

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
Departamento de Anatomía Patológica



TESIS DOCTORAL

**Cambios en la ultraestructura de la glándula submaxilar de  
la rata debidas a la inervación**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Pedro Bullón Fernández**

Madrid, 2015

TP  
1983  
240

Pedro Bullón Fernández



\* 5 3 0 9 8 6 2 4 2 0 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Y-53-007165-0

CAMBIOS EN LA ULTRAESTRUCTURA DE LA GLANDULA SUBMAXILAR DE LA RATA  
DEBIDOS A LA INERVACION

Departamento de Anatomía Patológica  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid  
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

240/83

© Pedro Bullón Fernández

Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8

Madrid, 1983

Xerox 9200 XB 480

Depósito Legal: M-37585-1983

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
(Prof. Dr. Agustín Bullón Ramírez)

" CAMBIOS EN LA ULTRAESTRUCTURA DE LA GLANDULA SUB-  
MAXILAR DE LA RATA DEBIDOS A LA INERVACION"

Trabajo que, para optar al  
grado de Doctor en Medicina  
y Cirugía presenta:

PEDRO BULLON FERNANDEZ





DON AGUSTIN BULLON RAMIREZ CATEDRATICO DE ANATOMIA  
PATOLOGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVER  
SIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y DON JAIME MERCHAN CI  
FUENTES CATEDRATICO DE HISTOLOGIA DE LA FACULTAD -  
DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE.

CERTIFICAN, Que bajo su dirección y en la Cáte  
dra de Anatomía Patológica de la Universidad Com  
plutense de Madrid, ha sido realizado el trabajo:  
"CAMBIOS EN LA ULTRAESTRUCTURA DE LA GLANDULA SUB  
MAXILAR DE LA RATA DEBIDOS A LA INERVACION" por -  
Don Pedro Bullón Fernández para optar al grado de  
Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste expiden el presente cer  
tificado en Madrid, Julio de mil novecientos ochen  
ta y dos.

*[Handwritten signatures]*



## INDICE

	<u>PÁGS.</u>
PREAMBULO .....	1
I. INTRODUCCION .....	3
A. ANATOMIA DE LAS GLANDULAS SALIVALES DE LA RATA .....	5
B. HISTOLOGIA DE LAS GLANDULAS SALIVALES DE LA RATA .....	10
C. ULTRAESTRUCTURA DE LA GLANDULA SUBMAXILAR DE LA RATA .....	18
D. PROCESO DE SECRECION SALIVAL .....	35
E. ORGANIZACION DEL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO ..	47
II. MATERIAL Y METODO .....	59
A. ANIMALES DE EXPERIMENTACION .....	59
B. GLANDULA ESCOGIDA .....	62
C. SUSTANCIAS EXPERIMENTALES .....	63
D. TECNICA QUIRURGICA .....	65
E. TECNICA MICROSCOPIA OPTICA .....	68
F. TECNICA MICROSCOPIA ELECTRONICA .....	71
III. RESULTADOS .....	74
A. MICROSCOPIA OPTICA .....	74
B. MICROSCOPIA ELECTRONICA .....	76

	<u>PÁGS .</u>
IV. DISCUSION .....	96
A. CELULAS ACINARES .....	96
B. CELULAS MIOEPITELIALES .....	116
C. CELULAS GRANULOS DENSOS .....	119
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	123
VI. BIBLIOGRAFIA .....	132
VII. GRAFICOS, TABLAS Y FIGURAS .....	159

000oooo0o0oooo000

## PREAMBULO

Las glándulas salivales son objeto de estudio por parte de varias especialidades médicas, desde el estomatólogo y el cirujano maxilofacial hasta el otorrinolaringólogo. No por ello deja de ser una de las partes más interesantes de nuestro organismo, cuyo papel fisiológico es algo oscuro. Pues, si bien conocemos su papel en la digestión y en la formación del bolo alimenticio, se plantean otras muchas interrogantes. ¿Tiene alguna función como glándula endocrina?. ¿Cual es el papel exacto que juegan en el mantenimiento del medio bucal y en la etiología de las enfermedades, que son verdadero azote de la población, como la caries y enfermedad periodontal entre otras(71). Todos estos aspectos siguen sin tener una contestación válida para todos los autores. De aquí se infiere la importancia del estudio de las glándulas salivales, por todo lo cual hemos elegido este campo para la realización no sólo de este trabajo sino para establecer una línea de investigación futura.

Nosotros intentaremos aportar algunos datos sobre la fisiología y forma de comportamiento de estas glándulas ante una serie de estímulos y circunstancias experimentales. A un grupo de animales les será administrada noradrenalina, estimulante de los receptores  $\alpha$  del sistema nervioso simpático, y a otros isoproterenol, estimulante de los receptores  $\beta$ . En

unas ocasiones el animal se encontrará en condiciones normales y en otras les será realizada una simpatectomía mediante la extirpación del ganglio cervical superior. Por supuesto hemos reservado un grupo de animales que nos sirven de control. Los resultados obtenidos se estudian grupo a grupo, para realizar la discusión centrándonos en las alteraciones obtenidas en los distintos grupos celulares del acino. Para la transcripción del trabajo nos ha llevado el criterio de concreción máxima y de ser parcos en la escritura, para poder centrarnos mejor en el tema y hacer más amena y ágil la interpretación del mismo.

Pero todos estos trabajos no son posibles sin la colaboración de un grupo de personas, que te ayudan a superar la complejidad de los métodos que utilizamos y te orientan de la mejor manera posible. En primer lugar mi más profundo agradecimiento a los profesores Bullón y Merchán, que con su orientación, enseñanzas y constante ayuda han hecho posible la superación de todas las dificultades. También quiero expresar mi agradecimiento a todo el personal auxiliar y técnico por su esmerada aportación a la ilustración iconográfica, mecanográfica y orientación técnica y a todos los que han hecho crear en mí la inquietud necesaria para llevar a cabo este trabajo científico.

=====

I. INTRODUCCION

=====

## I. INTRODUCCION

En primer lugar hemos de saber que es lo que conocemos como glándulas salivales. Son aquel conjunto de células agrupadas, de diferente tamaño, cuyo producto de secreción, denominado saliva, es segregado en la porción anterior del tracto alimentario, boca. Las funciones que ejercen los productos segregados por ellas pueden agruparse en cuatro apartados. En primer lugar y quizás la más importante: la lubricación del bolo alimenticio. Desde el punto de vista evolutivo es la más antigua de las funciones. Además proporciona un ambiente húmedo y limpio en la boca, facilitando la articulación de la palabra y la sensación del gusto por medio de los corpúsculos gustativos.

En segundo lugar segregan enzimas, que juegan un importante papel en la digestión, como son: la amilasa, proteasas, incluidas kalikreinas y lipasas en la glándula de Van Ebner de la rata ( 57 ).

En tercer lugar segregan ciertas hormonas y otros componentes como son: la parotina ( 27 ) , un estimulante del crecimiento de las células ganglionares (factor de crecimiento nervioso) ( 55, 78,79,104), un factor de crecimiento epitelial que controla la queratinización epidérmica y la erupción dentaria ( 27, 28 ) , un factor controla-

dor de la producción de linfocitos tímicos ( 90 ), dos factores de crecimiento mesodérmico (123) y en algunos animales - la remina.

Por último, las glándulas salivales en ciertos animales, como el gato y la rata, tienen la función de refrigeración que en el hombre tiene el sudor. En otros animales tiene función de defensa o ataque con la producción de sustancias tóxicas.

#### A. ANATOMIA DE LAS GLANDULAS SALIVALES DE LA RATA

Clásicamente, según el tamaño se distinguen dos tipos de glándulas salivales: mayores y menores. Las primeras se encuentran alejadas de la mucosa oral con la que se comunican por un conducto excretor extraglandular y las menores se localizan en la submucosa y derivan en la boca por varios conductos.

En la rata, como casi todos los mamíferos, se pueden distinguir tres pares de glándulas mayores: parotida, submaxilar y sublingual. En ciertos animales carnívoros hay ciertas glándulas menores, que adquieren tal relevancia, que pueden considerarse dentro del grupo de las mayores. Tal es el caso de la glándula zigomática. Hemos de reseñar que todos los datos que expresamos a continuación han sido principalmente obtenidos de los siguientes autores: Young y Van Lennep ( 71 ) y Hebel y Stomberg ( 60 ).

Las glándulas menores se encuentran distribuidas por toda la mucosa oral y se denominan de acuerdo con el lugar donde se ubican. Casi todas son mucosas y heterocrinas, con la excepción de una glándula, denominada de von Ebner's, localizada en la base de la lengua, que son serosas.

\* Relaciones anatómicas

Glándula parotida: En la vista lateral de la rata es la estructura más prominente que observamos. La glándula es difusa, extendiéndose dorsolateralmente hasta el oído y caudalmente hasta el hombro y la clavícula, ventralmente sigue el recorrido de la vena facial posterior. Sobre su borde anterior se encuentra la glándula lacrimonal. El conducto excretor tiene su punto de partida junto a esta glándula y drena la secreción de los tres conductos excretores intraglandulares. Avanza junto al nervio marginal mandibular por encima del músculo masetero anterior superficial, atraviesa el músculo buccinador y drena en la boca a la altura del primer molar. El peso de una glándula de una rata de unos 250 grs. es de  $407 \pm 74$  mgr. .

