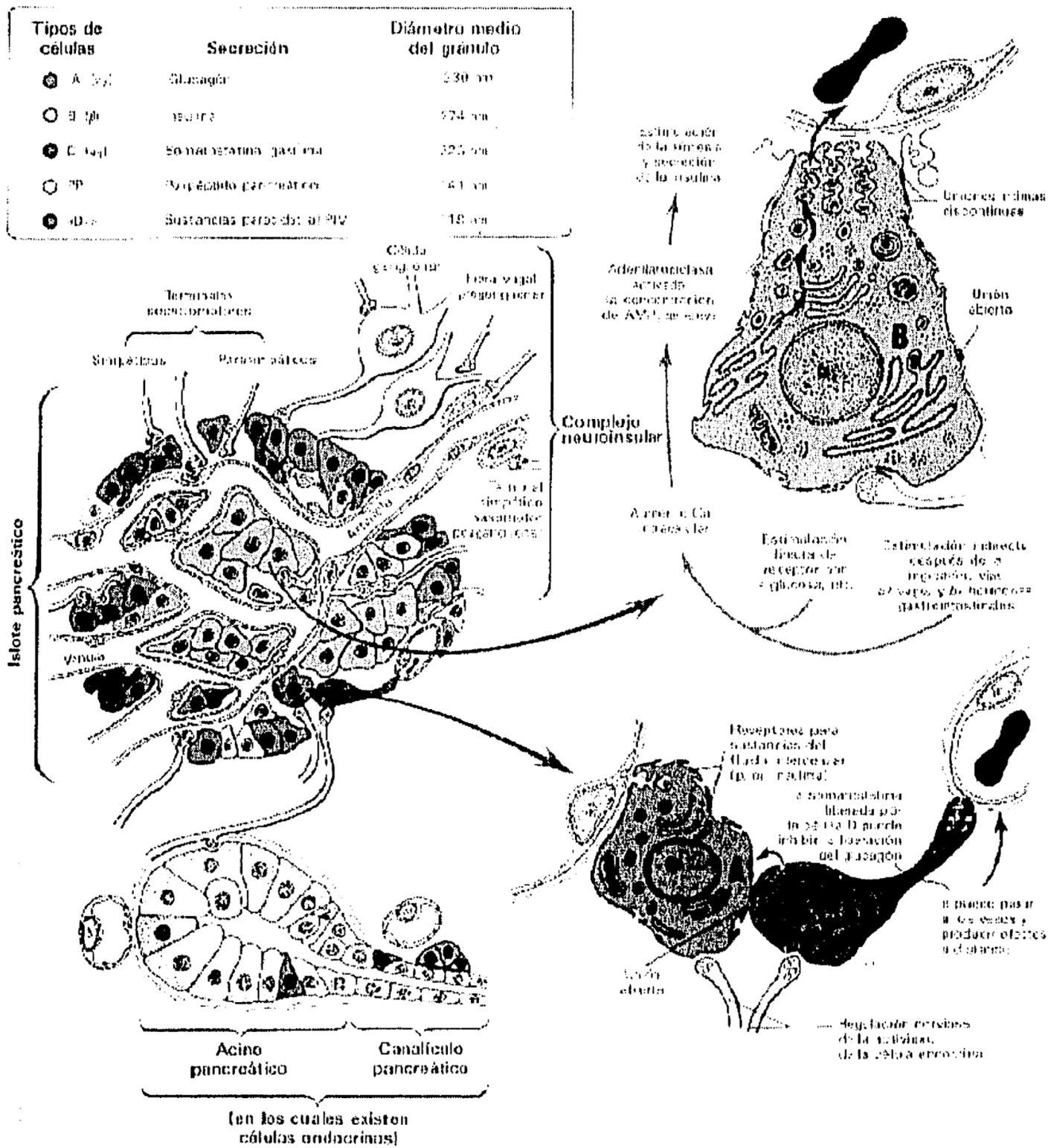


FIGURA 2. Histología, ultraestructura y fisiología del páncreas endocrino.
(Tomado de Anatomía de Gray 1992)

particularmente rica en elementos vasculares y neurales, donde se producirían rápidos cambios de la actividad secretoria como respuesta a los diversos estímulos ambientales. En esta última región la somatostatina liberada por las células **D** podría inhibir la actividad secretoria de las células **A** o **B** adyacentes, actuando principalmente sobre la inhibición de la liberación de glucagón ^{3,4}.

Las neurohormonas del sistema nervioso autónomo, la acetilcolina y la noradrenalina también influyen sobre la secreción; la acetilcolina aumentando la liberación de insulina y glucagón y la noradrenalina inhibiendo la liberación de insulina mediada por la glucosa ¹.

CELULAS ALFA (A)

La distribución de glucagón extraíble en diversas porciones del páncreas presenta un paralelismo relativo con la abundancia relativa de estas células y estas inmunoreaccionan con anticuerpos fluorescentes específicos del glucagón ²⁻⁴.

CELULAS BETA (B)

Constituyen el centro de la síntesis, almacenamiento y secreción de insulina; se ha demostrado el paralelismo existente entre la abundancia de los gránulos de la célula y el contenido de insulina, así mismo se ha observado que los gránulos Beta constituyen las únicas estructuras del islote a las cuales pueden fijarse anticuerpos específicos de la insulina, se desconoce la composición y arquitectura molecular del gránulo de la célula **B** aunque es obvio que existen fuerzas y sustancias con capacidad de agregación, las cuales pueden reunir muchas moléculas de insulina en una forma insoluble empaquetada demostrable

por microscopia electrónica. El zinc se halla presente en el tejido de los islotes, considerándose que puede actuar como agente que mantiene el gránulo **B** en forma agregada ^{2,3}.

SINTESIS DE INSULINA

La insulina es una proteína relativamente pequeña , con peso molecular de 5734 daltones. La molécula de insulina está formada por dos cadenas polipeptídicas diferentes, una cadena A que consiste en 21 aminoácidos y una cadena B que consta de 40 aminoácidos unidas por dos puentes disulfuro.

La insulina se sintetiza como fragmento de una proteína mayor denominada proinsulina, la que a su vez tiene como precursor a la preproinsulina que es sintetizada en los ribosomas, el páncreas humano tiene aproximadamente 200 unidades de insulina y se secretan 50 unidades por día, por lo tanto poca insulina se almacena y se debe sintetizar con mucha rapidez ^{3,4}

La insulina aumenta la utilización de glucosa , facilitando así su transporte al interior de la célula en especial la de los tejidos adiposo y muscular, su actividad es selectiva ya que solo transporta hexosas y pentosas que tienen la misma configuración en los primeros tres carbonos que la D-glucosa. La insulina incrementa la velocidad de oxidación de la glucosa en la célula en particular por la vía glucolítica y aumenta la síntesis de glucógeno, especialmente en hígado y músculos esqueléticos; así mismo impide la liberación de glucosa del hígado inhibiendo a la

enzima intracelular glucosa 6 fosfatasa, el resultado final de todos los efectos de la insulina es disminuir la concentración de glucosa en sangre ⁵.

Otra de sus funciones es promover la lipogénesis activando la lipasa de lipoproteína e impide la lipólisis inhibiendo la lipasa sensible a la hormona, el resultado es disminuir la concentración de ácidos libres y triacilgliceridos en el plasma; aumenta la velocidad de captación de K por las células y por lo tanto disminuye la concentración de K en la sangre ⁵.

Después de que la célula **B** ha sintetizado insulina, esta queda almacenada en gránulos secretorios; la forma de estos gránulos son característicos de cada especie animal, por ejemplo los del hombre son esféricos en contraste con las estructuras en forma de bastón observadas en el perro, debe suponerse que la síntesis de la insulina tiene lugar a lo largo del retículo endoplásmico de la célula, mediada por la actividad sintética de los ribosomas y el gránulo de insulina queda encerrado en un saco capsular que deriva del retículo endoplásmico; las mitocondrias y el aparato de Golgi actúan en los procesos oxidativos controlados por enzimas que conducen a la formación de trifosfato de adenosina (**ATP**) última fuente de energía para la síntesis de insulina, las cápsulas membranosas que contienen la insulina, al juntarse con la membrana celular provocan descarga de los gránulos a los espacios extracelulares. Cuando el nivel de azúcar en la sangre aumenta, estimula la migración y solubilización de los gránulos provocando un aumento en la velocidad de expulsión de la insulina ^{4,5}.

El estímulo fisiológico para la secreción de insulina se produce a nivel del mismo azúcar en la sangre; un incremento en el nivel de glucosa en la sangre estimula la producción de insulina y aumenta su nivel en la sangre, en la célula Beta desaparecen los gránulos de insulina y cuando el nivel de glucosa se reduce de nuevo a su valor normal tiene lugar la restitución de dichos gránulos ²⁻⁵.

Cuando existe carencia de insulina los tejidos sensibles a ella como el músculo esquelético, corazón, tejido adiposo, etc. quedan deprovistos de hormona, de modo que se reduce notablemente el tránsito de glucosa procedente de la sangre hacia el interior de las células; al mismo tiempo el hígado aumenta su velocidad de liberación de glucosa por glucogenólisis por lo cual se produce acumulación en la sangre incrementando su nivel en la circulación, si el nivel aumenta aún más el túbulo del riñón excede su capacidad para la reabsorción y como consecuencia se pierde azúcar por la orina¹, los acontecimientos metabólicos de la carencia de insulina se muestran en la **Figura 3**.

En los tejidos sensibles a la insulina tiene lugar ajustes metabólicos como consecuencia del reducido abastecimiento de azúcar, en este

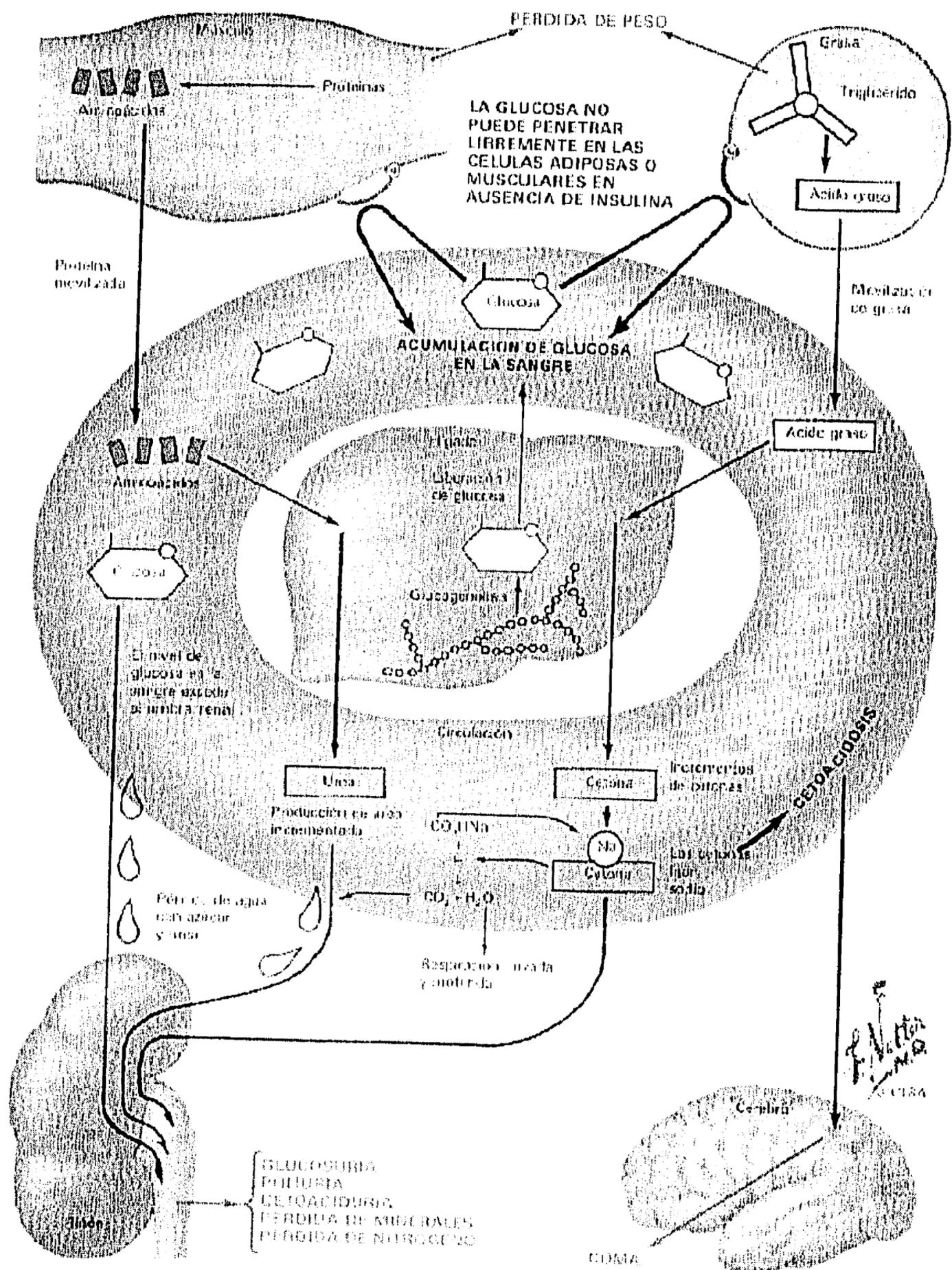


Figura 3. Acontecimientos metabólicos en la carencia de insulina.
 (Tomado de Netter H Frank 1993)

caso las proteínas se degradan más rápidamente de lo que pueden sintetizarse; la deficiencia o insuficiencia de insulina en ratas inmaduras trae como consecuencia un retardo significativo en el crecimiento de las glándulas submandibular, parótida, tiroidea, suprarrenal y pituitaria así como una deficiencia en el crecimiento en general , alteraciones histológicas de las glándulas salivales y atrofia de ellas asociadas a un decremento en el peso del cuerpo se observan en ratas maduras con insuficiencia de insulina ⁴⁻⁸.

La terapia de reemplazo de insulina previene el retraso del crecimiento glandular y del cuerpo en las ratas diabéticas inmaduras y previene los cambios atróficos de las glándulas salivales los cuales por lo general ocurren en las ratas diabéticas maduras; estos hallazgos demuestran que la secreción normal de insulina es definitivamente requerida para el crecimiento del cuerpo, de las glándulas salivales y endocrinas en las ratas inmaduras así como para mantener la integridad histológica de las glándulas salivales en las ratas maduras ⁷ .

Se considera que la insuficiencia de insulina puede tener alteraciones paralelas en los niveles de enzimas secretorias en las glándulas parótidas de ratas, pero estos datos no son concluyentes, la amilasa parotídea se encuentra reducida del 45% en la glándula control a un 22% en las ratas diabéticas, sin embargo los niveles de peroxidasa en la glándula parótida de la rata diabética no difieren a los niveles presentes en las glándulas de las ratas control ⁹.

Se conoce que las glándulas salivales contienen numerosos péptidos biológicamente activos incluyendo hormonas, diversos estu-

dios indican que algunos péptidos producidos por estas glándulas son similares si no es que idénticos a las hormonas producidas por las células endocrinas en los islotes pancreáticos y en el tracto gastrointestinal; por ejemplo, la glándula submaxilar de roedores y humanos contiene un material parecido al glucagón que puede o no afectar el metabolismo de los carbohidratos por antagonismo de la acción de la insulina. Smith y cols. ⁷ estudiaron tejido parotídeo y pancreático de ratas, reportando que el grupo control tenía numerosas islas con áreas centrales típicas de células **B** conteniendo insulina, cada isla estaba rodeada por una capa periférica de células productoras de glucagón, células productoras de somatostatina y células **PP** conteniendo polipéptidos pancreáticos, los islotes pancreáticos de las ratas tratadas con estreptozotocina se encontraban reducidos en número y mostraban signos de necrosis; numerosas células con inmunoreactividad a insulina fueron observadas en la glándula parótida tanto del grupo control como el diabético, la inmunoreactividad fue observada alrededor de los conductos intercalares y menos frecuentemente en las células acinares, no encontraron inmunoreacción en las células de los conductos estriados ni excretores.

GLANDULA PAROTIDA

Glándula compuesta ramificada, formada por numerosos lóbulos compuestos a su vez por lobulillos enlazados en un estroma interlobular, tejido areolar denso que contiene los conductos excretores, vasos sanguíneos, fibras nerviosas y pequeños ganglios, cada lóbulo está delimitado por las ramificaciones de un conducto único que finalizan

como unidades secretoras, las cuales a su vez producen la secreción primaria, este esquema se modifica secundariamente con la formación de los conductos intercalares, estriados y excretorios, de manera que estos últimos se ramifican en uno o más conductos que conducen la saliva a la cavidad bucal ¹, la **Figura 4** muestra la arquitectura y ultraestructura de una glándula salival.

Las células de los acinos son piramidales, con un vértice luminal estrecho y una base amplia, el citoplasma de las células acinares serosas se tiñe intensamente con hematoxilina-eosina dando a la célula su característico color oscuro, el citoplasma apical de la célula puede verse lleno de una serie de gránulos eosinófilos de secreción que miden un μm de diámetro ¹⁰, las células acinares mucosas tienen gránulos de mayor tamaño agrupados, de bordes mal definidos con poca afinidad por la hematoxilina-eosina, con una matriz homogénea e intensamente electrolucida y las seromucosas tienen un aspecto intermedio entre el tipo seroso y el mucoso, de manera que sus gránulos pueden estar agrupados, ser basófilos, homogéneos y estar dispersos o ser mayores que los gránulos típicos heterogéneos ^{1,10}.