Joung ( 71 ) describe una glándula bucal anterior, situada en la pared bucal junto a la comisura bucal y cuyo conducto se une al de la parotida antes de desembocar en la cavidad oral.

Glándula submaxilar: Situada a ambos lados de la línea media es la estructura más visible de la región cervical ventral. Ambas glándulas se extienden desde el hueso hioides hasta cerca del manubrio esternal y contactan por su línea media. El peso de esta glándula en una rata

de 250 grs. es de  $195 \pm 33$  mgr..

Glándula sublingual: se encuentra situada sobre el polo anterolateral de la glándula submaxilar, pudiéndose confundir con uno de sus lóbulos. Presenta un color más pálido y puede ser separada fácilmente. Pesa unos  $44 \pm 10$  mgr. en una rata de unos 250 grs.. El conducto excretor sale junto al de la submaxilar por el polo anterior, caminan juntos, próximos a la línea media y debajo de los músculos digástricos y al lado del milohioideo. Se dirigen hacia la cavidad bucal hasta desembocar inmediatamente por debajo de los incisivos. El orificio del conducto excretor submaxilar se encuentra siempre en la cara ventral de una pequeña papila. El conducto sublingual es muy variable en cuanto a su localización, puede desembocar o no en la papila.

Existe una glándula sublingual menor, justo debajo del suelo de la boca, en contacto con el conducto sublingual y submaxilar, justo por delante del nervio lingual. Su conducto desemboca en la cavidad bucal.

Es de destacar que recientemente se ha descrito en 1.972 por Butcher ( 20 ) y en 1.975 por Schnejer y Flatland ( 102 ) un reservorio del conducto submaxilar de la rata. Tiene un volumen de unos 2 a 3 microlitos y se encuentra debajo de los incisivos. Se comunica con el conducto submaxilar antes de su desembocadura. La misión exacta que tiene este reservorio es todavía una incógnita para estos autores.

#### \* Vascularización

Las arterias acceden a la glándula submaxilar y sublingual a través del hilio, en íntimo contacto con el con ducto excretor y los nervios. Las arterias son ramas de la facial, que a su vez proviene de la carotida externa. La parotida al no tener un hilio bien definido recibe su irri gación de numerosos vasos. Estos provienen de otra rama de la carotida externa, la arteria auricular posterior.

La irrigación venosa intraglandular sigue la misma - distribución que los conductos excretores hasta el hilio.- Las venas de las glándulas desembocan en las venas facia- les anterior y posterior.

Se ha demostrado que las glándulas salivales poseen una red linfática distribuída a lo largo de los conductos excretores y de los vasos sanguíneos. El flujo linfático en condiciones normales es muy lento. Se incrementa con - la secreción salival y al administrar medicamento parasim paticomimeticos.

#### \* Inervación

Las glándulas salivales mayores reciben la inervación del sistema nervioso, tanto del simpático como del parasimpáti

co. La descripción minuciosa de esta inervación la detallaremos en la parte de esta introducción destinada al estudio del sistema nervioso autónomo.

## B. HISTOLOGIA DE LAS GLANDULAS SALIVALES DE LA RATA

Las glándulas salivales están recubiertas por una cápsula de tejido conectivo, que las individualiza. Tiene abundantes fibras colagenas. De esta cápsula parten hacia el interior de la glándula unos septos o tabiques que la dividen en lóbulos. Estos septos están formados por tejido conectivo, algo más laxo que la cápsula y contienen los conductos excretores interlobulares, vasos sanguíneos, fibras nerviosas y pequeños ganglios. A su vez, de estos septos parten otras prolongaciones que dividen a la glándula en lobulillos o adenomeros. Este tejido conectivo que individualiza a los adenomeros contiene: capilares, fibroblastos, fibras nerviosas amielínicas y un número variable de linfocitos y células plasmáticas. Podemos considerar al adenomero como la porción funcional de la glándula. Está compuesto por dos porciones, una secretora y otra excretora. La porción secretora es la que produce la saliva y está formada por un acumulo de células epiteliales con capacidad secretora. La porción excretora es la que conduce la saliva al exterior y la constituyen una serie de conductos: intercalares, granulares, estriados y secretores.

### 1. Porción Secretora =====

Este acumulo de células epiteliales con capacidad de secreción puede adoptar diferentes formas. Si se

agrupan formando un conducto alargado se denominan tubulo, si forman una esfera acino. Existe un tercer tipo, el tubulo acino, que resulta de la combinación de las dos formas anteriores. Las células se colocan en la periferia de estas estructuras. La base se apoya sobre una membrana basal, que es la que separa a las células del tejido conectivo adyacente. El ápice de las células se orienta hacia la luz que se encuentra en el centro del acumulo. Esta luz puede ser de una amplitud variable, dependiendo en gran medida de la cantidad de secreción presente.

La morfología de estas células varia mucho de una glándula a otra, e incluso a veces dentro de la misma glándula. Se pueden agrupar en tres grupos distintos: serosa, mucosa y seromucosa. El criterio que se ha seguido para esta clasificación ha sido fundamentalmente morfológico. Ultimamente se ha intentado hacer una nueva clasificación basándose en criterios histoquímicos. Pero debido a la complejidad de las técnicas se han tenido que abandonar. En un principio se considera célula serosa si el líquido que segrega es fluído, de baja viscosidad, claro y parecido al suero sanguíneo. Célula mucosa si el líquido es de alta viscosidad y más consistente. La célula seromucosa participa de características intermedias. Estos datos se correlacionaron con diferencias morfológicas, que son las básicas para su se-

paración. La célula serosa presenta un núcleo redondeado, situado en la porción basal de la célula sin llegar a tocar la membrana basal. El citoplasma apical presenta gran número de gránulos pequeños, discretos, refráctiles, normalmente eosinófilos. La célula mucosa presenta un núcleo aplanado, totalmente en contacto con la membrana basal. Los gránulos son largos y están agrupados y mal definidos, se tiñen pobremente con la hematoxilina-eosina. La célula seromucosa es intermedia entre serosa y mucosa, presenta gránulos eosinófilos y homogéneos, agrupados o sin agrupar. Histológicamente se le distingue por su gran afinidad por la hematoxilina-molibdeno.

Existe otro tipo de célula situada entre la célula glandular y la membrana basal, es la célula mioepitelial. Se observa con gran dificultad con la microscopía óptica por su forma aplanada. El núcleo es prominente y el citoplasma presenta ramificaciones muy difíciles de apreciar. Para su correcta visualización es necesario el uso de técnicas histoquímicas. Se admite que estas células tienen propiedades contractiles y actúan actuando el flujo del producto de secreción.

Los acinos o túbulos pueden contener un sólo tipo de célula glandular o ambos tipos mezclados. Se denominan respectivamente homocrinos o heterocrinos. Cuando

se da este último caso las células mucosas ocupan gran parte del volúmen, quedando las células serosas replegadas hacia la membrana basal. A veces su porción apical no llega a la luz central y dan el aspecto de una semiluna. Por último hemos de destacar que a un conducto excretor pueden desembocar varios acinos o túbulos, que éstos pueden contener células de tipo seroso o mucoso y su secreción entremezclarse en la luz del conducto.

## 2. Porción Excretora =====

Se puede definir como el sistema de conductos que transporta el producto de secreción desde el acino hasta la cavidad bucal. Normalmente se distinguen tres tipos de conductos excretores: intercalado, estriado y excretor. En la glándula submaxilar de la rata se describe un cuarto tipo: el conducto granular. Se encuentra situado entre el intercalado y el estriado.

Conducto intercalado. Las células son cúbicas o planas dando una luz pequeña. Presenta células miepiteliales abundantes. Este conducto se demostró que tiene el mismo origen que la porción secretora ( 68 ) , proviene del primitivo túbulo terminal. Este tiene propie

dades secretoras, que posteriormente pierde casi en su totalidad en la zona que dará lugar al conducto intercalado.

Conducto granular. Este conducto se encuentra en la glándula submaxilar de la rata. No está presente en el momento del nacimiento, sino que se desarrolla posteriormente. Una vez que se ha formado el conducto estriado y cerca de la mucosa con el conducto intercalado las células sufren una transformación. A los cuatro meses de edad ya se diferencian las células granulares. Este conducto se presenta en mayor extensión en el macho que en la hembra. No se sabe si forma parte del conducto intercalado o del estriado. La célula es prismática, el núcleo se encuentra en posición basal, el citoplasma presenta gran cantidad de gránulos y mitocondrias, la membrana basal presenta grandes invaginaciones. Exactamente no se sabe su función, algunos autores lo consideran como el lugar de formación de enzimas digestivas, incluso de renina y de los factores de crecimiento mesodérmico y nervioso.

Conducto estriado. Están recubiertos por un epitelio cúbico o prismático simple o, a veces, pseudoestratificado, que en el tercio basal de las células y con carácter distintivo presenta unas estriaciones eosinofilas. Poseen un citoplasma sin gránulos y con algunas mitocondrias.-

Este conducto es mayor en extensión en la parotida, pero no en la sublingual y submaxilar. No existe en las glándulas salivales menores. La función de este conducto se ha relacionado con la reabsorción de sodio. Se ha visto que las glándulas que tienen un conducto estriado poco desarrollado se produce una saliva hipotónica y que al disminuir el aporte de sodio se produce una hipertrofia de los conductos.

Conductos excretores. El epitelio es simple, con células cilíndricas. El núcleo oval se encuentra cerca del ápice y en la basal existen estriaciones perpendiculares. Este epitelio, conforme va acercándose al hilio para desembocar en el conducto excretor extraglandular, se transforma en pseudoestratificado.

### 3. Características individuales de las glándulas

=====

Glándula parotida. Es una glándula homocrina, serosa y acinosa. El sistema excretor no contiene ninguna porción de conducto granular pero sí está bien definido el intercalado y el estriado.

Glándula sublingual. Es una glándula heterocrina, con acinos predominantemente mucosos y ocasionalmente hay

elementos serosos o seromucosos. El sistema excretor - presenta un conducto intercalado poco desarrollado, no se encuentra el granular y el estriado si está bien de sarrollado.

Glándula submaxilar. Es una glándula túbulo-acinar de tipo seromucoso. Según Tamarin Screebny ( 116 ) - la porción secretora forma el 63% del volúmen glandular, los conductos intercalados el 4%, conductos granulares - el 18%, conductos estriados el 1%, estroma el 14% y conductos interlobulares el 2%.

El acino de estas glándulas presenta células trian gulares con la base basofila y el núcleo prominente. El polo apical presenta caractéres mucosos con las reaccio nes histoquímicas. El acino y el conducto intercalado - contienen células cúbicas, pequeñas, con un núcleo que ocupa casi todo el volúmen celular y pequeños granos en el citoplasma. El conducto granular presenta tres tipos de células: una oscura, la más abundante, prismática, - con gránulos abundantes, otra clara, prismática, con es triaciones perpendiculares a la membrana plástica basal y un tercer tipo de menor tamaño, cúbica, sin gránulos, situada cerca de la membrana basal del conducto. El conducto estriado presenta células prismáticas, el - tercio basal presenta estriaciones perpendiculares a la membrana basal, el núcleo oval, se encuentra situado en

el centro de la célula. El conducto excretor presenta - células prismáticas altas, con un núcleo situado en el tercio apical.

Hemos de hacer constar que, aunque los datos reseñados en este apartado están contenidos en la mayoría - de los tratados de histología, nuestra fuente de información básica la ha constituido la obra monográfica que sobre el tema escribieron los autores Young, J.A. y Lennep, E.W. ( 71 ).

## C. ULTRAESTRUCTURA DE LA GLANDULA SUBMAXILAR DE LA RATA

### 1. Porción Secretora =====

El acino está compuesto de células piramidales, - las cuales contienen un núcleo esférico, gran cantidad de cisternas de retículo endoplásmico rugoso y algunas mitocondrias en el citoplasma basal y perinuclear. La porción apical presenta gran número de gránulos. El aparato de Golgi es prominente y de localización perinuclear. Estos datos y los que a continuación transcribimos han sido recopilados en su gran mayoría de los trabajos de los siguientes autores Scott y Pease (105); Tamarin y Sreebny (116).

El retículo endoplásmico consiste en finas membranas, cubiertas en su cara externa por gran cantidad de ribosomas, dispuestas de forma paralela. Estas formaciones, denominadas cisternas, contienen una matriz más densa que el citoplasma circundante. El retículo se encuentra distribuido por todo el citoplasma. Parcialmente cubre al núcleo y se continúa con la membrana perinuclear. En la porción basal está en estrecha relación con las invaginaciones de la membrana plasmática, sin haberse podido constatar una relación entre ambas membranas. Los ribosomas se encuentran situados periódicamente cada 300 angstrom. Es raro observar zonas de retículo agranular. Estos corpúsculos se observan libres por

elcitoplasma o formando agregados, sobre todo en la porción apical.

El aparato de Golgi aparece constituido por una serie de cisternas lisas agrupadas concéntricamente. La célula del acino contiene varias de estas organelas , - sin tener aparentemente ninguna interconexión entre sí, ni con el retículo endoplásmico. Estas cisternas presentan en los lados algunas vacuolas. Estas vacuolas sí se ha visto que tengan relación con las cisternas del retículo.

Las mitocondrias se distribuyen por todo el citoplasma , son más abundantes en la proximidad de la membrana basal y de la lateral y más escasas en la porción apical. La matriz es moderadamente electrodensa, ocasionalmente se observan cuerpos intramitocondriales circulares. Presenta una doble membrana y crestas intramitocondriales prominentes. La membrana externa tiende a ser ondulada. Suelen estar orientadas de acuerdo con el eje celular.

El citoplasma presenta algunas vacuolas lipídicas, microfilamentos dispersos en la porción apical o condensados alrededor de los desmosomas y microtúbulos sin localización precisa.

La característica diferencial más importante de cualquier célula secretora es su producto de secreción, visible en forma de gránulo o vacuola. El gránulo de secreción consiste en una membrana envolviendo a una matriz esférica. Esta membrana desaparece en parte al fusionarse dos gránulos entre sí, pudiendo observarse parte de estas membranas dentro de algunos gránulos. A veces pueden observarse alteraciones en las membranas, pero se cree que son debidas a un corte tangencial o a un defecto de fijación. Según Martínez-Hernández ( 82 ) los gránulos de secreción contienen un enzima muy potente que provoca la lisis de las membranas y actúa inmediatamente al interrumpirse el flujo sanguíneo. Por tanto, para una correcta fijación es necesario una perfusión muy rápida del tejido.

El tamaño y la forma de los gránulos, así como la apariencia de la matriz varia considerablemente según el procedimiento de fijación usado ( 33 ) . Se han comparado los resultados de fijación con los distintos productos, la fijación con tetroxido de osmio-glutar-aldehído da lugar a una matriz homogéneamente electrodensa (82, - 120). Si usamos el tetroxido de osmio-dicromato es moderadamente electrodensa y contrinitro-aldehído es completamente translúcida a los electrones.

En la glándula submaxilar de la rata el citoplasma apical está repleto casi en su totalidad de gránulos, - así como la zona próxima a los canalículos secretores.- El retículo endoplásmico es desplazado de estas áreas.- Los gránulos tienen de media unas 0'7 micras de diámetro y presentan una densidad intermedia entre la luz y el citoplasma. Kamda ( 72 ) describe tres tipos de gránulos. Uno presenta un contenido homogéneo, de densidad electrónica moderada, se encuentran distribuidos por todo el citoplasma. Otro tipo contiene un material filamentososo, sobre un fondo claro y amorfo. Por último, puede ser alargado y con un contenido filamentoso. A veces puede observarse la presencia de una o unas inclusiones electrodensas dentro de la matriz. Estos gránulos es frecuente observarlos fusionados con uno o dos más, sobre todo en el polo apical de la célula.

Dispersas entre los gránulos de secreción se constata la presencia de vacuolas. Estas son esféricas y con una membrana envolviéndolas. Se encuentran sobre todo en el polo apical. Pueden adquirir dos aspectos distintos: claros y oscuros. Los cuerpos oscuros son más densos que los gránulos de secreción, pero su distribución es similar. Se cree que son lisosomas. Los cuerpos claros, con una densidad similar a la luz del acino, se encuentran situados en la zona apical.

La membrana plasmática de la célula presenta características diferentes según la zona. En la porción basal descansa sobre la membrana basal o sobre una célula mioepitelial. Presenta escasas invaginaciones. No es frecuente observar hemidesmosomas, sólo en las zonas de contacto con las células mioepiteliales se observan algunos demosomas rudimentarios. La porción apical es muy irregular presentando signos de pinocitosis y de secreción de material granular.

La membrana plasmática lateral en su porción apical forma con la célula adyacente un complejo de unión. Se observa una fusión de la porción externa de las membranas. Debajo de ellas aparecen dos o tres demosomas con una serie de microfilamentos que confluyen en ellos. Las membranas suelen presentar interdigitaciones donde se invagina la célula adyacente. Estas son más prominentes en la porción basal. En esta zona no es raro observar alguna prolongación de las células mioepiteliales. A una altura media de la membrana presenta una pequeña luz entre dos células. Estas se conocen como canalículos secretores pues se cree que tienen una misión importante en la recolección del material secretor. Desde el punto de vista funcional y estructural forma parte de la luz del acino. No se diferencian morfológicamente, excepto por su menor tamaño y su ubicación más hacia la periferia del acino. El citoplasma que rodea al ca-

nalículo no se distingue del apical. Presenta una membrana irregular, con signos de micropinocitosis y divertículos prominentes.

Existe un tipo especial de célula en la porción secretora ya descrita en el apartado de microscopia óptica, la célula mioepitelial. Según Tamarín ( 116 ) en la glándula submaxilar de la rata tiene dos ubicaciones posibles: en la porción secretora y en el conducto intercalado. En la primera, es prominente, emite sus prolongaciones en todas direcciones envolviendo al acino. En el conducto intercalado es fusiforme, las prolongaciones son más escasas y siguen la dirección del conducto. Las prolongaciones sobre todo en el acino, se pueden entrecruzar con frecuencia, sin llegar a fusionarse. A veces pueden introducirse entre las células acinares. El número de células mioepiteliales es variable en las distintas glándulas salivales. Según Tamarín ( 116 ) en la glándula submaxilar es el 12'5% del volúmen acinar y el 41% del volúmen del conducto intercalado.