Las unidades secretoras terminales de la glándula parótida humana están formadas por acinos seromucosos descritos frecuentemente como serosos ^{1,10-12}. Los acinos serosos contienen gránulos secretorios PAS(+) en su citoplasma, la cantidad de los gránulos

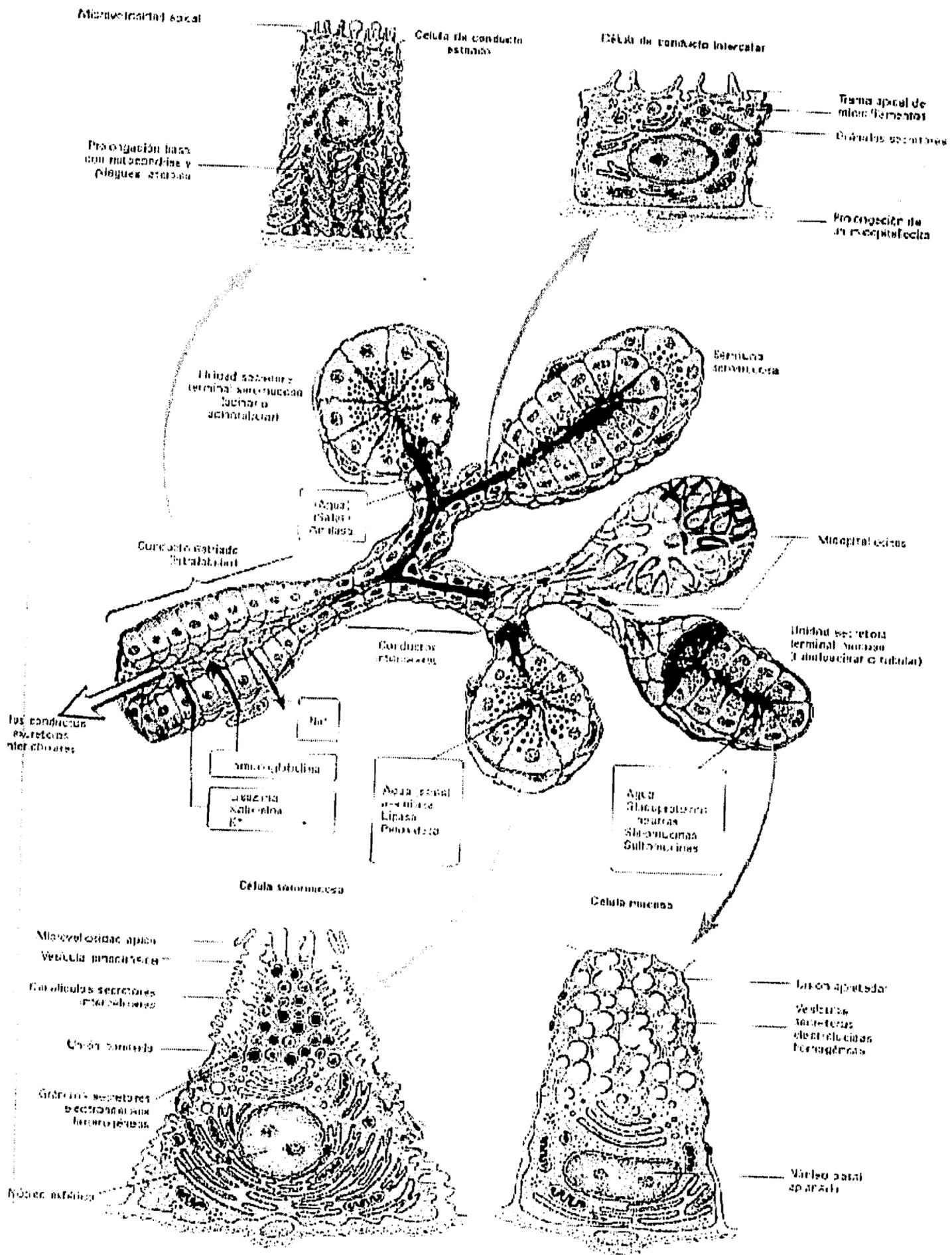


Figura 4. Arquitectura y ultraestructura de una glándula salival.
 (Tomado de Anatomía de Gray 1992)

se relaciona con la fase del ciclo secretorio, estos están concentrados durante la fase de maduración granular antes de la síntesis de enzimas y después de la descarga de la secreción, aunque las características de las células serosas son grandes núcleos basales, capilares secretorios intercelulares y un ergastoplasma de células basales rico en RNA, con histoquímica se ha demostrado fosfatasa ácida, esterasas y otras enzimas como glucoronidasa, glucosidasa y galactosidasa ^{11,12}.

Las células que tapizan los conductos intercalares son cúbicas o ligeramente aplanadas, se considera que estas células no son importantes en la síntesis de proteínas y no se sabe con certeza que tipo celular del complejo unidad secretora terminal-conducto intercalares es el principal secretor de agua y electrólitos a la saliva ¹¹.

La característica principal de las células que revisten los conductos estriados es su estriación basal, lo cual se debe a la presencia de las columnas de mitocondrias alargadas muy apretadas entre si y las zonas laterales a las estriaciones se encuentran plegadas, este plegamiento y la abundancia local de mitocondrias es característico de células epiteliales implicadas en el transporte de electrólitos, estas células acarrearán potasio hacia la saliva y al reabsorber más sodio que agua producen una saliva hipotónica; además de modificar la composición electrolítica de la saliva los conductos estriados secretan IgA, lisosima y calicreina ¹¹.

En la rata los conductos excretores están revestidos por un epitelio cilíndrico simple o pseudoestratificado, compuesto principalmente por células cilíndricas altas con estriaciones basales perpendiculares que

contienen mitocondrias alargadas y apretadas entre si, se cree que también se encuentran implicadas en el transporte de electrólitos ademas de conducir la saliva ¹.

CELULAS MIOEPITELIALES

Las células mioepiteliales se encuentran en las glándulas salivales, lagrimales, mamaria, prostática y en las glándulas sudoríparas de algunas especies animales.

Estas células están situadas entre la lámina basal y las células epiteliales propiamente dichas de los conductos intercalares y de las unidades secretorias terminales, la actividad de estas células se ha descrito como: Aceleran el flujo de la salida de la saliva, disminuyen el contenido luminal de los conductos intercalares y unidades secretorias terminales, aumentan la presión de secreción y sostienen el parénquima subyacente ¹⁰⁻¹³.

La forma de las células depende de su localización, las de las unidades secretorias terminales son estrelladas y tienen largas ramificaciones que en ocasiones se unen a una o dos células adyacentes y forman un entramado en forma de cesta alrededor de cada unidad terminal; por el contrario, las de los conductos son más fusiformes, tienen menos ramificaciones y se extienden a lo largo de los conductos intercalares ^{5,12,13}.

Uno de los principales problemas al investigar estas células, es su identificación con microscopia de luz, numerosas técnicas histológicas,

histoquímicas e inmunohistoquímicas han sido utilizadas dando resultados variables; las células mioepiteliales reaccionan positivamente con anticuerpos específicos contra actina y miocina de origen muscular liso, indicando una relación estrecha entre el músculo liso y estas células; adicionalmente estas células tienen una función contráctil bajo estímulo neural, se encuentran en las células secretorias acinares y en las células de los conductos intercalares en la glándula adulta solamente y se consideran células embrionarias de reserva, que bajo algún estímulo desconocido se diferencian a células neoplásicas de los conductos intercalares y de las células secretorias ^{13,14} .

En un reporte previo ¹⁵ , nosotros al analizar las glándulas parótidas de las ratas diabéticas y tratadas con poliaminas, con la tinción tricrómica de Masson observamos la presencia de células semejantes a las células mioepiteliales las cuales se distinguieron por su núcleo aplanado y sus prolongaciones citoplasmáticas teñidas de rojo, las cuales se encontraron escasamente en las glándulas normales y asociadas a los conductos intercalares, pero en las glándulas de las ratas tratadas con aloxana las encontramos en forma abundante y en localización periductual y periacinar pero en las ratas diabéticas tratadas con espermidina y espermina se encontraron con la misma distribución pero en menor cantidad, para confirmar que eran células mioepiteliales se realizó inmunohistoquímica resultando positivas para vimentina y negativas para Proteína S-100 .

Cambios severos relacionados con la edad ocurren en las glándulas submaxilares de las ratas, uno de estos es la presencia de oncocitos en glándulas de ratas seniles, describiéndolas como células que poseen un citoplasma de aspecto reticular espumoso y algunas con

núcleo picnótico e hipercromático y nucléolo prominente, aunque actualmente se conoce que los oncocitos son células con gránulos eosinófilos, en la rata senil, con frecuencia se encuentran ciertas células que presentan pequeños gránulos secretorios asociados a los acinos y a los conductos intercalares estas células rara vez se encuentran en glándulas de ratas menores de 4 meses y los gránulos de estas no son fosfatasa + a diferencia de los gránulos de los conductos intercalares, se encuentran cerca de la membrana, son de naturaleza homogénea, electrónicamente opacos y varían en tamaño de 0.5 a 1.0 micras de diámetro ¹⁶.

Benítez- Bibriesca y cols. ¹⁷, mencionan que en las glándulas submaxilares de ratas diabéticas ellos encontraron unas células epiteliales cargadas de gránulos citoplasmáticos localizadas en los conductos intercalares y que estas células eran semejantes morfológicamente a unas descritas previamente pero que solo se presentan en la rata hembra y la daban como ejemplo del dimorfismo sexual de las glándulas salivales y que con la tinción de azul de toluidina a un pH ácido destacan claramente por sus gránulos de color azul más intenso y ligera metacromasia, esta característica les permitió a ellos diferenciarlas de las células serosas cuyos gránulos de secreción o zimógeno se tiñen más pálido y no manifiestan metacromasia además, mencionan que estas células son particularmente numerosas y cargadas de gránulos en los animales diabéticos en contraste con los grupos testigo en los cuales estas fueron muy escasas.

ESTROMA GLANDULAR

Es una forma de tejido conectivo funcional entre los acinos y el sistema ductual, contiene los vasos y sus funciones incluyen la estabilización de la estructura lobular, el transporte de los metabolitos en el sistema vascular aferente y eferente, la transmisión de estímulos vía fibras nerviosas autónomas y proveer la respuesta inmune por medio del sistema inmune secretorio local ¹¹.

FUNCIONES DE LAS GLANDULAS SALIVALES

La actividad de los diferentes tipos de células efectoras de las glándulas salivales influyen en la producción salival tanto cuantitativa como cualitativamente, la variación de la actividad de las células efectoras esta bajo control hormonal y nervioso ¹.

Las células acinares antes de la actividad secretoria se caracterizan por un extenso y altamente organizado retículo endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi prominente con cisternas y numerosas vesículas pequeñas; el papel del aparato de Golgi en la síntesis y transporte de carbohidratos y proteínas y la forma de descargar los productos secretorios han sido estudiados en glándulas exocrinas utilizando autoradiografía e histoquímica ^{12,18}.

El aparato de Golgi juega un papel importante en la elaboración de moco, las cisternas parecen ser el sitio de la síntesis de carbohidratos, la presencia de actividad difosfatasa nucleósida refleja la actividad de este aparato en la adición de carbohidratos a las proteínas secretorias ,

la síntesis y transporte de las proteínas secretorias en las células acinares salivales es similar al mecanismo demostrado en las células pancreáticas exocrinas, el transporte de proteínas es sintetizado por los ribosomas en el retículo endoplásmico y transferido a las cisternas del mismo retículo . La actividad de la fosfatasa ácida ha sido demostrada en las vacuolas condensadas del aparato de Golgi y puede ser un mecanismo para la regulación lisosomal de los procesos secretorios ¹⁸.

Estructuras parecidas a cristales han sido observadas en los gránulos secretorios considerándolas de naturaleza glucoproteíca , el mecanismo de descarga de sustancias secretorias en las células secretorias del páncreas y de las glándulas salivales ha sido sujeto a muchas investigaciones ¹² .

INFLUENCIA DE FARMACOS EN LA SECRECIÓN SALIVAL

Las drogas actúan sobre el sistema nervioso autónomo influyendo en el tamaño de la glándula parótida, estos agentes pueden actuar directamente sobre las células acinares o alcanzar su efecto vía los centros autónomos, el sistema vascular, o las células mioepiteliales que regulan el flujo de la sangre a través de la glándula así como el metabolismo y los procesos de filtración, en algunos casos el efecto de las drogas puede ser demostrado experimentalmente sin tener relevancia clínica ¹¹ .

CONTROL HORMONAL Y NERVIOSO

Los impulsos para que se lleve a cabo la secreción salival se desarrollan en los centros cerebrales y alcanzan el acino vía simpática y

parasimpática; la inervación autónoma indirecta estimula a los receptores directamente por sustancias adrenérgicas y colinérgicas circulantes en la sangre. La **Figura 5** muestra la inervación de las unidades secretorias y de los conductos de la glándula salival.

El sistema simpático es el principal regulador de la secreción de proteínas vía receptores beta-adrenérgicos, en contraste la secreción de electrólitos es activada por receptores alfa-adrenérgicos y colinérgicos, los mecanismos intracelulares que actúan en la secreción de electrólitos y agua así como en la descarga de los gránulos de zimógeno no son claros, sin embargo el AMPO cilicio tiene un papel decisivo para los receptores Beta en el mecanismo de secreción de proteínas. La saliva primaria producida por los acinos es isotónica con plasma, transformandose en hipotónica en los conductos estriados donde el sodio es reabsorbido y el potasio es secretado bajo la influencia de la aldosterona ^{1,10,11}.

Las hormonas ejercen niveles de control variados en la secreción salival, lo cual ha hecho pensar que las glándulas salivales puedan tener una función endocrina, esto ha sido demostrado en animales pero no en el hombre. En estudios realizados en Japón han aislado una hormona-proteína llamada parotina de las glándulas parótidas de vacas y cerdos que tiene propiedades reguladoras en la síntesis de proteínas; la relación entre las glándulas salivales y las alteraciones en el metabolismo de la azúcar no es clara, el glucagon que es una hormona que se incrementa con los niveles de azúcar en la sangre es sintetizada en la glándula submandibular de monos y en el hombre ^{10,11}.

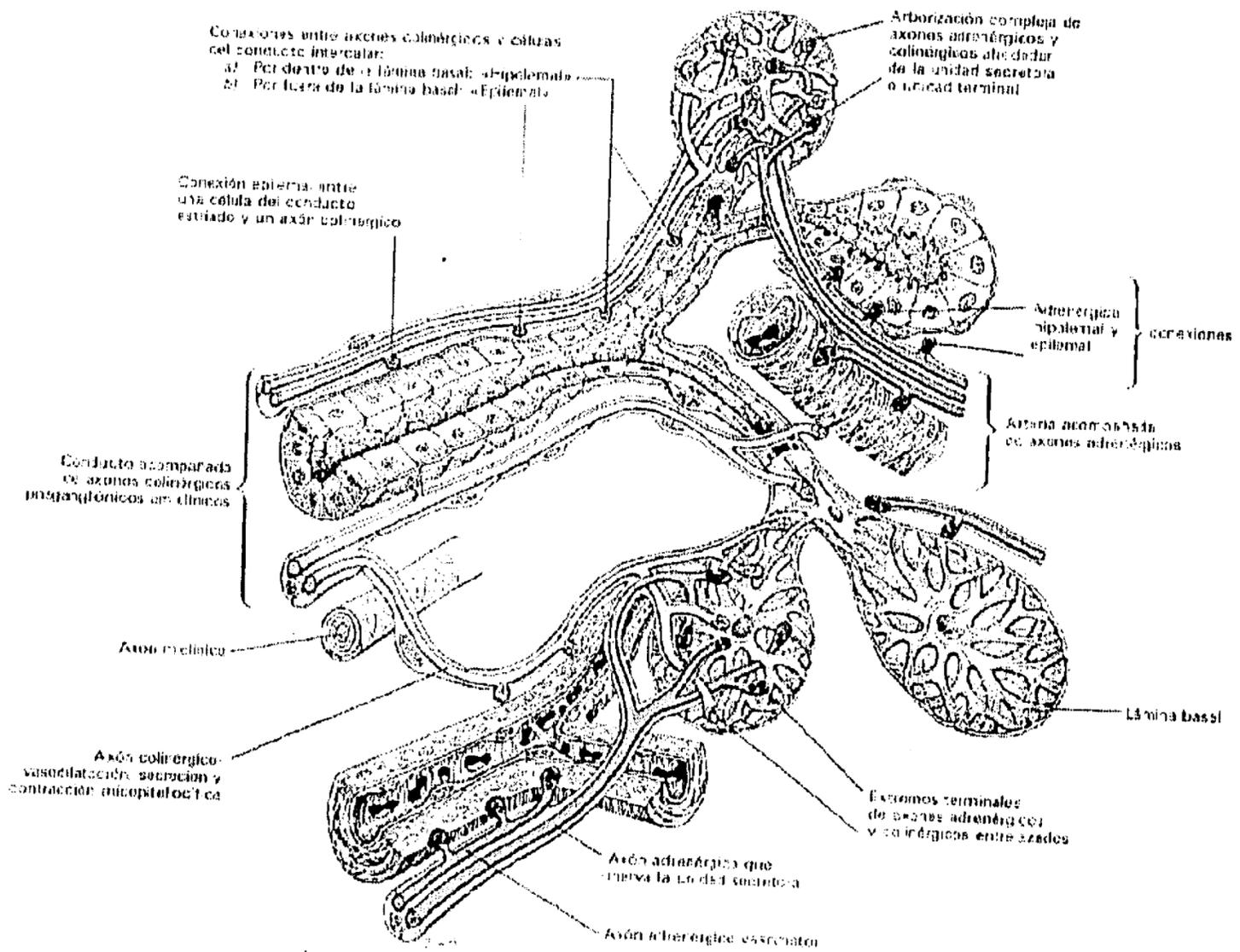


Figura 5. Inervación de las unidades secretoras y conductos de la glándula salival (Tomado de anatomía de Gray 1992)

Godlowski y cols en 1971, demostraron que existe un inhibidor de tripsina que inhibe la proteinasa que divide a la proinsulina en insulina activa, este inhibidor controla la síntesis de una adecuada cantidad de insulina: La calicreina se menciona como la hormona o sustancia semejante a hormona sintetizada en las glándulas salivales humanas y similar a la proteína del suero ¹¹.

La función exocrina digestiva de las glándulas salivales es conocida y en los últimos años se han realizado estudios que permiten sospechar que tienen otras funciones ya que además de la saliva con sus enzimas digestivas que hidrolizan almidón y maltosa sintetizan otros polipéptidos con acción biológica diversa como la hormonal; esto hace pensar que las glándulas salivales pueden tener una función doble, una digestiva y la otra probablemente endocrina, desde el punto de vista embriológico su situación como glándulas anexas al aparato digestivo y su estructura anatómica las hacen muy parecidas a la glándula pancreática que tiene esa función doble, el páncreas tiene el aparato endocrino bien definido en los islotes, pero en las glándulas salivales parece existir solamente el aparato exocrino sin células endocrinas ¹⁷.

Las enfermedades del páncreas endocrino se asocian con alteraciones en la función y el tamaño de las glándulas salivales, por lo general se reporta agrandamiento parotídeo bilateral asociado a enfermedades crónicas como la diabetes, desnutrición, elevación rápida de la glucosa en sangre e hipertensión arterial ¹⁸⁻²¹. La causa del agrandamiento de la glándula parótida no se ha establecido; al principio se creía que era el resultado de una hiperplasia compensatoria (función

endocrina) como respuesta al bajo nivel de insulina, sin embargo no está claro el papel de la función endocrina sobre la glándula parótida ^{19,20}.

DIABETES EXPERIMENTAL

La inducción de la diabetes se ha llevado a cabo por medio de diversas técnicas experimentales, en 1889 VonMering y Minkowski produjeron diabetes experimental en perros mediante la remoción quirúrgica del páncreas, desde entonces la pancreatectomía total se usa en muchas especies con el propósito de crear modelos experimentales ²²

La diabetes en animales puede ser inducida quirúrgicamente, por infección viral, con administración de hormonas o con agentes químicos y algunos animales pueden desarrollar diabetes espontáneamente. La diabetes espontánea es más frecuente en roedores como ratas, ratones y hámster, por lo que ellos son considerados modelos adecuados para el estudio del desarrollo natural de la enfermedad ²²⁻²⁴.

La aloxana y la estreptozotocina son usadas con suma frecuencia como agentes diabetógenos, por su selectividad por las células Beta pancreáticas. La inducción del síndrome diabético, varía entre las diferentes especies, las ratas muestran una respuesta constante a la aloxana por lo cual se considera un excelente modelo ²³. Se define como dosis diabetógena la cantidad de agente inductor que en 80% de los animales de una especie dada produce hiperglucemia sostenida y necrosis de las células **B** del islote pancreático y que no causa daño en otros órganos ^{24,25}.

El uso de agentes químicos puede provocar diabetes permitiendo realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción de un estado diabético; existen varias clases de agentes químicos; los que causan citotoxicidad específica destruyendo las células **B** del páncreas causando un estado de deficiencia primaria de insulina, los que actúan sobre las células Beta pero no las destruyen y un tercer grupo que es el que incrementa los requerimientos endógenos de insulina debilitando al páncreas y provocando diabetes, este último grupo incluye a las hormonas antagonistas de la insulina, anticuerpos anti-insulina y algunos agentes quelantes en particular el zinc ²².

Dentro de los químicos que tienen toxicidad selectiva para las células **B** pancreáticas, se encuentran: **a)** la aloxana, una pirimidina con estructura similar al ácido úrico y a la glucosa; **b)** la estreptozotocina la cual se cree que puede ser una cadena lateral de nitrosourea altamente reactiva de glucosa y **c)** el Vacor un rodenticida con diferentes ingredientes diabetógenos activos; los tres diabetógenos tienen estructura molecular similar, por lo cual su sitio de acción citotóxica es común, el entender el mecanismo de acción de estos compuestos es importante para entender el proceso destructivo de las células **B** en general y el daño ocasionado al páncreas endocrino ^{22,25}.

ESTREPTOZOTOCINA.

Substancia relativamente selectiva para las células **B** que en ciertas especies causa diabetes permanente, la fijación a la membrana a

semejanza de la aloxana, es el primer evento en el proceso patológico, algunas evidencias indican que la toxicidad de la estreptozotocina es mediada por el reconocimiento específico de algunos receptores sobre la célula **B** se cree que provoca un decremento en los niveles del dinucleótido de nicotinamida y adenina ya que puede disminuir tanto su síntesis como incrementar su hidrólisis ²².

Inhibe la incorporación de precursores de la síntesis de DNA, RNA y proteínas, el grupo 1 metil-nitrosourea es el responsable de la toxicidad celular, afecta a algunas células **A**, la toxicidad se basa en el papel central de los nucleótidos de pirimidina en el metabolismo de las células **B**, su toxicidad decrece cuando se combina con aloxana en perros (28). La nicotinamida protege a los animales contra la citotoxicidad tanto de estreptozotocina como de aloxana ^{22,25}.

La diabetes experimental inducida con estreptozotocina afecta la estructura y la función de las glándulas salivales mayores en la rata, la acumulación de lípidos en las células parenquimatosas de la parótida ha sido demostrada que se presenta dentro de las primeras 24 horas de inducción de la diabetes y que en ausencia de tratamiento de insulina los lípidos intracelulares persisten indefinidamente, esto puede ser discutido ya que esta acumulación puede resultar de la toxicidad de la estreptozotocina; sin embargo cambios similares ocurren en la diabetes por aloxana, la acumulación lipídica en la glándula submaxilar y sublingual presentan cambios similares a la parótida, las tres glándulas muestran acumulación lipídica similar, presentándose en las células acinares y en los conductos intercalares, pero no en las células de los conductos estriados ni excretorios ²⁶.

High y cols ²⁷, estudiaron la morfología de 9 glándulas submandibulares y páncreas de ratas Wistar después de tres meses de inducirles diabetes con estreptozotocina, demostrando que el peso corporal de las ratas diabéticas tiende a disminuir al igual que el peso de las glándulas, ellos describen que los cambios morfológicos del páncreas son ausencia de gránulos en el citoplasma de las células Beta con reducción en el tamaño de los islotes pancreáticos necrosis, degeneración vacuolar y edema discreto.

El daño pancreático y el daño a las glándulas submandibulares y sublinguales ha sido reportado en ratas tratadas con estreptozotocina, describiendo que a las seis semanas de la inducción el tejido pancreático presenta francos cambios como son, necrosis celular, degeneración vacuolar, edema discreto y ausencia de gránulos en las células Beta, en algunos de los casos encontraron reducción en el tamaño del islote, reportan que las glándulas salivales estudiadas presentaron células acinares necróticas en forma aislada y ocasionalmente núcleos gigantes, vacuolización, en algunas células epiteliales de los conductos intercalares encontraron vacuolas que rechazaban el núcleo a la periferia, formando la llamada imagen de anillo de sello ¹⁷.

ALOXANA

La aloxana, activo agente oxidante que se combina fácilmente con el zinc y con los grupos sulfhidrilo causan lesiones en muchos tipos de células vivas, sin embargo las células **B** parecen particularmente sensibles a este agente. La secuencia de eventos que sigue a la

inyección de la aloxana inician con una hiperglicemia regulada por una excesiva secreción temporal de adrenalina , seguida rápidamente por liberación de insulina con un descenso de azúcar en la sangre, a continuación se provoca lesión en las células **B**, desaparece la insulina y las células degeneran con un incremento de los niveles de glucosa en la sangre ²⁵ .

Las células **A** de los islotes permanecen inalteradas, cantidades excesivas del fármaco provocan actividad citotóxica en hígado, riñón y corteza suprarrenal ^{2,22,24} .

La toxicidad de la aloxana a las células **B** fue descubierta fortuitamente mientras se usaba como testigo de nefrotoxicidad de derivados del ácido úrico en ratas y conejos. La aloxana existe en diferentes formas tautoméricas, es altamente inestable en agua en pH neutro y razonablemente estable en un pH menor de 3, su estructura se muestra en la **figura 6**, se ha sugerido que la aloxana "per se" no es tóxica pero si sus metabolitos pueden ser responsables de su acción citotóxica y que los metabolitos del ácido úrico tóxico pueden estar involucrados en la diabetes humana ² .

Es soluble en agua, ligeramente ácida, tiene alta afinidad por los grupos tiol es quelante del zinc inhibe las hexocinasas u otras enzimas, inactiva el CoA y actúa en la liberación de tripsina del tejido exógeno ²⁵ .

Al administrar aloxana, se observa una descarga acelerada de insulina, la cual queda rápidamente oscurecida por su efecto tóxico específico que causa degeneración irreversible de las células **B** , se

considera que puede interferir con el proceso normal de liberación de insulina quizá por paralización del mecanismo activo de liberación, a dosis bajas, después de lo cual la célula y su contenido en insulina quedan completamente destruidos a medida que se incrementa la dosis ².

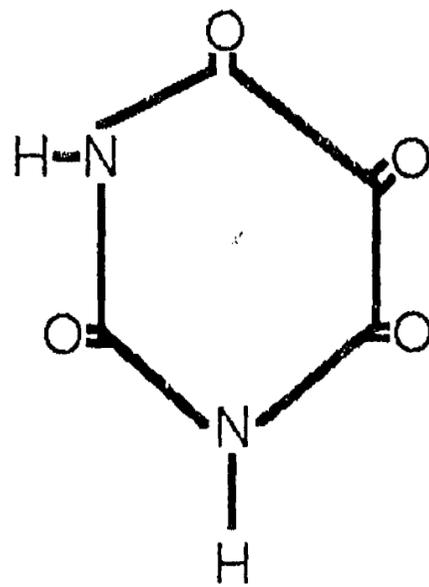


Figura 6: Estructura de la aloxana.

(TOMADO DE DIABETES MELLITUS. ISLAS S, LIESHITZ A. 1993)

La aloxana es rápidamente asimilada por las células **B** y el efecto es directo sobre la permeabilidad de la membrana, dentro de las alteraciones morfológicas se observa ruptura de la membrana de las células, hay evidencias de que la aloxana actúa en el sitio de transporte de las hexosas e inhibe la estimulación de glucosa liberando insulina, también interviene en la liberación de energía generada por glucosa por inhibición del flujo glicolítico y la oxidación de piruvato ²³.

La alta concentración de glucosa y la 2 desoxi 3-0 metilglucosa no metabolizada bloquean el sitio de acción de la aloxana y restablecen la producción de ella.

Ellenberg y Rifkins ²³, mencionan que Malaisse en una revisión crítica del mecanismo de toxicidad de la aloxana opina que los defectos deteriorantes de la aloxana sobre la permeabilidad, el transporte, la vía generadora de energía intracelular y la secreción de insulina es probable que sea por la formación de radicales libres, ya que parece ser que la aloxana es rápidamente reducida dentro de la célula a ácido dialúrico; la interacción con la membrana y factores celulares influyen en la toxicidad posiblemente por la generación de radicales libres. Los radicales OH los cuales son extremadamente reactivos como agentes oxidantes dañan varios constituyentes celulares, estos pueden ser visualizados por quimioluminiscencia. La aloxana también tiene algún efecto sobre la síntesis de glucagón en las células A.

La administración de aloxana es más efectiva inyectada intravenosamente en una dosis de 40 o 45 mg/kg y produce daño funcional irreversible en cuestión de minutos y cambios estructurales dentro de las primeras horas en roedores, perros, gatos, conejos, monos, peces y aves. La respuesta a la aloxana puede ser dividida en tres fases: Hiperglicemia inicial con duración aproximada de 2 horas probablemente por glucogenólisis hepática, seguida de hipoglicemia transitoria aproximadamente en 6 horas por la disminución de insulina por daño celular, cuando la hiperglicemia es permanente dura hasta 12 horas, la hiperglicemia no es esencial para la acción citotóxica ²⁸.

Tratamientos preventivos para evitar el daño a las células B han sido usados por varios mecanismos como alcalosis metabólica inducida con bicarbonato de sodio o lactato previo a la inyección de aloxana, pero no posterior a la administración de ella, glucosa, manosa y fructuosa también protegen previo a la administración de aloxana ².

La glándula parótida y la saliva fueron estudiadas en ratas machos 14 días posterior a la inducción de diabetes por aloxana; en el examen histológico de rutina grandes vacuolas intracelulares se observaron en los acinos, pero no en las células de los conductos, además de los lípidos intracelulares numerosas figuras mitóticas se observaron en todas las secciones pero no en el grupo control, la cantidad de amilasa en las glándulas se encontraba reducida en contraste con la peroxidasa total la cual no varió entre el grupo control y el experimental, la separación electroforética de las proteínas salivales mostró que los niveles de esta estaban desproporcionalmente afectados, los cambios en las glándulas y la saliva no fueron característicos de un incremento en la función de la glándula sino de una reducción en la estimulación de ella ⁴.

En un reporte previo en nuestro laboratorio ²⁹, sobre la histomorfología de la glándula parótida de rata tratada con aloxana, reportamos que los cambios observados en ésta corresponden a un proceso degenerativo severo, los resultados nos hicieron pensar que los cambios observados probablemente eran por efecto directo de la aloxana sobre las glándulas y uno de los hallazgos que consideramos de importancia fueron el cambio con respecto a la afinidad tintorial de las células secretoras acinares cuyos gránulos en condiciones normales eran

eosinófilos finos y en las tratadas con aloxana se encontraron basófilos finos.

POLIAMINAS

El descubrimiento de la función de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en la regulación de procesos como crecimiento celular, multiplicación y diferenciación ha despertado gran interés por su estudio en diversas áreas de la investigación. Las poliaminas están ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos ³⁰⁻³².

Se ha considerado que juegan un importante papel intracelular, ejerciendo efecto sobre la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y en la estabilización de los mismos ácidos, también se ha demostrado que pueden actuar como sustratos para transglutaminasas y como moduladores de cinasas y participar en la modificación postranscripcional de las proteínas, Hougaard y cols ³³, desarrollaron 2 métodos citoquímicos de fluorescencia, el fluorescamina-formaldehído y el 0-ftaldehído los cuales difieren en su principio químico demostrando selectivamente los 2 tipos principales de poliaminas: espermidina y espermina, este reveló una distribución idéntica de ellas en el cuerpo y esta distribución corresponde a la misma distribución obtenida por ellos años atrás por métodos químicos (1982), la distribución citoquímica en la glándula prostática parece corresponder no solo a la determinación química sino también a la distribución de espermidina y espermina con autoradiografía después de inyecciones de su precursor la putrescina; cuando se estudia la distribución de poliaminas en condiciones normales

se encuentran principalmente en el sistema de células neurales, en el endocrino y en células de los islotes pancreáticos.

La localización de poliaminas en células productoras de insulina y la biosíntesis de poliaminas "in vitro" es estimulada por la glucosa, el cuál es el mayor estimulante para la liberación de insulina y la replicación celular. Blume y cols ³⁴, reportan que el isoproterenol estimula la liberación de mucina de la glándula submandibular de la rata y está asociada con un rápido incremento en los niveles de poliaminas , así mismo el incremento en la síntesis de poliaminas esta envuelto en otros eventos estimulados por hormonas en esta glándula, por ejemplo, algunos promotores del crecimiento dependen del incremento en la actividad de la ornitina descarboxilasa y los niveles de poliaminas , los cuales ocurren de 4 a 20 horas después de la inyección en un animal intacto, también pueden mediar la inducción de la actividad de proteasas en la glándula submandibular de la rata por testosterona.

La vía única de la biosíntesis de las poliaminas en mamíferos es por descarboxilación de ornitina a putrescina la cuál se convierte en espermidina y espermina por adición sucesiva de grupos aminopropil derivados de la adenosilmetionina carboxilada, la síntesis de poliaminas se muestra en la **figura 7**; la biosíntesis es elevada durante el crecimiento y el metabolismo de las poliaminas puede verse incrementado en órganos blanco por exposición a hormonas específicas, la actividad de la ornitina descarboxilasa y las poliaminas han sido demostradas en

glándulas salivales de ratas por estimulación simpática y parasimpática la concentración de putrescina en la glándula parótida y submaxilar se incrementa después de 3 horas de la estimulación pero no hay incremento de la espermidina y espermina en ellas, la actividad de la ornitina descarboxilasa depende de la acción nerviosa; incremento en la actividad ocurre después de la estimulación eléctrica de ambas divisiones del sistema nervioso autónomo ³¹.

Previamente nosotros ^{36,37}, estudiamos el efecto de las poliaminas sobre la arquitectura de la glándula parótida de rata diabética y encontramos que el cambio granular acinar observado en las ratas diabéticas disminuye y presenta un aspecto semejante a los gránulos secretorios normales de los acinos en las ratas tratadas con espermina y que estos gránulos fueron PAS (+) a diferencia de las tratadas con aloxana y espermidina en las cuales fueron PAS (-), lo cual podía ser indicativo de alteraciones a nivel de la secreción salival, por lo que consideramos importante estudiar el efecto de estas poliaminas en la prevención del daño a nivel de la glándula parótida y del páncreas bajo la siguiente hipótesis.

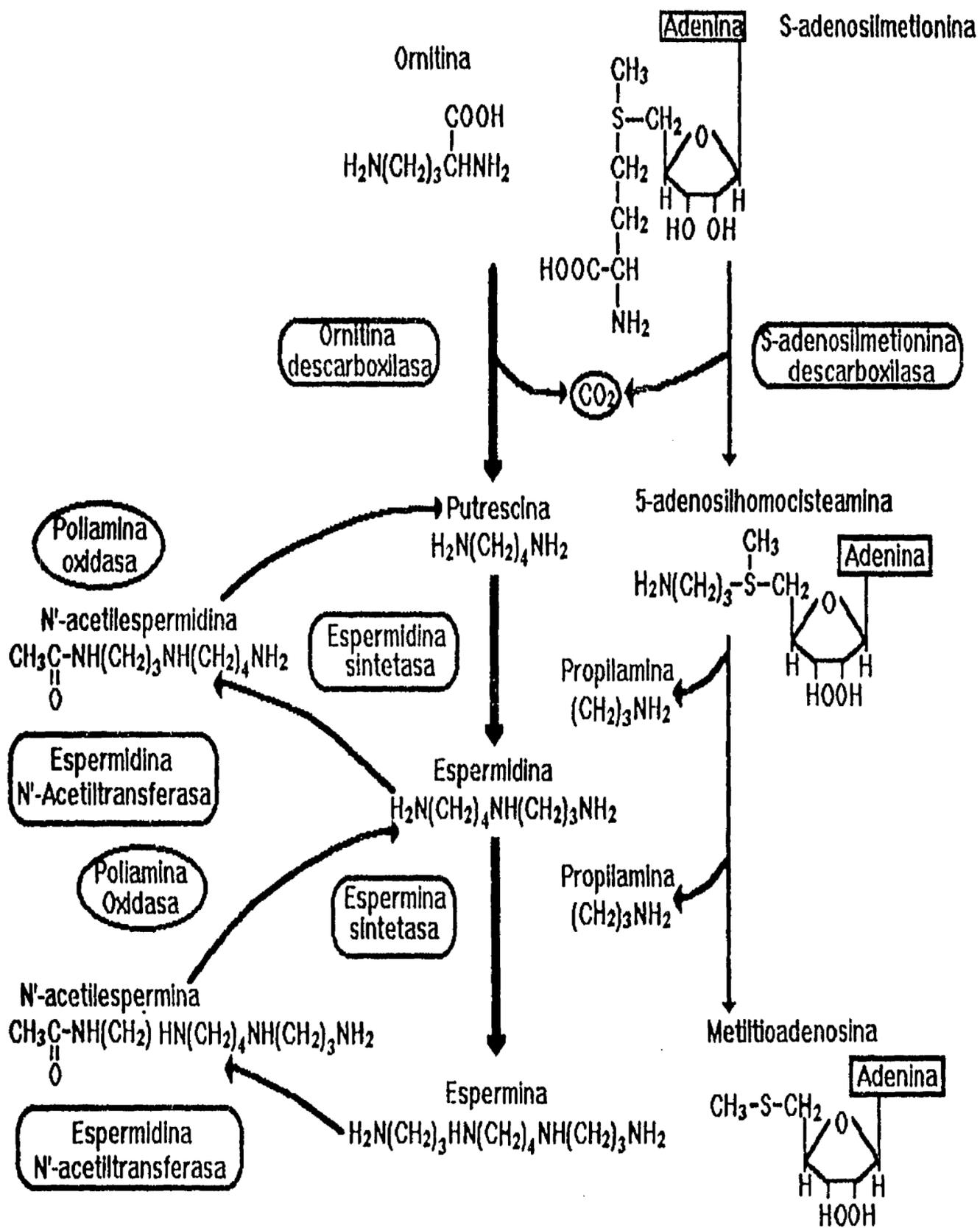


Figura 7. Biosíntesis e interconversión de poliaminas en células de mamífero. (Tomado de *Bioquímica e Inmunología de Hicks 1988*)

HIPOTESIS

La espermidina y la espermina actúan como citoprotectoras de la acción de la aloxana sobre la glándula parótida y el páncreas en animales con diabetes inducida.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las alteraciones morfológicas en la glándula parótida en la rata con diabetes inducida , comparándola con el daño selectivo del diabetógeno y relacionar el efecto protector de la espermedina y espermina sobre la glándula parótida y el páncreas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- * Medir y determinar químicamente los niveles de glucosa, triacilceridos alfa amilasa, arginasa y proteínas en suero para comprobar el estado diabético.
- * Determinar el efecto de la espermidina y espermina en los niveles bioquímicos de glucosa, triacilceridos, alfa amilasa, arginasa y proteínas en el suero.
- * Observar el efecto de la aloxana sobre la citoarquitectura de la glándula parótida.
- * Comparar el daño pancreático ocasionado por la aloxana con el daño parotídeo de la misma.
- * Observar el efecto de la espermidina y la espermina sobre la histomorfología del páncreas y de la glándula parótida posterior a la inducción de diabetes experimental.