La ultraestructura descrita por Tamarín ( 116 ) y Garretty Emmelin ( 49 ) muestra una célula con dos zonas bien diferenciadas, una con filamentos y otra sin filamentos. La primera zona contiene un núcleo aplano y con indentaciones ocasionales y los organelas ci

toplasmáticos. El aparato de Golgi se encuentra en posición yuxtannuclear, el retículo endoplásmico rugoso y las mitocondrias son escasas. Se encuentran ribosomas libres y otras estructuras parecidas o lisosomas.

Los filamentos, que llenan la mayor parte de la célula, tienen un aspecto similar a los microfilamentos del músculo liso. Los filamentos pueden ser finos de unas 4 nanomicras de diámetro, situados cerca de la membrana basal y siguiendo el eje de las prolongaciones citoplásmicas, o gruesos de unos 10 nanomilímetros que se encuentran más dispersos.

La membrana plasmática en contacto con el estroma presenta ocasionalmente irregularidades que dejan un espacio libre que no contacta con la lámina basal. Estos también pueden presentarse en la membrana que mira a la zona acinar. Es aquí donde se encuentran los desmosomas. Estos están separados, pero se mantienen al contraerse la célula, lo que provoca la aparición de unas lagunas entre la célula mioepitelial y la acinar. Según Cutler y Chaudry ( 29 ) una característica interesante es la presencia de cilios, aunque si bien con muy escasa frecuencia.

## 2. Porción excretora =====

### a). Conductos intercalados

Estos conductos varían mucho en cuanto al tamaño, diámetro y altura de las células entre distintas especies animales e incluso entre las distintas glándulas salivales ( 71 ).

La célula de la glándula submaxilar de la rata es más bien cúbica con un núcleo esférico, que ocupa casi todo el citoplasma. Las mitocondrias son escasas y más pequeñas y menos electrodensas que las correspondientes a la célula acinar. El retículo endoplásmico rugoso es escaso y el aparato de Golgi se observa en posición yuxtannuclear. La membrana externa del núcleo está recubierta de ribosomas. Estos también pueden encontrarse en forma de pequeñas agrupaciones dispersas por todo el citoplasma. En el tercio apical pueden observarse cuerpos multivesiculares, cuerpos parecidos a vesículas con una membrana limitante, gránulos densos, filamentos en disposición paralela y con relativa frecuencia centriolos. La membrana plasmática basal y lateral es lisa y forma pocas interdigitaciones. Las microvellosidades en la membrana apical son raras.

La función de estos conductos no está bien establecida, pues si bien se puede suponer su participación en la reabsorción del agua y electrolitos, su apariencia ultraestructural no nos lleva a considerarlos como participantes en el proceso de secreción ( 71 ).

b). Conducto granular

En él podemos encontrar tres tipos de células al microscopio electrónico: granulares claras, granulares oscuras y agranulares ( 105 ).

Células granulares claras. Presentan un núcleo en posición central, por debajo se encuentran gran cantidad de mitocondrias y apicalmente numerosos gránulos densos, claros y de un tamaño diferente. La cantidad de retículo endoplásmico rugoso está de acuerdo con el número de gránulos, si estos abundan hay gran cantidad, si son escasos predomina el retículo. La membrana nuclear externa se encuentra recubierta de ribosomas. Estos también pueden encontrarse dispersos por todo el citoplasma, libres o agrupados. El citoplasma apical contiene un acumulo de filamentos que pueden estar o no en relación con desmosomas. La membrana plasmática basal

presenta interdigitaciones muy acusadas que llegan hasta la mitad de la célula. La membrana lateral no presenta estas irregularidades, sólo en su porción apical forma un complejo de unión con la célula adyacente y cierto número de desmosomas.

Célula granular oscura. Suelen ocupar una posición más alejada con respecto al conducto intercalado que las células claras. Los gránulos son más alargados, menos redondeados y ocupan una mayor porción del citoplasma. El núcleo se encuentra situado cerca de la basal. Las mitocondrias son escasas y dispuestas en la zona basal y lateral al núcleo. Las invaginaciones de la basal son menos frecuentes y no tan profundas. El retículo endoplásmico es más bien escaso. Todas las organelas: núcleo, retículo y mitocondrias están rechazadas hacia la basal por la gran acumulación de gránulos en el apice. El aparato de Golgi aparece poco prominente y próximo al núcleo. En su cercanía se observan pequeñas vesículas, que al evolucionar se transforman en gránulos.

Célula agranular. Esta célula varía en forma, tamaño y densidad, de tal manera que se puede establecer una evolución a partir del tipo granular

claro. La forma más densa presenta un núcleo alargado situado en su porción basal, en el apice algunos gránulos claros. Las mitocondrias son escasas y se encuentran sólo en la base celular, el retículo endoplásmico está poco desarrollado. La membrana nuclear es lisa, estando los ribosomas libres preferentemente en la porción apical del núcleo. La membrana plasmática lateral presenta desmosomas y en su parte media una evaginación que penetra en la célula adyacente.

Una característica de las células del conducto granular es la formación en el apice de unos globos o vesículas que protuyen en la luz. Este fenómeno ocurre con distintos fijadores sobre todo con los que tienen 3.000 miliosmoles de osmolaridad. El citoplasma subyacente es más denso y presenta abundantes filamentos.

c). Conducto estriado

Las células que lo forman presentan unas interdigitaciones muy profundas de la membrana basal, en las cuales se disponen gran número de mitocondrias. Estas interdigitaciones tienen una disposición paralela. La membrana plasmática lateral presenta invaginaciones poco acusadas, desmosomas abundantes.

dantes cerca del polo apical. La membrana apical es ondulada y presenta estructuras similares a microvellosidades.

El núcleo está situado en el centro del citoplasma y es ovalado. En su proximidad se encuentra retículo endoplásmico liso. El tipo rugoso es escaso y está poco desarrollado. Los ribosomas libres abundan por todo el citoplasma. En el pocolo apical se encuentran algunas pequeñas vesículas no mayores de 0'2 micras de diámetro, además de signos de pino citosis evidente (115).

d). Conducto excretor

Las células que forman parte de este conducto pueden tener la misma complejidad que las del conducto estriado. Se han descrito tres tipos: claras, oscuras y basales (110).

Células claras. Tienen forma triangular más ancha por el apice y estrechas por la base. El núcleo está localizado en la mitad apical del citoplasma. Las mitocondrias son abundantes en la mitad inferior, agrupándose estrechamente cerca de la basal, mientras alrededor del núcleo son esca-

sas. El retículo endoplásmico se presenta poco abundante y con un perfil ovoide. La membrana externa del núcleo tiene escasos ribosomas. Estos se presentan libres por todo el citoplasma, en mayor número en el tercio apical. El aparato de Golgi está situado en el poco apical del núcleo. Aparecen con gran frecuencia cuerpos densos. El citoplasma es claro, lo atraviesan finos filamentos aislados o agrupados en todas direcciones. La membrana plasmática apical tiene un contorno liso con algunas vesículas en su proximidad.

Célula oscura. Son más estrechas y contienen mayor número de mitocondrias. El retículo endoplásmico está más disperso y la membrana externa nuclear está libre de ribosomas, en cambio hay mayor número de ribosomas libres y de microfilamentos. La membrana plasmática apical presenta abundantes microvellosidades. La convexidad apical de la célula está separada de la adyacente por un pequeño espacio, a modo de hendidura, el cual se cierra por medio de un complejo de unión. La membrana lateral forma pequeños espacios intercelulares sin relación con la luz del conducto, en éstos protruyen microvellosidades de las células adyacentes. La porción basal de la membrana emite prolongaciones, a modo de pedículos paralelos, que se introducen entre las invaginacio-

nes de la célula clara adyacente.

Célula basal. Es de menor tamaño y está situada cerca de la basal sin contacto con la luz. Es de menor tamaño, ocupando el núcleo casi todo el citoplasma. La membrana plasmática no tiene invaginaciones, pero sí abundantes desmosomas. Hay ribosomas libres, escasas vesículas y mitocondrias y un retículo endoplásmico prácticamente ausente.

Para una mejor comprensión de los distintos tipos de células hemos realizado un cuadro resumiendo las características más peculiares. Este ha sido extraído en su mayor parte del trabajo hecho por Tamarín, A. y Sreebry, L.M. ( 116 ).