GRUPO DE ESTUDIO

Ratas convencionales, cepa Long Evans.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

28 ratas machos

CRITERIOS DE INCLUSION

Ratas machos adultas

3 a 4 meses de edad

300 a 400 g de peso

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

< 3 meses y > 4 meses

< 300g y > 400g

VARIABLES INDEPENDIENTES

Administración de aloxana (120 mg/kg de peso vía intravenosa)

Administración de espermidina (5 mg/kg de peso vía intraperitoneal)

Administración de espermina (5mg/kg de peso vía intraperitoneal)

VARIABLES DEPENDIENTES

* Función pancreática determinada en suero:

Glucosa, triacilglicéridos, alfa amilasa, actividad de arginasa y proteínas.

* Cambios citomorfológicos:

En glándula parótida a nivel de acinos, conductos intercalares, estriados y excretorios.

En páncreas en relación a Islotes pancreáticos y acinos exocrinos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 28 ratas machos adultos convencionales de la cepa Long Evans de 3 a 4 meses de edad, con peso de 300 a 400gm, se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura (12:12 luz-oscuridad y Temperatura de 21 A 27°C).

Su alimentación fue a base de alimento purina y agua "ad libitum".

Los animales se dividieron al azar en 4 grupos de 7 ratas cada uno.

GRUPO 1 7 ratas testigo sin tratamiento

GRUPO 2 7 ratas tratadas con aloxana

GRUPO 3 7 ratas tratadas con aloxana + espermidina

GRUPO 4 7 ratas tratadas con aloxana + espermina

Al GRUPO 1 no se le administró ningún tratamiento

Al GRUPO 2 se le administró una dosis única de aloxana al 10% (Sigma St Louis MO, U.S.A.) disuelta en cloruro de sodio 0.154 M; la dosis fue de 120 mg/Kg de peso vía arteria caudal media

Al GRUPO 3 tratado con aloxana , se le administraron 3 dosis de espermidina (Sigma St Louis MO,U.S.A.) vía intraperitoneal (5mg/Kg de peso) a las 48,72 y 96 horas posteriores a la administración de la aloxana.

Al GRUPO 4 tratado con aloxana se le administraron 3 dosis de espermina (Sigma St Louis MO, U.S.A.) vía intraperitoneal (5mg/Kg de peso) a las 48, 72 y 96 horas posteriores a la administración de la aloxana.

TOMA DE LA MUESTRA DE SANGRE Y DISECCION DE LAS GLANDULAS.

A las 98 horas posteriores al tratamiento los animales fueron sacrificados; se les administró Dehidrobenzperidol 2.5 mg/ml, solución inyectable como tranquilizante a una dosis de 2.5 mg/Kg de peso, a los 15 minutos se les administró ketamina a una dosis de 50 mg/kg de peso y a los siguientes 15 minutos se inició la disección sobre la línea media de la rata.

La muestra de sangre se obtuvo de la arteria aorta inferior antes de la bifurcación de las femorales; se extrajeron de 5 a 6 ml de sangre y se procedió a disecar el páncreas y las glándulas parótidas.

DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

La sangre arterial se incubó a 37°C durante 15 minutos, se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos y se recuperó el suero de los elementos celulares.

Las muestras del suero se separaron y se analizaron para:

Glucosa

Triacilgliceridos

Actividad de alfa amilasa

Actividad de arginasa

Proteínas

GLUCOSA (Test-combination glucosa GOD-POD. Boehringer, Mannheim, Alemania Occidental.

Se tomó 20mcl de alícuota de suero, se le agregó 2.0 ml de amortiguador / enzimas / 4-aminofenasona / fenol, se mezcló perfectamente, se incubó 10 minutos a 37°C en la oscuridad y se midió la absorbancia final a 530 nm previa calibración del colorímetro (CP-1 Science essentials).

TRIACILGLICERIDOS (reactivo triacilgliceridos Color. Gilford Systems, Oberlin, Ohio, U.S.A).

A 10 mcl de suero se le agregó 1.0 ml del reactivo triacilgliceridos color, se dejó 20 minutos a temperatura ambiente (18 a 25°C) se realizó la lectura de la absorbancia a 530 nm en el espectrofotómetro (UNICAM 1800) previamente calibrado frente a un blanco de reactivos.

ALFA AMILASA. (Reactivo alfa-amilasa. Gilford Systems, Oberlin Ohio U.S.A.)

Se tomó una alícuota de 40mcl y se le agregó 1.0 ml del reactivo para alfa-amilasa, se incubó a 37°C , en una celda se realizó una lectura de absorbancia inicial a 405 nm en el espectrofotómetro (UNICAM1800) se realizó una segunda lectura de absorbancia final al minuto frente un blanco de reactivos.

ACTIVIDAD DE ARGINASA.

Con una alícuota de suero se realizó una dilución 1:100 con amortiguador de Tris HCL 0.04 M conteniendo cloruro de manganeso 0.2 mM en NaCl 0.154M . De esta dilución se tomaron 0.9 ml y se activaron a 55°C durante 1 hora, posteriormente se le agregó 0.1 ml de una solución acuosa de arginina 0.4M/glicina 0.15M, se incubó durante 15 Min. a 37°C y se sumergió en un baño de agua hirviendo durante 7 min. , aparte se tomó una alícuota de 0.2 ml para medir la actividad de arginasa cuantificando la urea . (ver apéndice).

PROTEÍNAS TOTALES.

Una alícuota de suero fue diluída 1:10 y de esta dilución se tomaron 10 mcl para determinar proteínas según el método propuesto por Lowry (ver apéndice).

TECNICA HISTOLOGICA.

El páncreas y las glándulas parótidas una vez disecados fueron colocados en solución neutra fijadora de formalina, y se procesaron de manera rutinaria para la técnica de inclusión en parafina, se realizaron cortes seriados a 5 micras de cada una de las glándulas en estudio.

Para el análisis histológico se realizaron las siguientes tinciones:

Hematoxilina y eosina

Acido periódico de Schiff (PAS) contrastado con Hematoxilina.

PAS y azul alciano pH 2.5

ACIDO PERIODICO DE SCHIFF

Se utiliza para glucógeno, mucosubstancias, material coloide, depósitos hialinos, membrana basal e infiltración amiloide , que pueden presentar una reacción positiva rosa o rojo púrpura.

PAS Y AZUL ALCIANO pH 2.5

Se usa para todos los polisacáridos y mucosustancias que contienen hexosas o desoxihexosas con grupos glicol vecinos y se tiñen de magenta a rojo, todas las mucosubstancias que se tiñen de rojo incluyen mucosustancias neutras.

El ácido hialurónico, las sialomucinas y no todas pero la mayoría de las mucosubstancias ácido sulfatadas fuertemente se tiñen de azul.

CRITERIOS PARA EL ANALISIS HISTOLOGICO CON HEMATOXILINA Y EOSINA (Glándula parótida)

Para llevar a cabo la cuantificación de los cambios morfológicos se tomó en cuenta la morfología de la glándula normal ya descrita en la literatura, tomando en consideración las siguientes estructuras: Acinos, conductos intercalares, estriados y excretores, los aspectos morfológicos utilizados para describir cambios en la arquitectura de la glándula

parótida de los animales en estudio con la tinción de H y E fueron los siguientes:

A NIVEL ACINAR

Pérdida del patrón acinar, vacuolización, citoplasma con predominio basófilo, pérdida de los límites celulares, gránulos basófilos gruesos, núcleos desplazados, núcleos gigantes y picnosis.

EN CONDUCTOS INTERCALARES

Vacuolización, disposición celular irregular, lisis de células ductuales, núcleos gigantes y picnosis

EN CONDUCTOS ESTRIADOS

Disposición irregular, vacuolización, lisis de células ductuales, pérdida de las estriaciones, núcleos gigantes y picnosis.

A NIVEL DE LOS CONDUCTOS EXCRETORES

Células columnares, cúbicas o cúbicas altas, vacuolización, gránulos basales citoplasmáticos, lisis de células ductuales y núcleos polarizados.

CRITERIOS PARA EL ANALISIS HISTOLOGICO CON LA TINCION DE ACIDO PERIODICO DE SCHIFF (PAS)

En base a la citomorfología de la glándula parótida.

A NIVEL ACINAR

Gránulos PAS + en la porción apical y gránulos PAS - en la porción basal .

A NIVEL DUCTUAL

Células de los conductos intercalares, estriados y excretores son PAS+

El contenido luminal PAS+.

PARAMETROS PARA EL ANALISIS HISTOLOGICO CON LA TINCION PAS- AZUL ALCIANO pH 2.5 (Glándula parótida).

A NIVEL ACINAR.

Gránulos finos PAS+ en la porción apical decreciendo paulatinamente hacia la porción basal

Porción basal citoplasmática gránulos azul claro.

A NIVEL DUCTUAL

Gránulos PAS+ en la porción luminal de las células de los conductos intercalares, el contenido luminal PAS +

Las células de los conductos estriados y excretores citoplasma azul o PAS-

CRITERIOS PARA EL ANALISIS HISTOLOGICO DEL PANCREAS CON TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA.

El páncreas normal de la rata está formado por acinos dispuestos en forma irregular, formando la mayor parte de los lobulillos, las células secretoras exocrinas tienen núcleos redondos dispuestos hacia la membrana basal, dando aspecto de anillo en la parte más externa del acino.

Las células tienen forma más o menos piramidal con límites celulares indistinguibles y con citoplasma granular.

Los islotes pancreáticos son de forma irregular compuestos por células piramidales grandes con núcleo central y citoplasma levemente teñido (células **B**), células en forma de raqueta con citoplasma eosinófilo (células **D**) y células periféricas pequeñas con citoplasma levemente teñido y núcleo central hipercromático (células **A**) entre ellas vasos sanguíneos.

Los conductos formados por células cúbicas con citoplasma eosinófilo y núcleos redondos en situación central.

CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL PANCREAS CON LA TINCION DE PAS.

A NIVEL ACINAR

Formación anular PAS(-) en la porción basal, gránulos citoplasmáticos apicales PAS(+), material PAS(+) disperso entre los acinos, conductos con contenido PAS(+).

EN LOS ISLOTES PANCREATICOS

Gránulos PAS(+) y material PAS(+) disperso.

CRITERIOS PARA LA EVALUACION DEL PANCREAS CON PAS-AZUL ALCIANO pH 2.5

A NIVEL ACINAR

Anillo basal PAS(-), material granular fino PAS(+) y material PAS(+) disperso.

EN LOS ISLOTES PANCREATICOS

Células con citoplasma PAS(-) , material granular PAS(+).

ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis de los resultados de las determinaciones bioquímicas se sacó promedio y desviación estándar, se realizó la prueba estadística de Fisher con una F calculada a .95 con un nivel de significancia de 0.05.

Para llevar a cabo el análisis citomorfológico se utilizó el método de escala ordinal con el siguiente orden: nulo =0, leve=1, moderado=2 y severo=3, los n meros nos indican el orden pero no es demostrativo de la magnitud de las diferencias entre ambos tratamientos.

La cuantificación de los gránulos de los acinos afectados se realizó asignándoles un n mero con el objeto de identificar ordenadamente las características. La determinación de la presencia de gránulos finos y gruesos se estableció también en base a la escala ordinal utilizando la relación mayor que > y menor que <.

A las frecuencias entre 0 y 3 se les saco promedio y porcentaje.

RESULTADOS

Al final del tratamiento, el peso de las ratas diabéticas y tratadas con poliaminas fue más bajo que el de las ratas normales con un promedio de 304.44 \pm 9.09 de desviación estándar a 269.3 \pm 14.60, $p < 0.05$.

Los resultados de las determinaciones bioquímicas de los niveles de glucosa, triacilglicéridos, alfa amilasa, proteínas y actividad de arginasa de los diferentes grupos en estudio presentaron variaciones considerables.

Los valores de glucosa que se presentan en la **tabla 1** sugieren la presencia de daño pancreático causado por la aloxana, cabe señalar que la espermidina y espermina aumentan significativamente el valor de glucosa con respecto al grupo control y al grupo tratado con aloxana.

Con respecto a los triacilglicéridos la espermidina y la espermina disminuyen significativamente el nivel de estos al compararlo con el grupo diabético y en el caso de la espermina también disminuye al compararla con el grupo control, como se observa en la **tabla 1**.

La medición de alfa amilasa se realizó para evaluar si el daño causado por la aloxana es únicamente a nivel endocrino, ya que una disminución en la actividad de alfa amilasa indica un posible desequilibrio en la función exocrina, encontrando que la actividad de alfa amilasa se recupera en el grupo tratado con espermidina en el cual se observó un incremento en su actividad comparado con el grupo tratado con espermina en la que existió una disminución significativa inclusive con el grupo control.

Encontramos incrementos significativos en la concentración de proteínas en el suero de las ratas tratadas con espermidina, no así en las ratas tratadas con espermina.

La actividad de arginasa en el suero disminuyó considerablemente en el grupo de ratas diabéticas y aunque no alcanza los valores normales, se observa que tiende a la recuperación de estos con la administración de espermina y espermidina.

TABLA 1
Determinaciones bioquímicas del total del grupo en estudio.

	CONTROL	ALOXANA	ESPERMIDINA	ESPERMINA
Glucosa (mg/dl)	131.41 ±10.0	363.87 ±52.03	465.47 ±113.86	443.14 ±8.58
Triacilgliceridos (mg/dl)	47.18 ±5.53	70.83 ±21.46	53.24 ±23.57	44.41 ±3.72
Alfa amilasa (U/l)	931.97 ±97.46	865.71 ±168.94	1373.95 ±306.12	558.64 ±107.26
Proteínas (g %)	8.20 ±0.34	8.65 ±0.85	8.64 ±0.23	7.63 ±0.66
Arginasa moles de urea/mg prot/min	11.46 ±0.29	5.19 ±1.32	3.19 ±0.91	4.54 ±0.49

Los valores son el promedio ± la desviación estandard.

p<0.005

(Prueba estadística de Fisher)

TAMAÑO DE LA MUESTRA 28 ratas.

HALLAZGOS HISTOPATOLOGICOS EN GLANDULA PAROTIDA

El número total de especímenes analizados fue 56, 28 de glándula parótida y 28 de páncreas con un total de 168 laminillas seleccionadas del total de los cortes seriados.

El grupo 1 fue utilizado como grupo control para comparar la morfología normal y alterada, como se observa en las **figuras 1a, 2a y 3a** de la glándula parótida.

Las alteraciones histopatológicas observadas en la glándula parótida de las ratas tratadas con aloxana representan un proceso degenerativo severo, que consistió en pérdida del patrón acinar, células con citoplasma de predominio basófilo, vacuolización con desplazamiento basal de los núcleos, necrosis severa con núcleos gigantes y picnosis principalmente, vacuolización de las células de los conductos estriados, predominando las células cúbicas con disminución en la cantidad de estrias, en los conductos excretores predominaron las células cúbicas altas, el aspecto morfológico de la glándula se muestra en la **Figura 1b**

En el grupo tratado con espermidina encontramos una reducción leve con respecto a las alteraciones en el grupo tratado con aloxana, principalmente en el núcleo ya que este no presentaba los cambios morfológicos de muerte celular que se observaban en el grupo de aloxana, pero un dato interesante fue el incremento en la basofilia

citoplasmática así como el predominio de gránulos basófilos gruesos que en el grupo 2 cuando se encontraron fueron basófilos finos .

En los conductos intercalares no se observaron cambios con respecto al grupo 2 a excepción de que la disposición de las células fue más regular, la pérdida de las estriaciones de los conductos estriados observadas en el grupo 2 disminuyó levemente en este grupo, pero ocasionalmente encontramos totalmente desorganizadas las células de los conductos como se puede apreciar en la **figura c.**

Los hallazgos encontrados en el grupo 4 de las ratas tratadas con espermina se muestran en la **Figura 1d**; fueron diferentes en cuanto a la cantidad de daño al compararlo con los grupos 2 y 3 ya que el citoplasma presentaba características similares al grupo 1 con una disposición granular eosinófila fina en la porción apical del acino y menor cantidad de cambios morfológicos nucleares de muerte celular, los conductos estriados presentaban menor pérdida de las estriaciones y menor cantidad de núcleos gigantes , los resultados obtenidos en los grupos 2, 3 y 4 se muestran en promedio y porcentaje de daño en la **Tabla 2.**

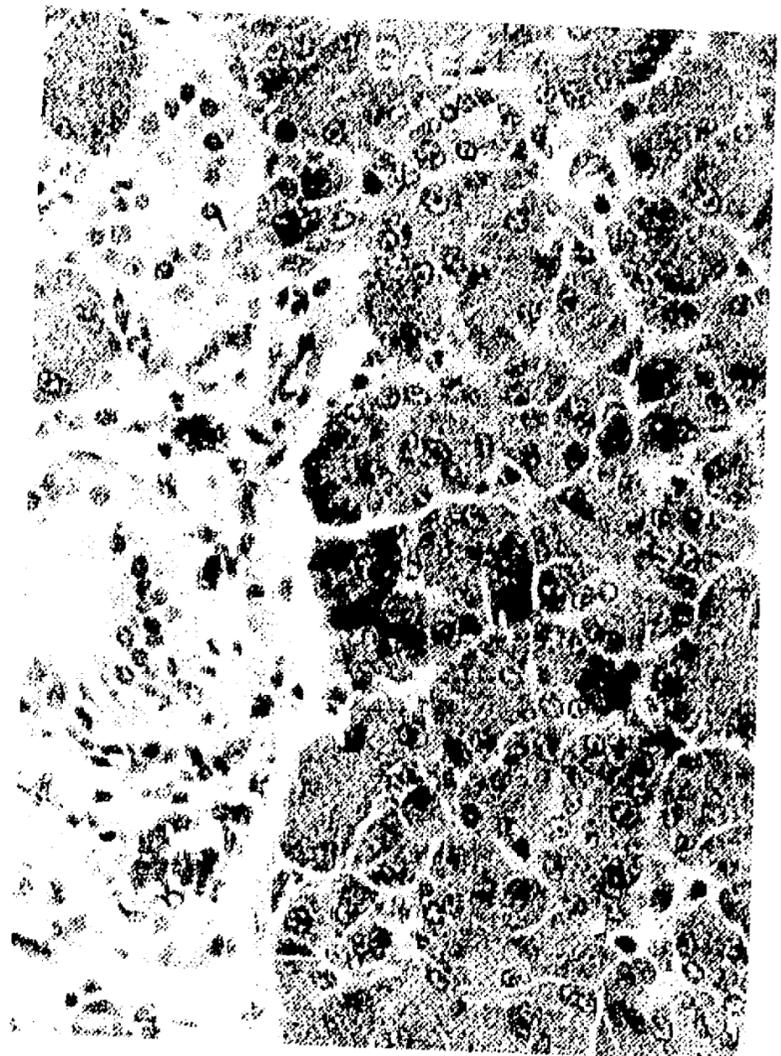
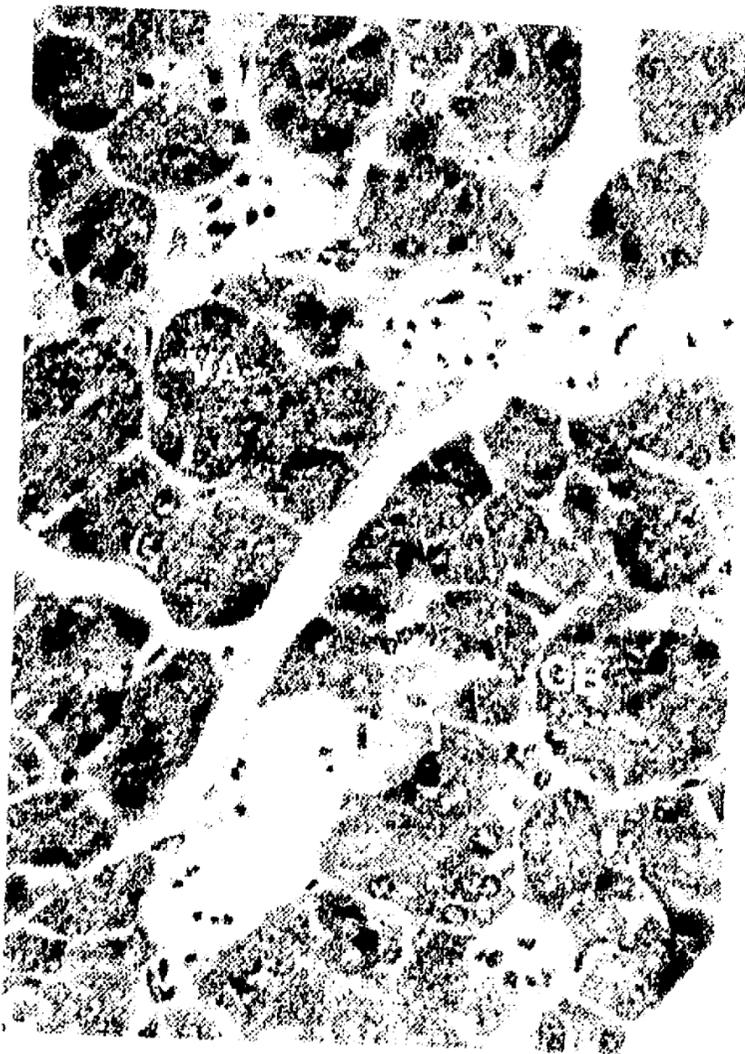
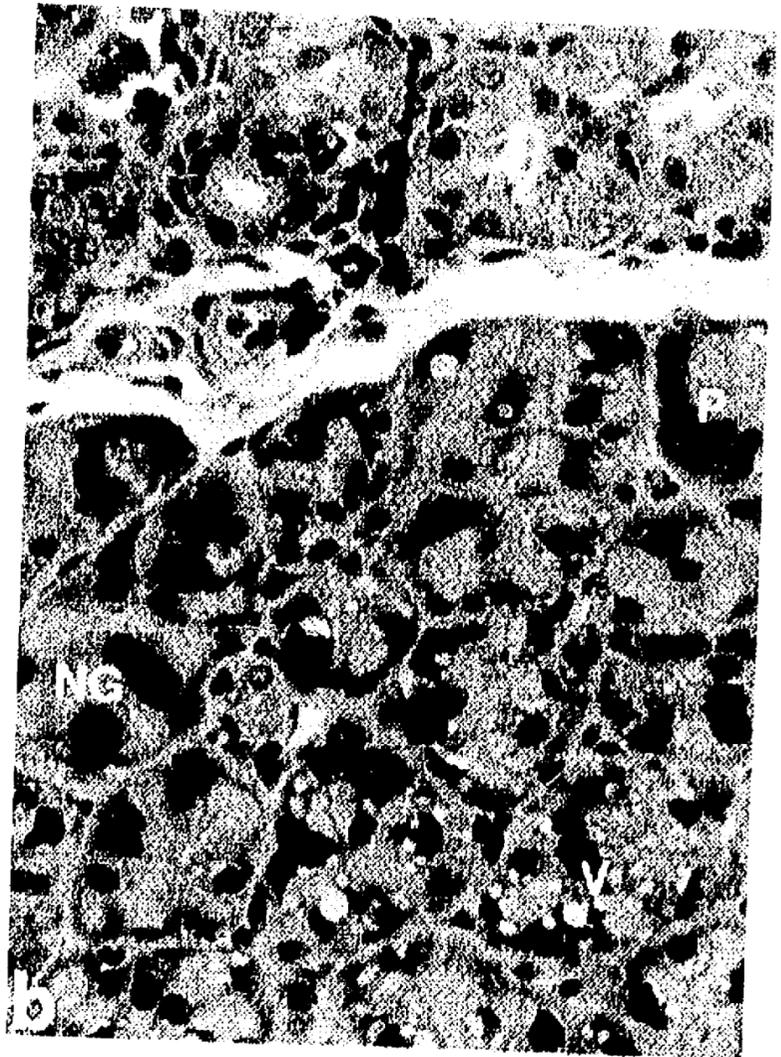
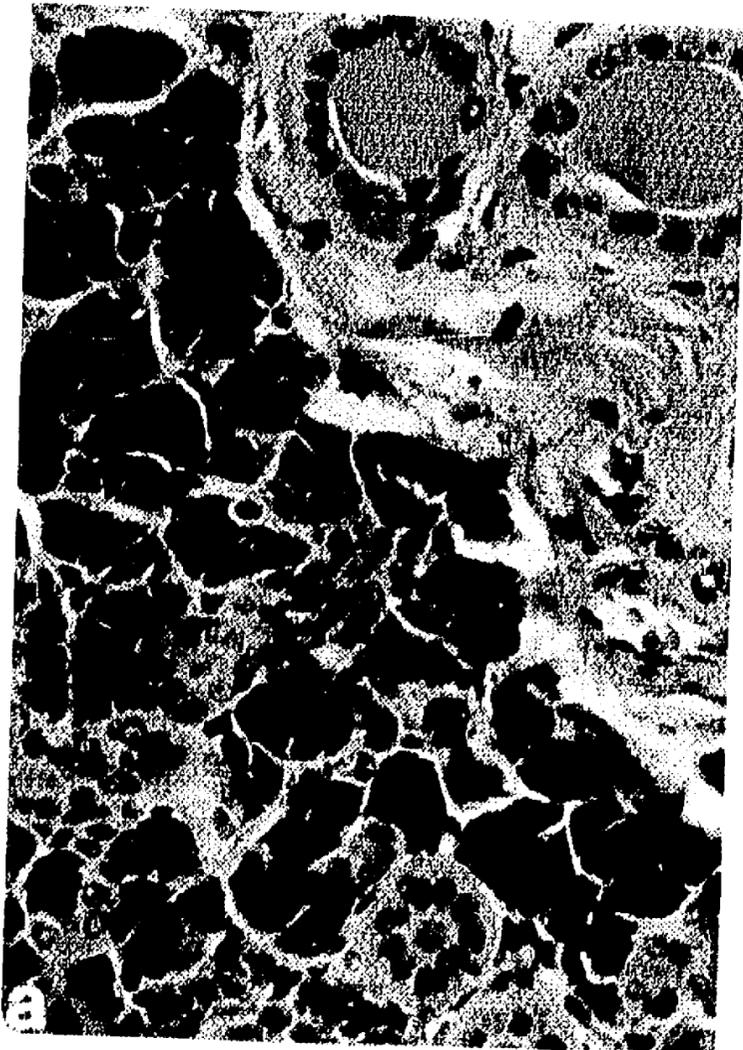


FIGURA 1. a) Glándula parótida normal b) Parótida del grupo 2 (aloxana) N, necrosis; V, vacuolización; NG; núcleos gigantes; P, picnosis c) Parótida del grupo 3 (Espermidina) NG, núcleos gigantes; P, picnosis; GB, gránulos basófilos; VA, vacuolización acinar VD, vacuolización ductual d) Grupo 4 (Espermina) GAE, gránulos apicales eosinófilos; V vacuolización; P, picnosis. (H&E 20x)

Tabla 2

PROMEDIO Y PORCENTAJE DEL ANALISIS HISTÓLOGICO DE LA GLANDULA PAROTIDA (Tinción Hematoxilina y Eosina)

	GRUPO 1 CONTROL		GRUPO 2 ALOXANA		GRUPO 3 ESPERMIDINA		GRUPO 4 ESPERMINA	
	x	%	x	%	x	%	x	%
Nº de animales	7		7		7		7	
ACINO								
Perdida del patrón acinar	0.14	4.66	2.71	90.33	2.42	80.95	2.14	71.33
Vacuolización	-	-	2.57	85.70	2.42	80.95	1.28	42.85
Citoplasma basófilo	0.42	14.28	1.42	47.60	3.00	100	0.42	14.28
Perdida de limites celulares	-	-	2.85	95.20	2.42	80.95	1.71	57.14
Gránulos basófilos gruesos	-	-	1.42	47.60	2.85	95.23	1.00	33.33
Núcleos desplazados	0.71	23.8	2.57	85.70	2.57	85.71	1.85	61.90
Núcleos Gigantes	-	-	2.71	90.33	1.14	38.09	1.57	52.38
Picnosis	-	-	2.57	85.72	2.28	76.19	1.28	42.85
CONDUCTOS INTERCALARES								
Vacuolización	-	-	0.42	14.28	1.71	57.14	1.00	33.33
Disposición irregular	0.85	28.57	2.42	80.95	1.57	52.33	0.85	8.57
Lisis celular	-	-	2.42	80.95	1.42	47.61	0.57	19.04
Picnosis	-	-	0.14	4.66	1.00	33.33	0.28	9.52
CONDUCTOS ESTRIADOS								
Disposición irregular	0.14	4.66	2.57	85.73	1.71	57.14	1.00	33.33
Vacuolización	0.14	4.66	1.28	42.85	1.85	61.66	1.57	52.38
Lisis celular	-	-	2.71	90.47	1.85	61.66	1.00	33.33
Pérdida de las estriaciones	-	-	2.85	95.23	2.14	71.42	0.85	28.33
Núcleos gigantes	0.14	4.66	2.14	71.42	1.28	42.85	0.42	14.28
CONDUCTOS EXCRETORES								
Células columnares	-	-	0.71	23.80	-	-	0.14	4.76
Células cúbicas	1.71	57.14	0.85	28.57	2.14	71.42	1.57	52.38
Células cúbicas altas	1.57	52.38	1.28	42.85	1.28	42.85	1.71	57.14
Vacuolización	-	-	0.14	4.66	1.28	42.85	1.14	38.09
Lisis celular	-	-	1.57	52.38	1.42	47.61	1.71	57.14
Núcleos polarizados	0.42	14.28	1.71	57.14	0.71	23.80	0.71	23.80

Tamaño de la muestra 28 ratas

Con la tinción de PAS en el grupo 2 encontramos que en la mayor parte del citoplasma los gránulos fueron PAS(-) finos, con algunos gránulos PAS(+) dispersos, incrementándose la cantidad de gránulos PAS(-) en el grupo 3 observándose gruesos casi en la totalidad del citoplasma pero ocasionalmente se encontraron gránulos PAS(+); en el grupo 4 se encontró lo contrario, los gránulos fueron PAS(+) y ocupaban casi la totalidad del citoplasma aunque también se encontraban gránulos PAS(-) dispersos en el citoplasma, las células de los conductos intercalares y excretores fueron PAS(-) y se observó que el contenido luminal en ocasiones era PAS(+) en los conductos intercalares y estriados, pero no en los excretores que el contenido luminal era PAS(-), la disposición de los gránulos citoplasmáticos de los acinos se muestra en las **Figuras 2a,b,c y d**. El promedio y porcentaje de la distribución del material PAS(+) y (-) se describe en la **Tabla 3**.

TABLA 3
PROMEDIO Y PORCENTAJE DEL ANÁLISIS HISTOLOGICO DE LA GLANDULA
PAROTIDA (Tinción de PAS)

	GRUPO 1 CONTROL		GRUPO 2 ALOXANA		GRUPO 3 ESPERMIDINA		GRUPO 4 ESPERMIN A		
	x	%	x	%	x	%	x	%	
Nº de animales	7		7		7		7		
ACINO									
Gránulos apicales PAS(+)	2.85	95.2	1.00	33.33	0.14	4.76	2.14	71.42	
Gránulos citoplásmicos PAS(-)	0.14	4.76	2.00	66.66	2.85	95.23	0.85	28.57	
CONDUCTOS									
Células PAS(-)	2.85	95.2	2.42	80.95	2.00	66.66	2.71	90.47	
Contenido luminal PAS(+)	0.71	23.8	0.14	4.76	0.14	4.76	0.28	9.52	

Tamaño de la muestra 28 ratas

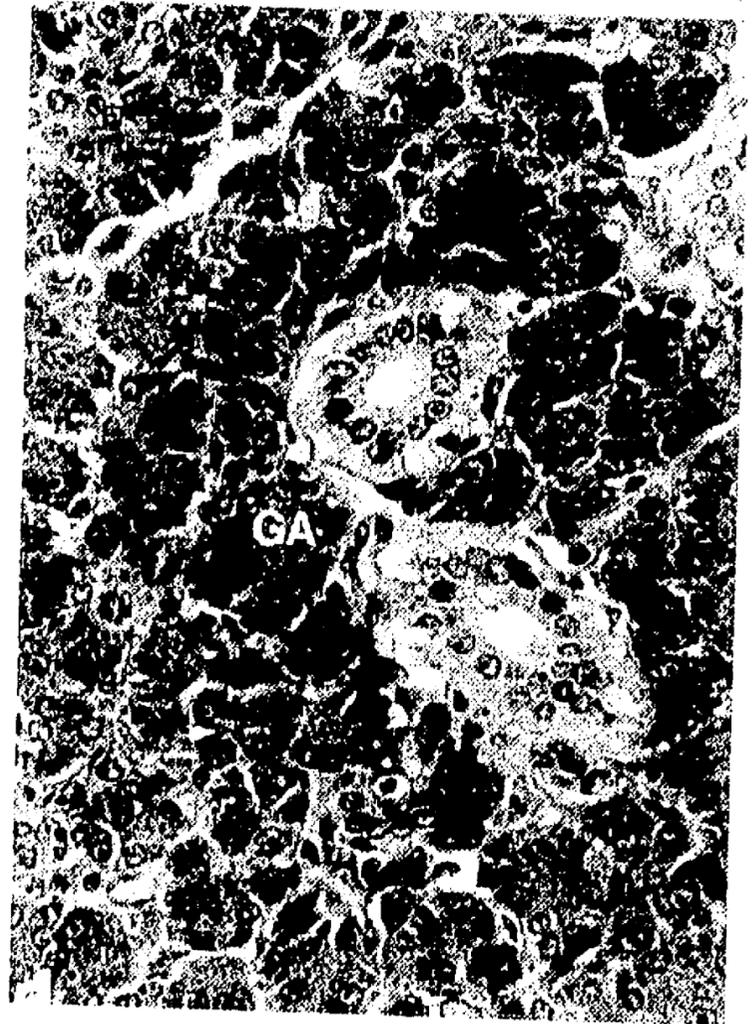
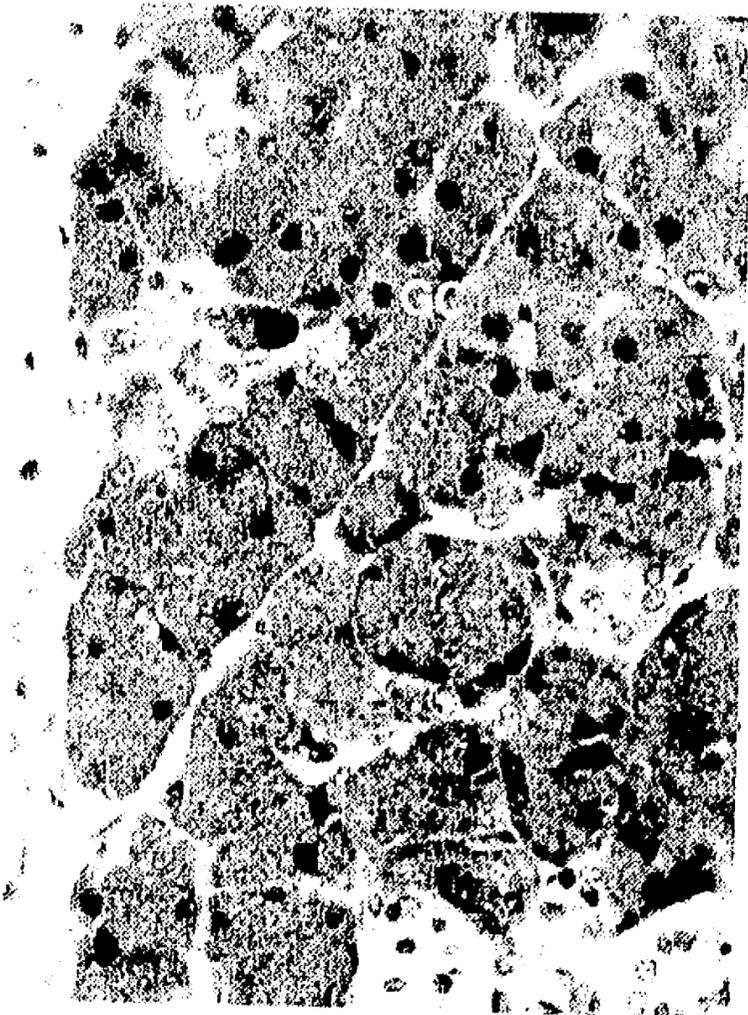
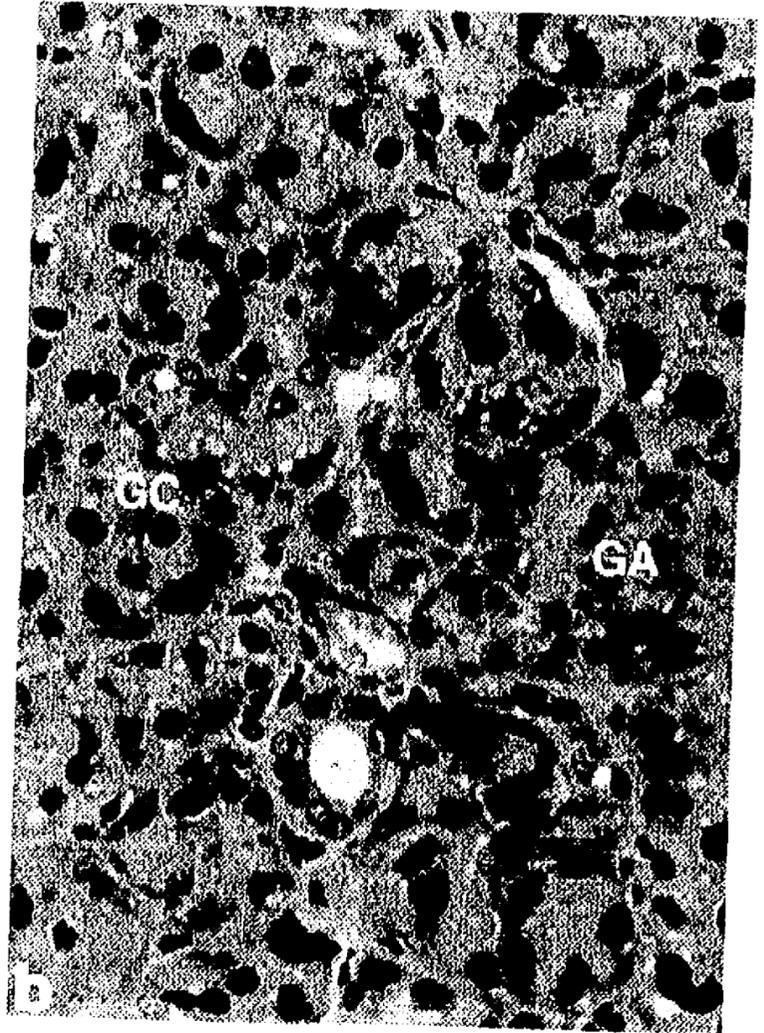
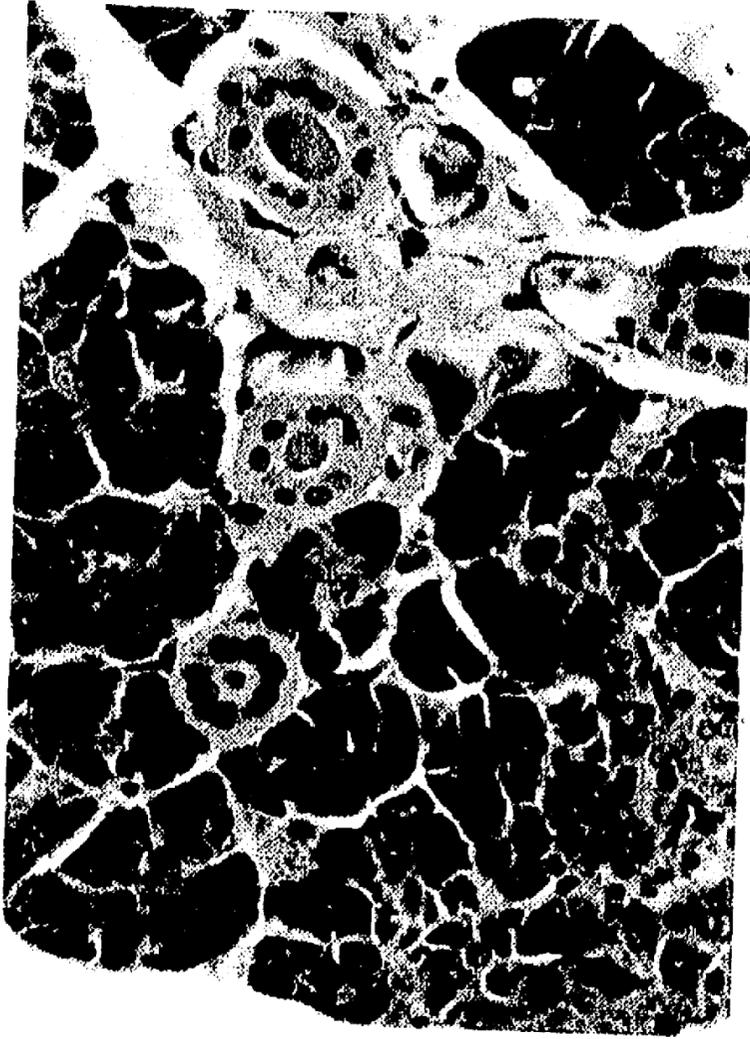