ACINO	CELULA ACINAR SECRETORA	Gran cantidad de retículo endoplásmico y gránulos. Es la más abundante en el acino.
	CELULA MIOEPITELIAL	Se sitúa entre la membrana basal del acino y la célula acinar. Es aplanada con prolongaciones del citoplasma, escasas organelas citoplasmáticas, abundantes filamentos.
CONDUCTO INTERCALADO	CELULA CUBICA	Célula de pequeño tamaño, núcleo prominente, escasas organelas citoplasmáticas.
	CELULA MIOEPITELIAL	Estructura igual que la acinar pero las prolongaciones recorren el conducto en sentido longitudinal.
	CELULA AGRANULAR	Citoplasma oscuro, escaso retículo endoplásmico, ribosomas, aparato de Golgi y gránulos. En el ápice hay vesículas que protuyen a la luz.
CONDUCTO GRANULAR	CELULA GRANULAR CLARA	Mayor tamaño, núcleo centralizado, abundante retículo endoplásmico, aparato de Golgi, gránulos y mitocondrias. Membrana plasmática basal con abundantes interdigitaciones.
	CELULA GRANULAR OSCURA	Más alargada, núcleo en posición basal, gránulos más alargados. Retículo endoplásmico y aparato de Golgi escasos. Grandes vesículas en ápice. Interdigitaciones de la membrana basal escasas.

CONDUCTO ESTRIADO	CELULA ESTRIADA AGRANULAR	Interdigitaciones profundas de la membrana basal con abundantes mitocondrias. Retículo endoplásmico escaso. Escasas vesículas en el polo apical.
	CELULAS CLARAS	Citoplasma claro, mitocondrias abundantes, retículo endoplásmico poco abundante, escasas vesículas. Invaginaciones de la membrana basal muy prominentes.
CONDUCTO EXCRETOR	CELULAS OSCURAS	Citoplasma oscuro. Más estrechas. Abundantes microvellosidades en el polo apical. Retículo endoplásmico escaso. La membrana basal emite evaginaciones que se introducen en la célula clara contigua.
	CELULA BASAL	Pequeño tamaño, escaso citoplasma, núcleo prominente. Escasas organelas. Membrana plasmática sin invaginaciones pero con desmosomas.

### 3. Estroma =====

El estroma lo constituye un tejido conectivo fibroso y escaso. Excepto en el hilio y en los tabiques que conforman los lóbulos en que es más abundante. Las fibras colágenas rodean todas las estructuras glandulares, son más numerosas alrededor de los conductos excretores de mayor tamaño. Los fibroblastos con un retículo endoplásmico abundante se encuentran por todo el estroma.

Existe gran cantidad de fibras nerviosas amielínicas. No se ha podido comprobar una preferencia de estas fibras por ningún componente del parenquima en especial. En la glándula submaxilar no atraviesan la membrana basal, no estableciendo ningún contacto directo con las células del parenquima.

Los vasos sanguíneos son abundantes. Los capilares forman una red alrededor de los conductos excretores. Se pueden encontrar otro tipo de células, como son: leucocitos, macrofagos y células cebadas. ( 71 )

#### D. PROCESO DE SECRECION SALIVAL

Desde un punto de vista histórico, el fenómeno secretor está considerado desde Aristóteles. Pero no fue hasta Claude Bernard en 1.856 ( 12 ) cuando empiezan a conocerse datos basados en los análisis morfológicos. Este autor sugería, que los enzimas segregados por el pancreas, estarían contenidos en el citoplasma celular en forma de gránulos. Posteriormente fueron Martín y Rudolf Heidenhein (61) quienes observarían distintos cambios morfológicos durante el proceso de secreción, elaborando un esquema en cuatro fases : captación, elaboración, transporte y eyeción del producto segregado. Cajal ( 22 ) y Hirsch en 1.939 demostraron que el origen de estos gránulos estaba en el aparato de Golgi. Con todos estos datos se llega a la segunda mitad del siglo XX, en la que se incorporan al estudio técnicas más sofisticadas, sobre todo la microscopia electrónica, con lo que se incrementan notablemente nuestros conocimientos ( 31 ) . La contribución más importante es la hecha por el grupo de Palade, profesor de Biología Celular en Yale y que le valió la concesión del Premio Nobel ( 94 ) .

Nosotros para la descripción de la secreción salival nos basaremos principalmente en los estudios hechos por este autor, Palade ( 94 ) . En el esquema por él propues

to y en las características distintivas de las glándulas salivales descritas por otros autores. El proceso, para una mejor comprensión lo fraccionaremos en distintos estadios.

#### 1. Captación de Aminoácidos =====

La captación o toma de aminoácidos, lógicamente, es el primer paso en el proceso de secreción. Se cree que el paso del espacio extracelular al intracelular se realiza por un transporte activo, aunque exista una difusión pasiva entre los dos medios. En un estudio hecho por Venrooij y colaboradores (121) en la glándula submaxilar de la rata, demostró que la célula capta rápidamente el aminoácido leucina, marcado isotópicamente, durante los diez primeros minutos de incubación, decreciendo posteriormente. Esto sugiere que las proteínas se sintetizan preferentemente a partir de aminoácidos extracelulares más que intracelulares. Este aspecto es confirmado por otro autor, Barka, T. (10), al estimular con isoproterenol la glándula salival. Observa un aumento en la captación de aminoácidos no metabolizados y del ácido  $\lambda$ -aminoiso-butírico. Estos aminoácidos una vez captados por las membranas basales y laterales son transportados por el RNA de transferencia a los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso.

## 2. Síntesis, Segregación y Transporte

La síntesis ocurre en los ribosomas del retículo endoplásmico. Las cadenas polipeptídicas codificadas por el RNA-mensajero crecen a través de la subunidad mayor (la que está unida a la membrana del retículo endoplásmico), quedando así enfrentados a la luz de la cisterna, donde son finalmente depositadas. ( 15 ).

La duración de este proceso es muy corta según demuestra Castle y Colaboradores (25) en la parotida de conejo. El transporte a través de la membrana del retículo está mediado por las riboforinas y por las glucoproteínas, que funcionan como aceptores de la membrana para los ribosomas. Pero no sólo se produce la síntesis del material secretor, sino también las proteínas que formarán la membrana del grano de secreción.

Los polipeptidos una vez que alcanzan la luz cisternal, sufren una serie de modificaciones que, entre otros hechos, conducen a que las moléculas adquieran una configuración especial que impide, por motivos estrictamente mecánicos, su paso al citoplasma (94) . El hecho de que las proteínas elaboradas queden aisladas por medio de las membranas del retículo, es lo que se conoce como segregación.

Las proteínas son transportadas desde el retículo hasta el aparato de Golgi. La forma en que se realiza el transporte es motivo de controversia. Por una parte se afirma que sería un mecanismo pasivo, fluyendo las proteínas a través de las conexiones anatómicas existentes entre el retículo y el aparato de Golgi. Por otra parte se ha demostrado por autorradiografía que el material secretor aparece en las vesículas de transferencia del aparato de Golgi y después en las vacuolas de condensación. Esto permite pensar según Palade (94) que es posible que se sortee las cisternas del aparato de Golgi. Confirmando esto está el hecho de que el proceso de secreción consume energía, necesaria para los procesos de fusión-fisión de membranas inherentes al desprendimiento de vesículas del retículo endoplásmico y a su incorporación a las vesículas de secreción -

( 69 ) .

### 3. Condensación y Maduración =====

El siguiente paso del proceso es la condensación o concentración del material que arriba al aparato de Golgi. La hipótesis más sencilla es que, puesto que el material está contenido dentro de membranas, serían las bombas iónicas de las mismas las encargadas de la extrusión de agua. Sin embargo, según Jamieson y Palade ( 69 ) el proceso de condensación no requiere energía, lo que hace evidente que debe tratarse de un mecanismo energéticamente muy económico. La naturaleza del mismo no es conocida, aunque se cree que comprendería la formación de agregados moleculares largos, que reduzcan el número de partículas osmóticamente activas con salida pasiva de agua. Simultáneamente ocurren varios fenómenos importantes, de entre los cuales son de destacar la adicción de iones y la elaboración metabólica final del producto.

Este fenómeno es visible mediante la microscopia electrónica. La vacuola va adquiriendo progresivamente una matriz más electrodensa y aparecen algunos núcleos condensados en su interior. Este producto de secreción se considera muy estable, incluso si carecen de membrana. Por ejemplo, en la célula seromucosa de la glándula submaxilar humana contiene unos gránulos de secreción con dos inclusiones densas: una esferoidal y otra en media luna unida a la

membrana, incluidas en la matriz, después de la secreción la matriz y el cuerpo en media luna se disuelven, quedando intacto por un corto período de tiempo las esferoidales. Pueden encontrarse en la saliva de personas normales y en los pacientes con fibrosis quística, que tienen un nivel elevado de calcio en la saliva, cuerpos esferoidales - incluso una hora después de la secreción. ( 16 ) . - A las dos horas los cuerpos se disuelven y el calcio precipita como calcio hidroxapatita. Esto sugiere que el calcio se une a las proteínas en los cuerpos esferoidales y - que tras la secreción el calcio se va disociando e incrementando la solubilidad de las proteínas.

#### 4. Almacenamiento =====

Una vez el material excretor sale del aparato de Golgi, y sufre las transformaciones antes comentadas, pasa a los gránulos de secreción. Como vimos en la ultraestructura, estos se componen de una membrana y un contenido de aspecto muy variable. Presentan una forma de almacenamiento del material secretor, que puede utilizarse de inmediato o ser retenido durante algún tiempo en el citoplasma. Para ello poseen una característica fundamental, y es su estabilidad, tanto en el citoplasma como una vez expulsa-

dos o extraídos del mismo ( 94 ).