FIGURA 2. a) Grupo 1 Disposición de gránulos PAS+ en Parótida normal, b) Grupo 2 GA, gránulos apicales PAS+; GC, gránulos PAS-, c) Grupo 3 GC, gránulos PAS- cubriendo casi todo el citoplasma acinar; d) Grupo 4 GA, gránulos apicales PAS+; en el grupo 4 se observa la semejanza con la glándula normal del grupo 1. (Tinción dePAS 20x)

Las células acinares de la glándula normal de la rata (grupo 1) contienen gránulos finos PAS(+) en la porción apical del citoplasma, los cuales decrecen paulatinamente hacia la porción basal y el resto de las células presentan un citoplasma de color azul como se muestra en la **figura 3a**; las células de los conductos intercalares presentan hacia la porción luminal gránulos finos PAS(+), no presentándose estos gránulos en las células de los conductos estriados ni excretorios.

En los grupos 2 y 3 la disposición granular fue similar encontrándose en ambos grupos principalmente gránulos PAS(+) dispersos y en menor grado gránulos apicales PAS(+) pero en su mayoría los acinos presentaban un material de aspecto homogéneo y levemente positivo como se observa en la **figura 3b y 3c**; encontrándose lo contrario en el grupo 4 en la cual la disposición de los gránulos fue similar al grupo 1 (control), ya que los gránulos fueron PAS(+) y se encontraban hacia la porción apical del acino, únicamente los conductos intercalares presentaron gránulos PAS(+) en su porción luminal observándose con mayor frecuencia en los grupos 3 y 4 como se demuestra en la **figura 3d**. En la **Tabla 4** podemos observar los resultados de la disposición granular.

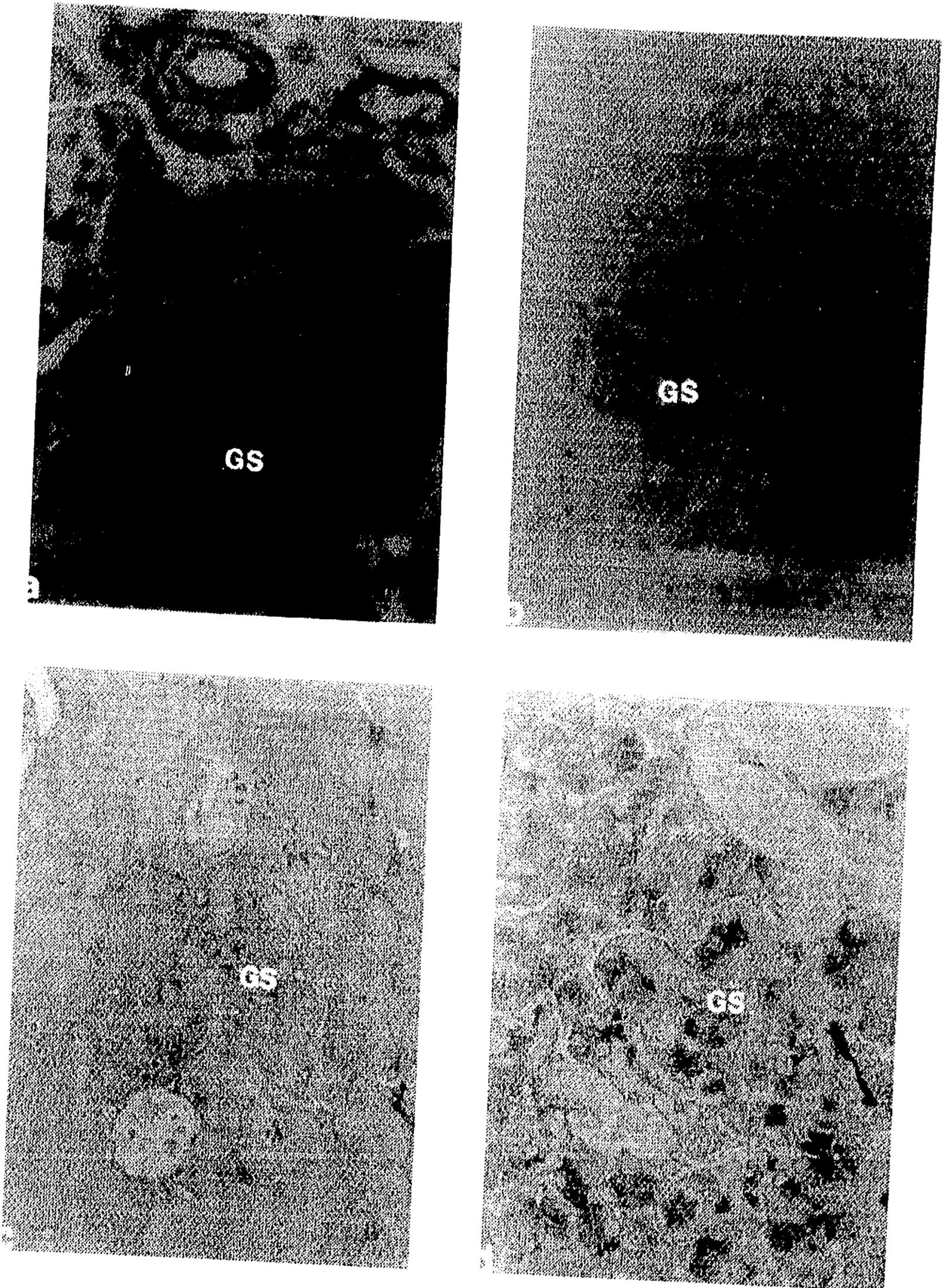


FIGURA 3. a) Grupo 1; GS, los gránulos secretorios están localizados en la porción apical de las células acinares y en los conductos intercalares, b) Grupo 2; GS, los gránulos secretorios de las células acinares están dispersos en todo el citoplasma. c) Grupo 3; GS, los gránulos secretorios presentan distribución semejante al grupo 2; d) Grupo 4 GS, la distribución apical de los gránulos secretorios semeja a la glándula parótida normal. (PAS-azul alciano pH2.5, 20x)

TABLA 4
PROMEDIO Y PORCENTAJE DE LOS HALLAZGOS HISTÓLOGICOS EN
LAS GLANDULAS PAROTIDAS (Tinción de PAS-azul alciano pH 2.5)

	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3		GRUPO 4	
	CONTROL		ALOXANA		ESPERMIDINA		ESPERMINA	
	x	%	x	%	x	%	x	%
Nº de animales	7		7		7		7	
ACINO								
Gránulos apicales PAS(+)	2.71	90.47	1.14	38.09	0.57	19.04	2.42	80.95
Gránulos PAS(+) dispersos	0.14	4.66	1.57	52.38	1.71	57.00	0.42	14.28
Citoplasma PAS-	-	-	0.28	9.52	0.71	23.80	0.71	23.80
CONDUCTOS								
Células PAS(-)	1.57	52.38	2.71	90.47	1.57	52.38	2.42	80.95
Gránulos PAS(+) en células intercalares	2.57	85.7°	0.85	28.57	1.57	52.38	1.28	42.85

Tamaño de la muestra 28 ratas

HALLAZGOS HISTOPATOLOGICOS EN EL PANCREAS.

El grupo 1 nos sirvió desde el punto de vista histopatológico para poder comparar las alteraciones morfológicas del páncreas normal como se muestra en la *figura 4a, 5a y 6a*.

En el grupo 2, encontramos que los islotes pancreáticos estaban hipertróficos en su gran mayoría pero en el grupo 4 se observaron semejantes a los observados en la glándula normal.

Los núcleos de las células de los islotes presentaban cambios morfológicos semejantes a los observados en la muerte celular, algunos eran grandes y otros presentaban picnosis e inclusive fragmentación nuclear, en condiciones normales los islotes con microscopía óptica están formados por células grandes que presumiblemente son células Beta y células pequeñas que son las células alfa, el predominio de estos 2 tipos de células fueron semejantes en los tres grupos pero perdían sus características morfológicas en los grupos 2 y 3, la vacuolización fue más evidente en el grupo 3 inclusive que en el grupo 2. como se puede observar en las **Figuras 4b,c y d.**

Con respecto a los acinos sus células presentaban su núcleo con las características normales así como los gránulos citoplasmáticos, encontrando frecuentemente en los acinos la presencia de gran cantidad de vacuolas en localización cercana a los islotes principalmente en el grupo 2 (**Figura 4b**); no se reporta daño a nivel de los conductos ya que en ninguno de los grupos experimentales se encontró; los promedios y porcentajes se muestran en la **Tabla 5.**

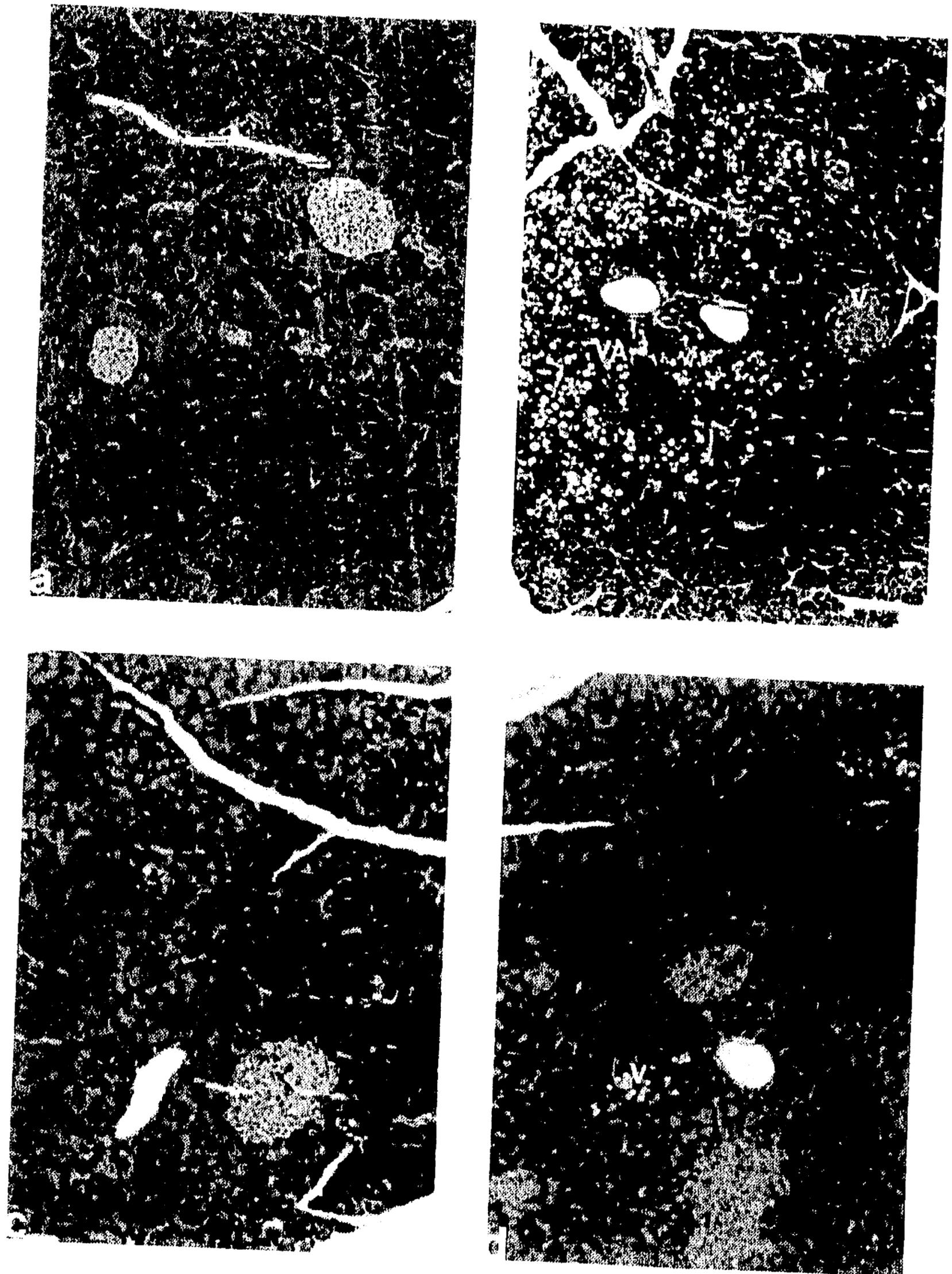


FIGURA 4. a) Grupo 1 IP, islotes pancreáticos. A, acinos de páncreas normal; b) Grupo 2 (aloxana) I. islote con V, vacuolización; NP, núcleos picnóticos; NG, núcleos gigantes y VA, vacuolización acinar severa; c) Grupo 3 (espermidina) V, vacuolización severa en los islotes; NG numerosos núcleos gigantes; CP, escasos núcleos picnóticos y VA vacuolización acinar; d) Grupo 4 (espermina) NP, escasos núcleos picnóticos y gigantes NG, V, disminución en la cantidad de vacuolas. (H&E 10x)

TABLA 5
PROMEDIO Y PORCENTAJE DEL ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL PANCREAS
(Tinción Hematoxilina y eosina)

	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3		GRUPO 4	
	CONTROL		ALOXANA		ESPERMIDINA		ESPERMINA	
	x	%	x	%	x	%	x	%
Nº de animales	7		7		7		7	
ISLOTE								
Hipertrofia	0.14	4.66	2.14	71.42	1.85	61.90	0.28	9.5
Atrofia	-	-	1.14	38.09	-	-	-	-
Picnosis	-	-	1.85	61.90	0.71	23.80	0.57	19.0
Núcleos gigantes	-	-	1.57	52.38	2.57	85.70	0.85	28.5
Citoplasma granular	1.14	38.09	2.42	80.95	1.42	47.61	1.57	52.3
Vacuolización	0.14	4.66	1.28	42.85	2.14	71.42	0.71	23.8
Células pequeñas	1.14	38.09	1.85	61.90	1.57	52.38	1.28	42.8
Células grandes	1.85	61.9	2.71	90.47	1.57	52.38	2.28	76.1
Vascularidad	2.28	76.19	1.28	42.85	1.42	47.61	2.42	80.9
ACINOS								
Anillo basal basófilo	2.71	90.47	1.85	61.90	2.14	71.42	2.57	85.7
Gránulos apicales eosinófilos	2.42	80.95	1.57	52.38	1.28	42.85	1.28	42.8
Núcleos redondos	3.00	100	3.00	100	3.00	100	3.00	10
Vacuolización	-	-	2.42	80.95	1.57	52.38	1.14	38.0

Tamaño de la muestra 28 ratas

Una de las características del citoplasma de las células de los islotes y de los acinos es la presencia de gránulos de secreción; con la Técnica de PAS encontramos que la disposición de los gránulos así como la positividad a la tinción fué leve tanto a nivel acinar como en las células de los islotes y el material PAS(+) disperso fué escasamente observado como se muestra en la *Figura 5a,b,c y d*; cuando se observó fué principalmente en las células de los conductos, los resultados de usar esta técnica se muestran en la *Tabla 6*.

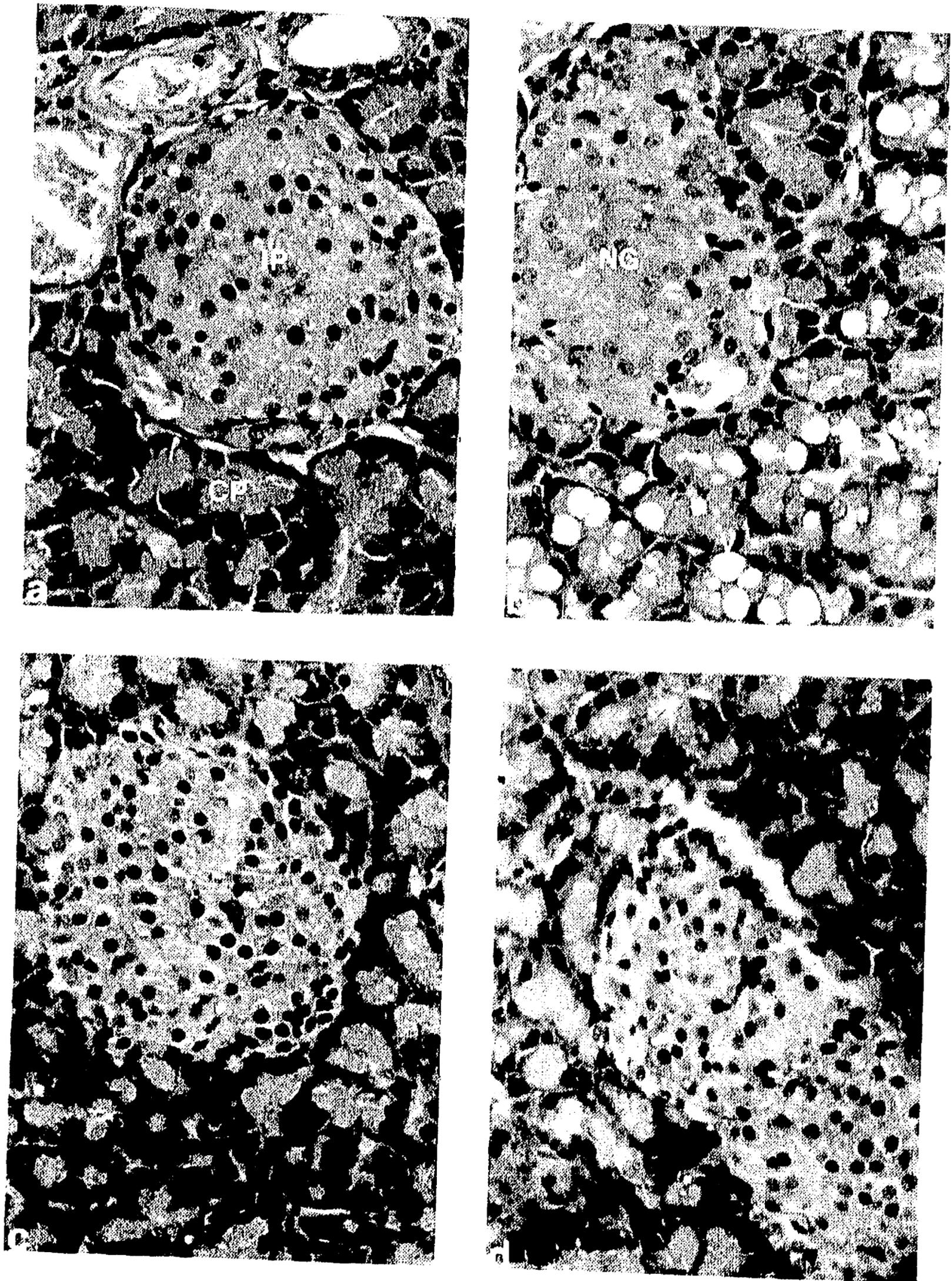


FIGURA 5. a) Grupo 1 Páncreas normal que muestra escasa positividad a la tinción de PAS; b) Grupo 2; CP, citoplasma PAS-; GPA, gránulos PAS+ apicales en acinos, escasos gránulos PAS+ en los islotes GI; c) Grupo 3 muestra semejanza con respecto al grupo 2; d) Grupo 4; no mostró cambios con respecto al grupo 2 y 3. (PAS 20x)

TABLA 6
PROMEDIO Y PORCENTAJE DE LOS HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN PANCREAS
(Tinción de PAS)

	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3		GRUPO 4	
	CONTROL		ALOXANA		ESPERMIDINA		ESPERMINA	
	P	%	P	%	P	%	P	%
ACINOS								
Gránulos PAS(+) apicales	1.28	42.85	0.71	23.80	0.57	23.80	0.85	28.57
Citoplasma PAS(-)	0.85	28.57	2.14	71.42	2.28	76.19	2.14	71.42
Material PAS(+)	0.42	14.28	0.85	28.57	1.28	42.85	1.28	42.85
ISLOTES								
Gránulos PAS(+)	2.28	72.19	1.28	42.85	1.42	47.61	0.71	23.80
Gránulos PAS(-)	0.71	23.80	1.71	57.14	1.42	47.61	2.28	76.19
CONDUCTOS								
Material PAS+	0.28	9.52	1.85	61.90	1.28	42.85	0.42	14.28
Material PAS-	2.42	80.95	1.28	42.85	1.14	38.09	2.00	66.66

Tamaño de la muestra 28 ratas

Los gránulos fueron evidentes al realizar la técnica de Pas-azul alciano como se muestra en la **Figura 6a,b,c y d**, encontrando en el grupo 2 y 3 una disposición de material PAS(+) en forma homogénea no granular en el total del citoplasma y en el grupo 4 encontramos una disposición PAS(+) granular semejante a la observada en los acinos del páncreas normal, los núcleos de ambas células fueron PAS(-), los conductos presentaron material PAS(+) y (-) en forma variable, la disposición granular de las células de los tejidos del grupo 4 fué semejante a la disposición granular de las células del páncreas normal, los resultados se muestran en la **Tabla 7**.

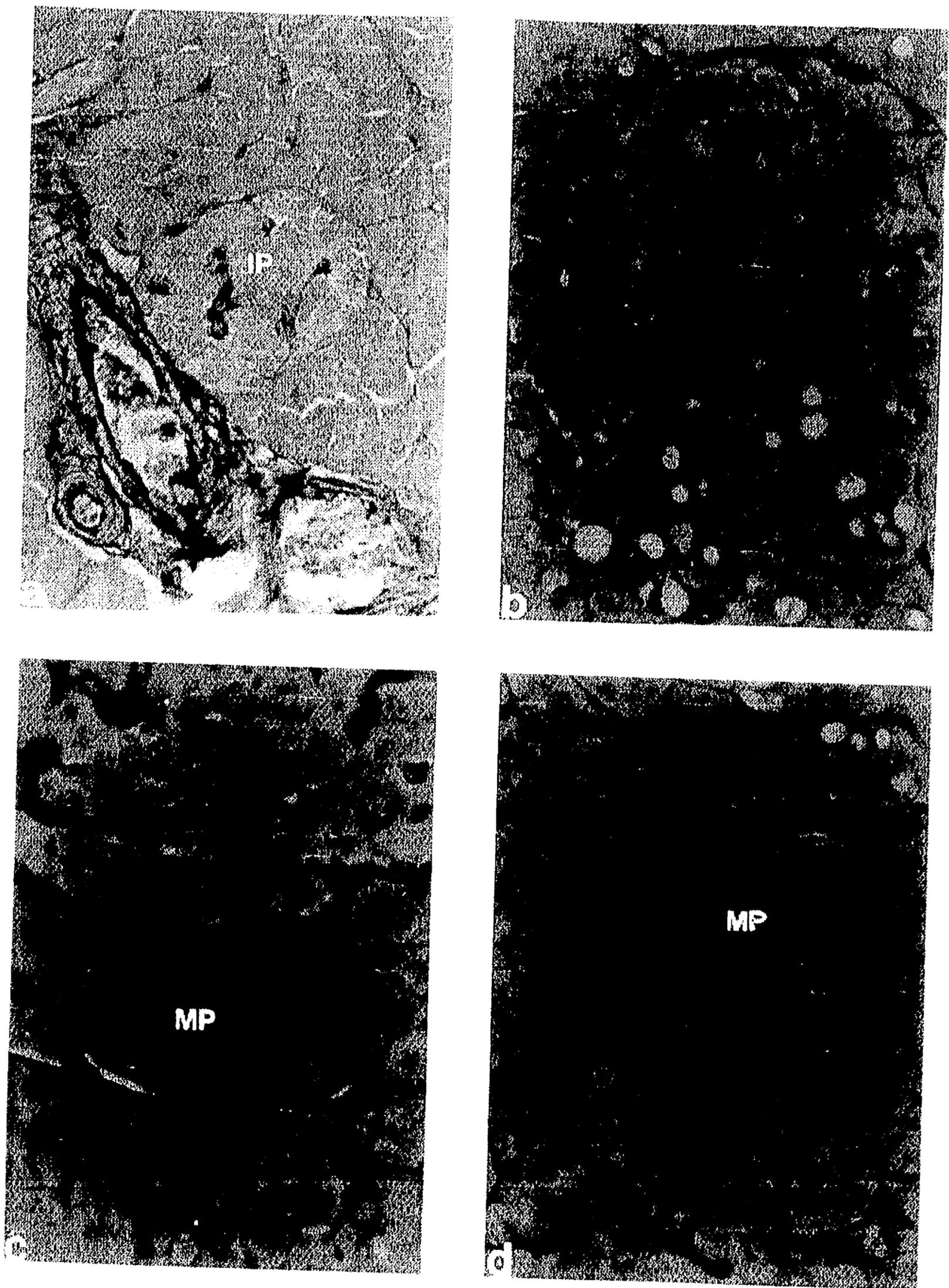


FIGURA 6. a) Grupo 1: gránulos secretorios acinares abarcando la totalidad del citoplasma GS; IP, islotes pancreáticos con escaso material PAS+; b), c), y d) no muestran diferencias con respecto a la disposición granular en los acinos e islotes. (PAS-azul alciano pH 2.5 20x)

TABLA 7
PROMEDIO Y PORCENTAJE DE LOS HALLAZGOS HISTOLÓGICOS EN PANCREAS
(Tinción de PAS- azul alciano pH 2.5)

	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3		GRUPO 4	
	CONTROL		ALOXANA		ESPERMIDINA		ESPERMINA	
	x	%	x	%	x	%	x	%
Nº de animales	7		7		7		7	
ACINOS								
Gránulos apicales PAS(+)	1.71	57.14	0.28	9.52	0.85	28.57	1.28	42.85
Citoplasma PAS(+)	-	-	2.71	90.47	2.28	76.19	1.71	57.14
Núcleos PAS(-)	2.28	76.19	2.00	66.66	2.57	85.71	1.71	57.14
ISLOTES								
Gránulos PAS(+)	2.57	85.71	1.28	42.85	1.28	42.85	1.14	38.09
Citoplasma PAS(-)	1.28	42.85	1.85	61.90	1.71	57.14	2.57	85.71
CONDUCTOS								
Citoplasma PAS(+)	1.14	38.09	1.28	42.85	1.00	33.33	1.28	42.85
Citoplasma PAS(-)	1.71	57.14	1.71	57.14	1.71	57.14	1.42	47.61

Tamaño de la muestra 28 ratas

DISCUSION

Desde el punto de vista bioquímico, los resultados obtenidos en este estudio indican que la administración de aloxana en animales de experimentación incrementan los valores de glucosa en la sangre como se presentan en la Tabla 1 y que a su vez estos son indicadores de la presencia de daño pancreático aún cuando no se haya estudiado la citoarquitectura de la glándula.

La administración de espermidina y espermina no afectan significativamente los niveles de la glucosa, ya que como se aprecia en la Tabla 1 estos permanecen altos con respecto al grupo control y al grupo diabético, lo cual puede ser explicado por el efecto residual de la aloxana, sin embargo el efecto a nivel de los triacilgliceridos es marcado, ya que los niveles de estos disminuyen considerablemente siendo similares a los valores normales (grupo control) disminuyendo de 70.83 ± 21.46 mg/dl a 53.24 ± 23.57 y 44.41 ± 3.72 mg/dl con espermidina y espermina respectivamente. Estos resultados concuerdan con otras observaciones en las que se atribuye a las poliaminas un papel similar al de la insulina en la inhibición de la lipólisis.

En general se ha aceptado que el efecto de la aloxana es selectivo para las células Beta del páncreas, sin embargo en este estudio encontramos que puede existir un desequilibrio en las células alfa pancreáticas puesto que la actividad de alfa amilasa se afectó en el grupo de ratas tratadas con aloxana (Tabla 1). La disminución de la actividad alfa amilasa de 931.97 ± 97.46 a 861.71 ± 68.94 U/l indica desequilibrio exocrino, el efecto de la aloxana sobre el nivel de alfa amilasa se reversión en el grupo tratado con espermidina (1373.95 ± 306.12 U/l) , más no en el tratado con espermina en el cuál se vio

disminuído con respecto al grupo control (558.64 +- 107.26 U/l), lo cuál puede ser explicado por el hecho de que la espermidina es precursora de la espermina no presentando la misma acción químico-biológica.

Con relación a la concentración de proteínas del suero observamos un ligero aumento en las ratas diabéticas, lo cuál puede explicarse por la ruptura y muerte celular como daño a la aloxana, los cambios en los niveles de las proteínas del suero no son detectados cuantitativamente por métodos colorimétricos como se observa en la Tabla 1 sin embargo histológicamente se observa una recuperación notable en el patrón celular (Figuras 1c,1d,4c y 4d).

La actividad de arginasa en el suero disminuyó considerablemente en las condiciones de estudio la actividad de esta enzima implicada en la síntesis de poliaminas no fue recuperada con la administración de poliaminas; sin embargo Hougaard y cols (33) han demostrado que las poliaminas se localizan en el páncreas, considerándolas que se producen en los islotes así como relacionando su función con la síntesis de insulina.

En los tejidos sensibles a la insulina tienen lugar ajustes metabólicos como consecuencia del reducido abastecimiento de azúcar, en este caso las proteínas se degradan más rápidamente de lo que pueden sintetizarse, la deficiencia o insuficiencia de insulina en ratas inmaduras trae como consecuencia un retardo significativo en el crecimiento de la glándula submandibular entre otras así como alteraciones histológicas de las glándulas salivales en ratas maduras; nosotros en base a nuestros

resultados podemos mencionar más no asegurar que la glándula parótida de la rata es un tejido sensible a la insulina y que en el caso de la diabetes experimental presenta cambios morfológicos muy semejantes a los observados en el tejido pancreático, por otra parte, Liu y cols (6) describen que el resultado de la insuficiencia de insulina es atrofia de las glándulas salivales y decremento en el peso del cuerpo. Nosotros consideramos que a diferencia de lo reportado por ellos que previo a un proceso atrófico existe uno hipertrófico compensatorio debido a un intento del tejido u órgano de cumplir su función.

Smith y cols.(7) reportan que el daño pancreático ocasionado por la administración de estreptozotocina consiste en una reducción en el tamaño del islote, reducción en el número de las células y signos de necrosis, ellos mismos describen la existencia de una proteína semejante a la insulina por inmunoreactividad en la glándula parótida localizada principalmente alrededor de los conductos intercalares y ocasionalmente en las células acinares pero no en las células de los conductos estriados ni excretoras, si nosotros consideramos que el daño ocasionado por la aloxana a la glándula parótida en la inducción a la diabetes experimental es por efecto tóxico directo y no como cambio secundario a la diabetes, podría deberse a la semejanza que existe entre ambas glándulas y a la presencia de proteínas como insulina en la glándula parótida y glucagón en la submaxilar como ha sido reportado, inclusive, Benítez-Bibriesca y cols. (17) mencionan que las glándulas salivales pueden tener una función doble, una exocrina bien establecida y una endocrina hasta el momento desconocida sin tener un aparato endocrino bien definido como el páncreas.

La administración de aloxana en nuestros animales en estudio provocó daño a nivel pancreático y de la glándula parótida, contrario a lo reportado en la literatura (22-25) con respecto a la toxicidad selectiva de la aloxana sobre las células Beta de los islotes pancreáticos nosotros encontramos en el páncreas daño a nivel de los islotes que consistió en hipertrofia de los islotes, células con aspecto pleomórfico que presentaban picnosis, fragmentación de los núcleos, núcleos gigantes, disposición irregular de las células y vacuolas de diferentes tamaños, en los acinos exocrinos encontramos la presencia de grandes vacuolas en disposición cercana a los islotes, dato que no encontramos reportado en la literatura.

El daño ocasionado por la aloxana a la glándula parótida fue más severo que el observado en el páncreas en nuestros animales encontrándose principalmente a nivel del núcleo de las células acinares, estos cambios consistieron en núcleos desplazados, de tamaño variable y picnóticos, el citoplasma granular de las células acinares también mostraba cambios con respecto al tamaño y a las características tintoriales, la presencia de vacuolas, dato que ha sido comunmente reportado (9,17,19-21) como uno de los cambios en las glándulas salivales en la diabetes experimental también fue un hallazgo frecuente en nuestro estudio.

La presencia de vacuolas en los conductos intercalares y estriados fue un hallazgo frecuente en nuestro estudio, provocando la pérdida de las estriaciones características de los conductos estriados dando el aspecto de células cúbicas, dato que consideramos de importancia debido a que las estriaciones basales de los conductos estriados se

deben a la cantidad de mitocondrias que presentan estas células epiteliales implicadas en el transporte de electrólitos.