Esta propiedad ha llevado a pensar que los gránulos - han de poseer una matriz sobre la que se insertan los productos de secreción. Esta matriz es conocida, sólo se cree que podría estar formada por proteoglicanos y un grupo de lipoproteínas acidas solubles, designadas con el acronismo de SALPS ( 74 ) . El destino de los gránulos de secreción es la descarga o, en algunos casos, en especial - cuando la producción celular de secreción excede la demanda sistémica de la misma, pueden ser digeridas por los lisosomas.

##### 5. Descarga =====

La última fase del proceso de secreción es la descarga de los gránulos al espacio extracelular. Obviamente esta etapa tiene dos estadios netamente diferenciados, a saber: la aproximación de los gránulos de secreción a la membrana y la descarga propiamente dicha del material secretor ( 127 ).

El transporte de los gránulos de secreción desde el aparato de Golgi a las zonas hipolemales es un proceso -

del que se conocen muchos datos, pero algunos difícilmente conciliables. El hecho de que la colchicina y los alcaloides de la vinca inhiban la secreción del hepatocito , ( 87 ) es un dato que induce a pensar que el transporte de los granos estaría mediado por los microtúbulos, aunque, por otro lado, la máxima inhibición por la colchicina es previa a la despolimerización que este agente produce en los microtúbulos ( 87 )

Una vez que los gránulos se acercan a la membrana ocurre un proceso de exocitosis. Este proceso consiste en la unión de la membrana del gránulo con la membrana celular, por donde se abre un poro por donde se expulsan los productos de secreción.

En glándulas no estimuladas, los gránulos de secreción se encuentran en el polo apical muy agrupados, pero sin aparente fusión con la membrana celular. Esta falta de fusión entre las membranas puede deberse a la existencia de una barrera entre las dos membranas o a la ausencia de una configuración molecular especial necesaria para la fusión y perforación. Por lo tanto la estimulación de la secreción conllevaría una retirada de los filamentos de actina permitiendo la fusión de las membranas. Este podría ser el motivo de la inhibición de la secreción por medio de la cytochalosina  $\beta$  . Pero, se cree que esta droga podría afectar también a la estructura molecular de las

membranas y actuaría también facilitando la fusión de membranas ( 20 )

Pero según Selinger y Colaboradores (107), los gránulos de secreción no juegan un papel tan pasivo como aquí hemos querido darles. Ellos encontraron que los gránulos de secreción de la parotida de rata aislados forman pseudopodos, cuando se incuban en un medio con ATC,  $Mg^{24}$ , AMP cíclico, thophyllia, fosfocreatinina y cretinina-Kinasa. Pseudopodos similares se encuentran en la glándula parotida tras la estimulación. El autor sugiere que tras la administración de isoproterenol, el AMP cíclico induce la formación de pseudopodos en los gránulos de secreción los cuales de este modo establecen un contacto con la membrana plasmática apical. No obstante el mecanismo de formación no está todavía claro. En este mismo trabajo el proceso es explicado por los autores de una forma similar a la producción de pseudopodos por una ameba. En estos organismos se forman por la acción de microfilamentos del citoplasma. Dentro de los gránulos de secreción es lógico pensar que no existen por lo que se supone que se producen por la acción de filamentos de actina del citoplasma circundante. La cara del gránulo que da a la membrana apical es la que forma los pseudopodos y los microfilamentos, que se encuentran entre las dos porciones, son los que actúan en este proceso. No está claro si estos pseudopodos representan extensiones de los gránulos

hacia la membrana celular o conexiones entre gránulos adyacentes.

Una vez entran los gránulos en contacto con la membrana celular se produce la fusión de las membranas y la aparición de un poro. Se cree que las proteínas de las membranas sufren una reagrupación, moviéndose lateralmente, quizás por la acción de los microfilamentos, durante el proceso de exocitosis.

Ichikawa ( 67 ) describió en el pancreas que tras la estimulación, en el momento en que un gránulo descarga en la luz del acino, los otros gránulos se unen a aquel y expulsan el contenido a través del primero. Este aspecto fue observado por Amsterdam y Colaboradores ( 4 ) en la glándula parotida de la rata y confirmado posteriormente por Selinger y Colaboradores (107). Es a través de ese poro por donde se produce la descarga.

Pero existe una diferencia fundamental de comportamiento entre los gránulos de secreción serosos y mucosos. Esta radica en el comportamiento de las membranas. En el gránulo seroso una vez establecido el contacto con la membrana celular, su membrana pasa a formar parte de la misma. Esta membrana se recupera posteriormente por el proceso de pinocitosis, siendo degradadas por los lisosomas del citoplasma ( 4 ) . El gránulo mismo descarga

descarga a través de una brecha de la membrana. El proceso comienza con la emisión de un pseudopodo, se fusionan las dos membranas y se abre la brecha. La membrana del gránulo se pierde en la luz del acino, donde a veces se pueden observarse sus restos. Este mecanismo fue observado por Kim y Colaboradores (73), tanto en la glándula sublingual de la rata y concuerda con lo observado por otros autores, Tandler y Poulsen y Colaboradores (117), en la glándula submaxilar del gato. Pero si se estimula la glándula con isoproterenol y pilocarpina, Kim y (73), observan que los gránulos apicales se fusionan entre sí y descargan a través del más cercano a la membrana celular. Por último hemos de estudiar la función desempeñada por las células mioepiteliales. Por supuesto que ésta no consiste en producir el material secretor, pero sí en facilitar su expulsión. En las glándulas sudoríparas del hombre y las glándulas mamarias de varios animales se ha comprobado directamente que la contracción de la glándula se debe a la actividad de las células mioepiteliales. Sin embargo, esto no ha sido posible en las glándulas salivales donde sólo se tienen comprobaciones indirectas de la actividad mioepitelial. Así, se ha visto que el volumen de la glándula salival disminuye, el flujo de saliva aumenta y la presión en la luz del sistema excretor se incrementa (80). Pero hemos de tener en cuenta que algunos de estos signos pueden ser producidos por otros factores. Por ejemplo, una vasodilatación puede provocar un incremento en el

flujo salival. En un reciente trabajo de Garrett y Emelin ( 49 ) estimulan la glándula submaxilar del perro con distintas drogas simpaticomimeticas. La dosis administrada está por debajo del umbral necesario para incrementar la producción de material secretor. Observan un incremento en la presión de la luz del conducto secretor y lo atribuyen a la contracción de la célula mioepitelial. Pero aún admitiendo esta posibilidad, cual es el efecto inicial producido, un vaciamiento rápido de los gránulos de secreción o un estrechamiento del acino y del conducto intercalar . Porque ambos procesos provocan el incremento de presión. Hay autores que están de acuerdo con el segundo punto, Garrett y Parsons ( 52 ) , otros que admiten la ruptura de los gránulos ( 117 ) y por último, Emelin y Colaboradores ( 40 ) establecen que lo que se produce es un incremento en la secreción y que la actividad mioepitelial consistiría en evitar la distensión que produce el incremento secretor en las estructuras.

A todo esto hemos de añadir otro aspecto fundamental extraído de modelos experimentales. Para la secreción no es indispensable la existencia de células mioepiteliales. Se ha estimulado farmacológicamente la secreción y se ha inhibido la actividad mioepitelial. El resultado es que la secreción prosigue ( 41, 42 ) . Por lo tanto, hay una secreción lenta y espontánea de la glándula, solamente cuando es necesario el vaciamiento rápido de la glándula interviene la actividad mioepitelial.

#### E. ORGANIZACION DEL SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO

Genéricamente se conoce como sistema nervioso al encargado de regular y coordinar todas las actividades de los organismos animales. Dentro de este sistema se incluye el concepto de Langley sobre el sistema nervioso autónomo. Su misión consiste en regir las funciones viscerales del cuerpo. Las primeras noticias históricas que se tienen sobre la función de este sistema, se derivan de la observación por los médicos de antaño de la relación estrecha de este sistema con las reacciones emocionales al dolor y a los traumatismos. La terminología hoy usada se deriva en su mayor parte de estos primeros conceptos. Se observaba que al lesionarse o producirse actividad en una parte del cuerpo se alteraban otros órganos, como si existiera una "relación de simpatía" entre ellos. En 1732 Winslow describe la anatomía del sistema: los ganglios laterales y colaterales, las fibras que se extienden desde ellos a los órganos viscerales y las ramas de la inervación eferente toracolumbar. Designa estas estructuras como constitutivas de un sistema nervioso simpático. Otros autores lo denominan como sistema nervioso involuntario, Goskell, o sistema nervioso vegetativo, Myer, L.R. y Muller. Posteriormente se van estableciendo las actividades sobre las que ejerce un control, como son: presión arterial, secreción digestiva, emisión de orina, sudor, temperatura corporal y otras mu-

chas más.

A continuación describiremos los conceptos que se tienen en la actualidad. El sistema nervioso autónomo, según el concepto de Langley, tiene sus centros situados en la médula espinal, tallo cerebral e hipotálamo. La transmisión de los impulsos se realiza a través de dos vías: el sistema simpático y el parasimpático.