La insuficiencia de insulina puede tener alteraciones paralelas en los niveles de enzimas secretorias en las glándulas parótidas, los acinos serosos contienen gránulos secretorios PAS+ en su citoplasma, la cantidad de los gránulos se relaciona con la fase del ciclo secretorio, estos están concentrados durante la fase de maduración granular antes de la síntesis de enzimas y después de la descarga de la secreción (7,8). Al analizar la disposición de los gránulos de secreción con las técnicas de PAS y PAS-azul alciano encontramos en el páncreas y en la parótida de las ratas diabéticas escasos gránulos PAS+ apicales predominando el citoplasma PAS- inclusive en las células de los islotes, cabe mencionar que el páncreas normal muestra escasa positividad a la tinción de PAS pero no la glándula parótida la cual es positiva en mayor grado a la tinción PAS-azul alciano que a la de PAS.

Tomando en cuenta las consideraciones hechas por Smith y cols (7) con respecto a que en la glándula parótida existen células con inmunoreactividad a la insulina y que su localización es alrededor de los conductos intercalares y ocasionalmente en las células acinares y a las hechas por Benítez Bibriesca y cols (17) de la existencia de unas células microgranulares con la misma localización, así como los comentarios de Bogart (16) de la existencia de ciertas células que presentan pequeños gránulos secretorios asociadas a los acinos y a los conductos intercalares en ratas mayores de 4 meses, aunado a la existencia de las células mioepiteliales las cuales presentan la misma localización y en base a un reporte previo de nosotros (15) en el cual pudimos demostrar la presencia e incremento de células mioepiteliales por medio de inmunoreactividad a

vimentina en glándula parótida de ratas tratadas con aloxana, consideramos que futuras investigaciones deberán enfocarse hacia la determinación de que tipos celulares se tratan las células descritas por diferentes autores y con diferentes técnicas.

Por otra parte si tomamos como base los antecedentes con respecto a la localización de poliaminas en células productoras de insulina y la biosíntesis de ellas in vitro estimuladas por la glucosa, la cuál a su vez es el mayor estimulante para la liberación de insulina y la replicación celular así como los estudios (31,34) que sugieren que las poliaminas han sido demostradas en las glándulas salivales de ratas por medio de estimulación simpática y parasimpática, podríamos considerar que las poliaminas pudieran ejercer un efecto inhibitorio sobre las glándulas pancreáticas y parótidas de los animales tratados con aloxana provocando un efecto similar al de insulina.

Nuestros resultados de administrar tratamiento con espermidina y espermina a las ratas diabéticas demuestra que la espermina ejerce un mejor efecto sobre ambas glándulas que la espermidina. Si comparamos la presencia de vacuolas en la glándula parótida entre el grupo 2 y 3 encontramos que en el grupo 3 el promedio es mucho menor que en el grupo 2, el cual es muy semejante al promedio de las ratas con tratamiento de aloxana únicamente, el aspecto morfológico de los núcleos en las ratas tratadas con espermina es muy similar al de las células acinares normales.

El aspecto citoplasmático de las células acinares tratadas con espermidina formado por gránulos basófilos gruesos, fue contrario al de las células del grupo tratado con espermina que fueron eosinófilos finos,

así mismo el aspecto de estas últimas fue muy semejante al de las células normales que se acentuó por la presencia áreas periféricas de gránulos basófilos finos.

A nivel de los conductos principalmente de los conductos estriados de las parótidas pudimos observar que la pérdida de las estriaciones era menor en el grupo 3 al compararlas con el grupo 1 y 2.

En el páncreas encontramos un fenómeno semejante, en el grupo 3 tratado con espermina pudimos observar los islotes de tamaño normal y pocos cambios nucleares de las células de los islotes, sin embargo el grupo tratado con espermidina presentó promedios de daño semejantes a los promedios de daño pancreático de las ratas diabéticas, la presencia de vacuolas en los acinos pancreáticos también se encontraban disminuidas en el grupo tratado con espermina.

Fue nuestro interés analizar el efecto de los diferentes tratamientos a nivel de los gránulos de secreción de ambas glándulas, sin embargo consideramos que las técnicas seleccionadas para ello fueron adecuadas en el caso de la glándula parótida pero no específicas para los gránulos de secreción del páncreas

En la glándula parótida tratada con espermidina los gránulos de las células acinares fueron PAS- con algunos gránulos PAS+ escasos , los conductos intercalares y estriados presentaban material PAS+, en el grupo 3 los gránulos apicales fueron PAS+ y ocupaban casi la totalidad del citoplasma de las células acinares de toda la glándula con áreas PAS- periféricas, conservando su distribución muy similar a la de la célula acinar normal.

En el caso del páncreas encontramos que el citoplasma en los 3 grupos fue PAS- encontrando escaso material PAS+ disperso, resultados similares obtuvimos con la técnica PAS- azul alciano, aunque con esta tinción si se pudo observar una disposición granular PAS+ ocasionalmente considerando que es necesario reconsiderar las técnicas especiales de tinción para futuros estudios en páncreas,

Al analizar los resultados de la administración de los diferentes tratamientos sobre la glándula parótida y el páncreas encontramos una gran semejanza con respecto a los efectos de la espermidina y espermina sobre la citoarquitectura de ambas glándulas pudiendo aseverar que la espermina ejerce un efecto inhibitorio sobre la degeneración celular que provoca la aloxana y que la espermidina no ejerce algún efecto citoprotector al daño ocasionado por la aloxana, al mismo tiempo consideramos que la aloxana provoca un mayor daño a nivel de la glándula parótida que en el páncreas.

Como se mencionó anteriormente, la literatura demuestra que la aloxana es selectiva para la destrucción de las células Beta del páncreas, sin embargo en este estudio si tomamos en cuenta que la disminución en la actividad de alfa amilasa indica un posible desequilibrio en la función exocrina y encontramos vacuolización a nivel de los acinos exocrinos del páncreas es posible sugerir pero no asegurar que la aloxana no es altamente específica para las células Beta, esto aunado al severo daño que se presentó en la glándula parótida.

Al comparar el efecto de ambas poliaminas desde el punto de vista histopatológico con los resultados de las determinaciones bioquímicas encontramos que bioquímicamente las 2 poliaminas utilizadas logran efectos diferentes particularmente en los niveles de triacilglicéridos y alfa amilasa.

CONCLUSIONES

1. La administración de aloxana induce daño pancreático el cuál fue determinado bioquímica e histológicamente.
2. La administración de espermidina y espermina después del daño pancreático provocado por aloxana indujo cambios bioquímicos a nivel de triacilgliceridos y alfa amilasa, indicativos de una posible recuperación pancreática.
3. En base a nuestros resultados, la aloxana no es específica para provocar daño pancreático únicamente en la células Beta de los islotes, tambien provoca daño a nivel de páncreas exocrino
4. La administración de aloxana provoca daño a nivel de la glándula parótida, no como efecto secundario a la diabetes sino como efecto tóxico directo.
5. La espermina ejerce un mayor efecto inhibitorio sobre el daño ocasionado por la aloxana en la citomorfología de las células pancreáticas y parótida que la espermidina, sin embargo a nivel bioquímico la espermidina muestra mejor efecto sobre los niveles de triacilgliceridos de los otros parámetros determinados.,

BIBLIOGRAFIA

- 1) Williams LP, Warwick R. Anatomía Gray Tomo II. Curchill Livistonge 1992. 1501-1506
- 2) Netter H Frank. Sistema endocrino y enfermedades metabólicas. Tomo IV, Colección CIBA de ilustraciones médicas . Masson Salvat- Medicina.1993 pp: 143-145,159,160,163.
- 3) Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. Histología. Texto y Atlas. Editorial Médica Panamericana 1992:461-470,480-481.
- 4) Kissane JM Pathology Anderson. Volumen II The CV Mosby Company. Novena edición, 1990: 1347-1369
- 5) Martin JM, Erlich RM, Holland FJ. Etiology and pathogenesis of insulin-dependent Diabetes Mellitus. Raven Press, New York. 1981:21-26.
- 6) Liu Frank TY and Lin Hsien S. Role of insulin in body growth and the growth of salivary and endocrine glands in rats. J Dent Res. 1969;48,4: 559-67
- 7) Smith HP, Gatel DG. Immunochemical studies of the insulin-like material in the parotid gland of rats. Diabetes 1984. Jul;33:661-66
- 8) Cotran, Kumar, Robbins. Patología Estructural y funcional. Interamericana-McGraw-Hill, 4ª Edición, Vol II, 1990: 1033-1062.
- 9) Anderson LC, Johnson DA. Effects of alloxan diabetes on rat parotid gland and saliva. J Biochem Physiol 1981, vol 70 B:725-30
- 10) TenCate AR. Histología Oral Desarrollo estructura y función. Editorial médica Panamericana 1986, segunda edición. pp 390-94

- 11) Seifert G, Miehke A, Haubrich J, Chill R. Diseases of the salivary glands. Pathology-Diagnosis-treatment- Facial nerve surgery, 1986 Georg Thieme Verlag Thieme Inc. Stuttgart. New York 1986. pp27-32
- 12) Mason DK, Chisholm DMDM: Salivary glands in health and disease. WB Saunders Company Ltd ,1975; pp 12-33
- 13) Palmer RM. The identification of myoepithelial cells in human salivary glands. A review and comparasion of light microscopical methods. J Oral Pathol, 1986;15: 221-229
- 14) Cutler LS, Chaudry AP. Differentiation of the mioepithelial cells of the rat submandibular gland in vivo in vitro: An ulatraestructural study. J Morph. 1973,140:343-54
- 15) Donohué CA, Leyva HE, Ledesma MC, Méndez JD. Presencia y predominio de células mioepiteliales en ratas tratadas con poliaminas. XIII Congreso Nacional de Anatomía, Villa Hermosa Tabasco, 18-22 Noviembre 1990.
- 16) Bogart BL. The effect of aging on the rat submandibular gland: An ultraestructural, cytochemical and biochemical study. J Morph, 1970; 130:337-52.
- 17) Benítez Bibriesca, Mourell M, Camacho EC, López UG, Salas RR, Guevara R, Freyre HR, Función de las glándulas submaxilares y de las células microgranulosas en la diabetes experimental por estreptozotocina en la rata. Arch. Invest. Med. (Mex) 1983;14:379-89.
- 18) Mandel I. Saliva in health and disease. CRC Critical Reviews in cilinical Sciences. 1981;91; 504-10.
- 19) Russotto B Samuel A. Asymptomatic Parotid Gland enlargement in Diabetes Mellitus. Oral Surg. Oral Med. Oral Path. 1981;52;595-98.
- 20) Davidson D , Leibel BS, Berris A. Asymptomatic Parotid Gland enlargement in Diabetes Mellitus. Ann Int Med 1969: 70;31

- 21) Berckley S E, Bray DD, Kaplan JH. The overall management of salivary gland disorders, Laryngoscope 1981.
- 22) Ramos RHG, Méndez JD. Diabetes Mellitus experimental. Ciencia Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de México. 1994:6;
- 23) Rifkin H, Porte D. Diabetes Mellitus. Theory and Practice. 1990, Editorial Elsevier, Fourth edition, 88-103
- 24) Méndez JD, Ramos GH. Animal models in Diabetes Research. Archives of Medical Research.1994:25,4;367-75.
- 25) Islas S, Lieshitz A. Diabetes Mellitus. 1993, Editorial Interamericana-Mc Graw Hill. 1ª Edición, 303-329
- 26) Anderson LC, Garret JR. Lipid accumulation in the major salivary glands of streptozotocin-diabetes rats. Arch. Oral Biol.1986:31,7;469-75
- 27) High AS, Sutton J, Hopper AH. A morphometric study of submandibular salivary gland changes in streptozotocin-induced diabetic rats. Arch Oral Biol. 1985: 30,9:667-71.
- 28) Anderson LC. Effects of alloxan Diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. The American physiological Society, 1983; G431-G437.
- 29) Leyva HE, Ledesma MC, Donohué CA, Méndez JD. Histomorfología de Parótida en ratas con diabetes inducida con aloxana. XIII Congreso Nacional de Anatomía, Villa Hermosa ,Tabasco. 18-22 Noviembre de 1990
- 30) Hicks JJ, Díaz ZJ. Bioquímica e Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. 1988

31) Ekstrom J, Mansson B, Nilsson O, Rosengren E, Tobin G. Increased polyamine formation in rat salivary glands by stimulation of their autonomic nerve supply. Arch Oral Biol. 1985,30;773-75.

32) Pérez R, Méndez JD. Presencia y función de poliaminas en fluidos bucodentales. Práctica Odontológica. 1990,238:43-47.

33) Hougaard MD, Nielsen JH, Larsson D. Localization and biosynthesis of polyamines in insulin-producing cells. Biochem J. 1986,238:43-47.

34) Blume GB, Koenig H, Goldstone AD. Association of increased polyamine levels with isoproterenol-stimulated mucin secretion in the rat submandibular gland. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1985,32(1):118-25

35) Méndez JD, Arreola MA. Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. Biochemistry International. 1992,28(4):569-75.

36) Ledesma MC, Leyva HE, Ramos H y Méndez JD. Degeneración granular en ratas diabéticas y tratadas con poliaminas. Estudio comparativo. XIII Congreso Nacional de Anatomía, Villa Hermosa, Tabasco. 18-22 de noviembre de 1990

37) Franco MF, Leyva HE, Ledesma MC, Donohué CA, Ramos H, Méndez JD. Distribución de material PAS (+) en parótidas de ratas diabéticas con tratamiento. XIII Congreso Nacional de Anatomía, Villa Hermosa, Tabasco. 18-22 de noviembre de 1990.

APENDICE.

TECNICA PARA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA EN SUERO.

Test-Combinación. Glucosa GOD-POD. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania Occidental.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA.

El peróxido de hidrógeno que se produce por la oxidación enzimática de la glucosa reacciona en presencia de peroxidasa (POD) con 4 aminofenazona y el fenol por copulación oxidante se forma 4 (-p- benzoquinona-monoimino)-fenazona + agua.

La cantidad de cromógeno formado es proporcional a la concentración de glucosa.

CONTENIDO DEL REACTIVO

Cuando el reactivo es reconstituido de acuerdo con las instrucciones, las concentraciones aproximadas de los ingredientes son:

Amortiguador de fosfato	100mmol/l, pH 7.0
Oxígeno 1-oxidoreductasa (GOD)	8U/ml
Peróxido reductasa (PAP)	1.1 U/ml
4-aminofenazona	0.77mmol/l
Fenol	11mmol/l

PREPARACION DEL REACTIVO

Disolver el contenido del frasco que contiene el amortiguador con enzimas con 500 ml o 1000 ml de agua destilada según sea el caso, añadir 10 ó 20 ml del frasco que contiene fenol, girar suavemente. No agitar.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

El reactivo no reconstituido, debe ser almacenado entre +2 a 8°C y puede ser usado hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta.

El reactivo reconstituido se mantiene estable por 4 semanas a +4°C y 5 días entre 15-15°C en frasco color ámbar.

RECOLECCION Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La glucosa se reporta como estable por 24 horas a 25°C; o por 7 días a 4°C si se añade un inhibidor de la glicólisis (NaF, KF). Este reactivo es útil en la determinación de glucosa en suero o plasma de pacientes en ayunas, para lo que se recomienda separar los componentes celulares inmediatamente.

MATERIAL REQUERIDO

Equipo de reactivo para glucosa
Estándar de glucosa de 1mg/ml en solución salina 0.9%
Pipetas de precisión
Tubos de ensayo
Celdillas para colorímetro
Agua destilada o deionizada

PROCEDIMIENTO

Longitud de onda: 530 nm.
Temperatura de incubación: 37°C
Temperatura de medición: 25°C
Tiempo de reacción: 10 min.

- Llevar el colorímetro a cero con agua destilada
- Colocar en los tubos de reacción 20 mcl de problema, estándar y agua destilada
- Agregar 2 mcl del reactivo a los tubos, mezclar e incubar por 10 min. a 37°C en la oscuridad

	BLANCO	ESTÁNDAR	PROBLEMA
Agua	0.01 ml	-	-
Estándar	-	0.01 ml	-
Problema	-	-	0.01 ml
Reactivo	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

- Medir el color final en un lapso no mayor de 10 min. posterior a la incubación, frente al blanco del reactivo

CALCULOS

La concentración de glucosa se calcula de la siguiente manera:
(Glucosa)=100 * Absorbancia problema - blanco (mg/dl)
Absorbancia estándar - blanco

PRECAUCIONES.

El reactivo no reconstituído de enzimas, contiene azida de sodio como conservador, se debe evitar por lo tanto el contacto con la piel y mucosas, la ingestión de grandes dosis puede provocar vasodilatación.

El reactivo que contiene fenol, es venenoso si está en contacto con la piel o es ingerido. Causa cauterización, en caso de contacto con la piel lavar con polietilenglicol.

DETERMINACIÓN DE TRIACILGLICERIDOS EN SUERO

Reactivo triacilgliceridos Color. (Gilford Systems, 132 Artino Street, Oberlin, Ohio, U.S.A.)

FUNDAMENTO

El glicerol producido por la hidrólisis enzimática de triacilgliceridos es fosforilado por adenosininitrofosfatasa (ATP) para producir 1-glicerofosfato y ADP en la reacción catalizada por gliceroquinasa (GK). La glicerofosfotodeshidrogenasa (G-1-PDH) cataliza la oxidación de 1-glicerofosfato en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) para producir NADH que es usado para reducir la anilina de cloruro de 2-tetrazolio (iodofenil-p)-3-(nitrofenil-p)-5-fenil (INT) a formazan en la reacción catalizada por diaforasa. El formazán absorbe la luz a 530nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración del glicerol y por lo tanto a la concentración de los triacilglicéridos.

CONTENIDO DEL REACTIVO

Cuando el reactivo es reconstituído de acuerdo con las instrucciones, las concentraciones aproximadas de los ingredientes del reactivo son.

ATP	1.0mmol/l
NAD	1.2mmol/l
INT	1.0mmol/l
GK (microbiana)	120U/l
G-1-PDH (musc. conejo)	3500U/l
Diaforasa	450U/l
Lipasa (microbiana)	1x10 ⁵ U/l
Amortiguador (pH 7.7)	

PREPARACION DEL REACTIVO

Reconstituir los frascos del reactivo para triacilgliceridos (Color) 6.5, 15.5 ó 50 con 6.5ml, 15.5ml ó 50 ml de agua destilada o deionizada respectivamente, dar vueltas ligeramente para disolver. No agitar.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

El reactivo no reconstituido debe ser almacenado entre 2-8°C y puede ser usado hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta

El reactivo reconstituido se mantiene estable por 8 horas a temperatura ambiente (18-25°C) o por 5 días refrigerado (2-8°C) cuando está protegido contra la luz.

RECOLECCION Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Puede usarse suero o plasma tomado de pacientes en ayunas, los anticoagulante como EDTA, oxalato o heparina no causan inhibición.

Una hemolisis moderada no afecta significativamente los resultados obtenidos con esta prueba, no debe usarse citrato de sodio.

Para la obtención de las muestras deben usarse tubos y tapas libres de glicerol.

Los triacilgliceridos se reportan como estables por 3 días a temperatura ambiente. Sin embargo se recomienda almacenamiento refrigerado o congelado de las muestras.