El sistema nervioso simpático parte de estos centros y se distribuye a través de la médula espinal. En esta nos encontramos las neuronas pregangliares, las cuales emiten sus correspondientes fibras. Estas, denominadas preganglionares, emergen por cada segmento de la médula espinal y van a la cadena ganglionar simpática que se encuentra en la proximidad. Establecen en estos ganglios sinapsis con las neuronas ganglionares. Estas emiten a su vez las fibras postganglionares, las cuales contactan con el órgano inervado. Esta sinapsis no se produce en todas las cosas, hay cierto número de fibras preganglionares que pasan sin interrupción a través del ganglio y hacen sinapsis en otro posterior.

Las fibras del sistema nervioso parasimpático abandonan el sistema nervioso central siguiendo varios nervios craneales, el segundo y el tercer nervio sacro de la médula espinal y a veces el primero y el cuarto. La vía más im

portante es el nervio vago pues por él pasan el 80% de todas las fibras de este sistema.

Según Hebel y Stronberg ( 60 ) en la rata la cadena ganglionar simpática contiene los siguiente ganglios: tres cervicales, trece torácicos, seis lumbares, cuatro sacros y uno coxigeo. Las fibras nerviosas simpáticas que inervan las glándulas salivales, objeto de nuestro trabajo, parten de los primeros segmentos torácicos, van al tronco simpático y de aquí al ganglio cervical superior.- Este se encuentra situado en la bifurcación de la carótida común, cerca del glomus carotideo. Se distingue por su color blanquecino y forma alargada, puede ser separado fácilmente del paquete vascular. Las fibras postganglionares se incorporan a los vasos sanguíneos, por medio de los cuales acceden a las glándulas inervadas.

La inervación parasimpática de las glándulas salivales parte de los núcleos salivales superior e inferior de la formación reticular lateral del tronco cerebral. Las fibras con destino a la glándula submaxilar están a formar parte del nervio facial, el cual, en su trayecto intrapetroso, emite una rama, la cuerda del tímpano. Esta sale del recorrido intraoseo y se une al nervio lingual, el cual en la proximidad de la glándula emite las fibras parasimpáticas que la inervan. Recientemente se ha comprobado en la rata que parte de las fibras parasimpáticas también

pueden venir a través del nervio lingual, rama del trigemino ( 62 ).

La misión que pueden cumplir estos sistemas es muy variada. Unas veces activan unos órganos y otras pueden inhibirlos. Otras veces los órganos están controlados por los dos sistemas, pudiendo actuar de manera complementaria o contraria, uno activa y el otro inhibe, o sinérgica. Este último es el caso de las glándulas salivales, en las que, al estimular el sistema simpático y parasimpático a la vez, se produce mayor cantidad de secreción que por separado.

La característica principal del sistema nervioso autóno es la forma de transmisión del impulso que presenta. Fue uno de los adelantos más importantes del primer tercio de este siglo. Los descubrimientos iniciales de mayor importancia fueron los de Otto Loewi, Walter B. Lammon y Henry H. Dole. Estos autores identifican los productos que se eliminan durante la estimulación del sistema, estableciendo la naturaleza química de la transmisión. Así, las neuronas preganglionares del sistema nervioso simpático y parasimpático segregan acetilcolina, las fibras postganglionares del sistema nervioso simpático, noradrenalina y las del parasimpático, acetilcolina. Estas reglas no son del todo ciertas pues hay ciertas fibras que difieren. No obstante, estas características hicieron a Dole denominar a las fibras que segregan acetilcolina como fibras colinérgi

cas y fibras adrenérgica a las que segregan noradrenalina.

Estos productos químicos son los que actúan sobre las células produciendo el efecto. Por lo tanto se piensa que el neuromediador tiene que unirse de alguna manera a la célula diana antes de actuar. Estos lugares de unión son los que se denominan receptores. Este concepto, aunque muy distinto del actual fue introducido por primera vez por Langley en 1.905 ( 75 ). Posteriormente Alquist en 1.948 introduce un nuevo concepto, observó que los efectos de los medicamentos simpaticomiméticos, noradrenalina, adrenalina e isoproterenol, sobre el músculo liso pueden ser distintos, excitación o inhibición. Esto le hizo suponer la existencia de dos tipos distintos de receptores, él los denominó  $\alpha$  y  $\beta$ , donde las catecolaminas puedan actuar selectivamente sobre uno u otro y producir efectos dispares. Esta idea se aplica posteriormente a otros órganos, al constatar los efectos de bloqueo selectivo de los impulsos nerviosos adrenérgicos unas veces a nivel de los receptores  $\alpha$  y otras de los  $\beta$ . Pero el problema se complica al comprobar que los receptores  $\beta$  de los diferentes órganos tienen distinta sensibilidad a sus bloqueantes y estimulantes. Esto es suficiente para tener que diferenciar dos subtipos: el  $\beta_1$  y el  $\beta_2$ .

Estos conceptos se pueden transferir a las glándulas salivales. Se ha comprobado la existencia de receptores  $\alpha$  y  $\beta$ . La estimulación del primero produce un incremento en la secreción de agua y potasio y la del segundo aumenta la cantidad de amilasa.

En la actualidad no se conoce bien la estructura o localización de estos receptores en la membrana celular. Lo único que se conoce son los efectos producidos por los fármacos en el metabolismo celular. Se sabe que la adrenalina aumenta la acumulación de A M P cíclico, intracelular al activar, por un receptor  $\beta$ , una enzima ligada a la membrana, la ademilato ciclasa, que cataliza la conversión de A T P a A M P cíclico. Este último desencadena una serie de modificaciones intracelulares que producen los efectos metabólicos característicos de las catecolaminas y probablemente sean la causa de muchos de sus efectos farmacodinámicos ( 98, 99 ).

### 1. Farmacología de la noradrenalina e isoproterenol

=====

De todo el conjunto de fármacos con acción sobre el sistema nervioso autónomo, estudiaremos los dos productos objeto de nuestro trabajo, la noradrenalina y el isoproterenol.

La noradrenalina, también llamada norepinefrina o lararterenal, es el mediador químico que se libera en los nervios postganglionares. Químicamente, difiere de la adrenalina por carecer del grupo metilo en el amino. Actúa principalmente en los receptores  $\alpha$ , siendo escaso el efecto sobre los  $\beta$ . Es menos efectiva que la adrenalina en los receptores  $\alpha$ . En el organismo produce un aumento de la presión diastólica y sistólica, y del volumen sistólico, pero sin alterar el volumen minuto. La resistencia periférica se eleva por vasoconstricción.

El isoproterenol o isoprenalina es la más activa de las aminas simpaticomiméticas y obra casi exclusivamente a nivel de los receptores  $\beta$  debido al grupo N isopropilo que presenta en su estructura. Sus efectos se producen principalmente sobre el corazón, músculo liso de los bronquios, vasos de los músculos esqueléticos y conducto gastrointestinal. Disminuye la presión arterial por vaso dilatación periférica.

## 2. Inervación de las glándulas salivales

Las glándulas salivales reciben inervación de -  
ambos sistemas, simpático y parasimpático. El patrón  
de inervación difiere según las especies y dentro del  
animal según la glándula de que se trate y del estado  
de desarrollo que presente. Las fibras acceden a la -  
glándula por el hilio y sigue la trayectoria de los -  
vasos sanguíneos hasta llegar al lugar de inervación.  
La microscopia electrónica muestra que la gran mayo--  
ría son fibras nerviosas amielínicas y escasas las -  
mielínicas. El axon en su recorrido presenta dilata-  
ciones alternando con zonas adelgazadas. Las dilata-  
ciones contienen algunas mitocondrias y vesículas de  
pequeño y gran tamaño, estas últimas contienen un cen-  
tro denso. Las fibras colinérgicas o adrenérgicas ca-  
minan juntas en el mismo haz. La inervación afecta no  
sólo a la porción secretora, sino también a la excre-  
tora y a las células mioepiteliales, de ahí su comple-  
jidad.

A continuación estudiaremos los tipos y lugares  
de inervación, haciendo mención especial a la de la -  
rata.

a). Sinapsis

Estas son unas dilataciones del axon que contiene algunas vesículas y una o dos mitocondrias. Las sinapsis se clasifican en dos tipos dependiendo si penetran o no en la membrana basal del acino ( 47, - 48 ).

El tipo denominado epilemmal se encuentra adyacente a una célula parenquimatosa, pero separada de ella por la membrana basal. El tipo hipolemmal no tiene interpuesta la membrana basal. Cada axon produce gran número de sinapsis a lo largo de todo el recorrido. La zona de la célula más próxima a la sinapsis no tiene ninguna característica ultraestructural diferencial, aparte quizás de algunas cisternas del retículo endoplásmico situadas a ese nivel y paralelas a la membrana basal ( 58 ). Puede ocurrir que una célula parenquimatosa tenga más de una fibra nerviosa en contacto y por el contrario no es necesario que todas las células parenquimatosas estén necesariamente innervadas. Por tanto se cree que el estímulo puede transmitirse de una a otra.

b). Inervación de la porción secretora

La glándulas salivales presentan una rica inerva

ción en las porciones secretoras ( 45 ). La sinapsis puede ser tanto de tipo hipolemmal como epilemmal. Según Scott y Pease (105) el primer tipo se da sólo en la glándula parótida y sublingual de la rata, por tanto la glándula submaxilar sólo presenta inervación de tipo epilemmal. El tipo de sinapsis hipolemmal suele presentarse en las fibras colinérgicas. La profundidad que este tipo de fibra penetra en el acino es muy variable. Cuando se observa, sólo establece sinapsis con la célula serosa y no con la mucosa.

Hay que ver que tipo de inervación presenta la glándula submaxilar de la rata. Ciertos autores demuestran con la técnica de inmuno fluorescencia un abundante plexo adrenérgico en la parótida y submaxilar ( 91 ). Posteriormente otros autores con técnicas histoquímicas comprueban que las glándulas submaxilar y sublingual son muy ricas en fibras colinérgicas postganglionares, que forman una red alrededor de las porciones secretoras ( 45, 18, 17). Garrett ( 45 ), afirma que aproximadamente dos tercios de las fibras de las glándulas son adrenérgicas y el resto colinérgicas y que la inervación de la porción secretora no es algo estable, sino que puede variar a lo largo de la vida del animal.

La importancia fisiológica de un tipo de sinapsis - epilemmal o hipolemmal es todavía un enigma. Lo único que podemos afirmar es que ambos tipos son suficientes para regular la actividad secretora de la célula parenquimatosa.

c). Inervación de la porción excretora

Desde que se supo que los conductos excretores de las glándulas tenían también su función secretora se pensó en la posibilidad de que estuviesen inervados. Por los estudios de Lundvall ( 80 ) se sabe que la estimulación nerviosa producía una despolarización en la membrana basal del conducto estriado de la glándula submaxilar de la rata. Posteriormente se demostró que drogas simpaticomiméticas y parasimpaticomiméticas tenían influencia en el recambio electrolítico. Por lo tanto, esto nos hace pensar que la porción excretora debe tener su inervación. Estos datos fisiológicos se ven corroborados mediante estudios histoquímicos en los cuales se observan la existencia de fibras colinérgicas y adrenérgicas en los conductos excretores ( 46, 91 ).

d). Inervación de las células mioepiteliales

Al estar las células mioepiteliales en íntima - conexión con las células secretoras es inevitable que la sinapsis tipo epilemmal también les afecte. En el tipo hipolemmal, observaciones hechas al microscopio electrónico han demostrado que pueden inervar las células mioepiteliales.

e). Inervación vascular

Existen evidencias morfológicas de que en las arteriolas de las glándulas salivales existen sinapsis adrenérgicas y colinérgicas, las cuales mantienen el tono de los vasos. En la glándula submaxilar de la rata la inervación predomina sobre todo en las arteriolas. Las vacuolas están raramente inervadas ( 126 ). Este dato está en contradicción por lo afirmado anteriormente por Norberg y Olson ( 91 ). Estos autores describen la misma intensidad de inervación para las arteriolas, vacuolas y anastomosis arterio-venosas.

58 bis

---

---

## II. MATERIAL Y METODO

---

---

## II. MATERIAL Y METODO

### A. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Para llevar a cabo este trabajo, hemos empleado treinta y cinco ratas Wistar adultas, machos, con un peso aproximado de 350 grs., procedentes del animalario del Hospital Clínico San Carlos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Madrid. Este tipo de animales fue escogido por haber sido usado ampliamente en trabajos anteriores, facilidad de manejo, bajo costo, anatomía perfectamente estudiada, facilidad de realizar la técnica de perfusión para microscopio electrónico. No obstante, tienen un ligero inconveniente y es la dificultad de abordaje al ganglio cervical superior. Para superar esto, realizamos una primera fase en la cual experimentamos la mejor vía de abordaje y adquirir el hábito quirúrgico necesario. La duración de la fase experimental en sí fue de tres meses aproximadamente. Se trabajaba diariamente con un animal, si fallaba algo la técnica volvía a ser repetida.

Los animales fueron divididos en cuatro grupos. El primero de cinco animales y los tres restantes de

diez animales cada uno.

GRUPO I constituido por cinco ratas. Se les estirpó la glándula submaxilar derecha para el estudio con un microscopio óptico. Posteriormente son perfundidas vía intracardiaca para el estudio con microscopio electrónico y se les estirpa la glándula submaxilar izquierda.

GRUPO II constituido por diez ratas y subdividido en dos subgrupos de cinco animales cada uno. Al Grupo II-A se le estirpa el ganglio cervical superior izquierdo. A los diez minutos se extraen ambas glándulas submaxilares para el estudio con microscopia óptica. Al Grupo II-B diez minutos después de la extirpación del ganglio se perfunde vía intracardiaca y se extraen ambas glándulas submaxilares para el estudio con microscopio electrónico.

GRUPO III constituido por diez ratas y subdividido en dos subgrupos de cinco animales cada uno. Al Grupo III-A se le estirpa el ganglio cervical superior para inmediatamente después inyectar intraperitonealmente una solución de isoproterenol sulfato a una concentración de dos miligramos por centímetro cúbico de disolvente (suero fisiológico). A los diez minutos se extraen ambas glándulas submaxilares para el estudio con

microscopia óptica. Al Grupo III-B se procede de -  
igual manera sólo se diferencia en que a los diez mi  
nutos se perfunde via intracardiaca y se extraen am-  
bas glándulas submaxilares para el estudio con microsco  
pio electrónico.

GRUPO IV constituido por diez ratas subdivididas en  
dos subgrupos de cinco animales cada uno. Se opera -  
exactamente igual que en el Grupo III, con la diferenci  
a que la sustancia administrada intraperitonealmente  
es una solución de noradrenalina en suero fisiológico  
a una concentración de cuatro gramos por centímetro -  
cúbico.

## B. GLANDULA ESCOGIDA

De las tres glándulas mayores existentes en la -  
rata escogimos la glándula submaxilar. Se encuentra -  
situada de forma bien visible en la región cervical -  
en una posición ventral, a ambos lados de la línea me  
dia y debajo de la piel. Lleva adosada en uno de sus  
polos, el más cervical, la glándula sublingual, de -  
tal forma que a simple vista se las confunde como una  
sola glándula. Se diferencian por el color más oscuro  
de la glándula submaxilar y por los conductos excreto  
res que se encuentran separados. No obstante, para ma  
yor seguridad en nuestro trabajo siempre procuramos -  
extirpar el polo más caudal de la glándula.

### C. SUSTANCIAS EXPERIMENTALES

Teníamos que escoger unas sustancias con acción simpaticomiméticas, una estimuladora de los receptores  $\alpha$  y otra de los  $\beta$ . Tendrían que ser solubles y fáciles de dosificar para su administración por vía intraperitoneal. El efecto farmacológico debía de ser rápido y que actuase en las glándulas salivales. La acción debería ser exclusiva a nivel postsináptico, con el fin de impedir la liberación de noradrenalina y demás compuestos en las glándulas suprarrenales. Por todo esto escogimos el isoproterenol como estimulante de los receptores  $\alpha$  y la noradrenalina para los  $\beta$ .

La noradrenalina nos la proporcionó la casa "Schering". Es un producto comercial ampliamente usado en la clínica y conocido con el nombre de "Reargon". Su presentación comercial es en ampollas y a una concentración de 1 mgr./c.c.. Para nuestro uso disolvimos una ampolla en 250 c.c. de suero fisiológico con lo que conseguimos una concentración de cuatro gramos/c.c.. Se administró a los animales por vía intraperitoneal en una sola dosis, de 2 gammas /100 grs. de peso.

Para el isoproterenol nos fue proporcionado por la casa "Boehringer Sohn " el principio activo del medicamento "Aleudrina", el isoproterenol sulfato en polvo. Conseguimos mediante dilución del producto en suero fisiológico, una concentración de 2 mgr./c.c. administrándose a las ratas una dosis de 2 mgr./100 grs. de peso.

#### D. TECNICA QUIRURGICA

La rata una vez elegida es pesada y posteriormente anestesiada en campana con eter sulfúrico. Se consigue una anestesia superficial, suficiente para inyectar intraperitonealmente 2 c.c. de nembutal a una concentración de 4 mgr./c.c. como dosis inicial, que al ser sedante tiende a relajar al animal. Esta cantidad era suficiente para el inicio de la técnica quirúrgica, si ésta se prolongaba excesivamente se le daban dosis de medio a un centímetro cúbico del preparado, dependiendo de la recuperación del animal. Este anestésico nos permite la realización de la técnica quirúrgica sin dificultad.

Conseguida la anestesia, realizamos la técnica quirúrgica. Esta consta de tres apartados: extirpación de la glándula submaxilar, extirpación del ganglio simpático cervical superior y perfusión intracardiaca para fijación de microscopia electrónica.

Para la extirpación de la glándula submaxilar el animal se coloca en la mesa de operaciones en posición supina. La incisión comienza a nivel del reborde inferior de la mandíbula, cerca del labio inferior. Desde aquí sigue la línea media hasta el torax y al llegar a la altura de los miembros superiores se divide a am-

bos lados. Se separan ambos colgajos de piel del teji  
do celular subcutáneo y aparecen las dos glándulas sub  
maxilares a ambos lados de la línea media. Su colora-  
ción amarillenta más oscura las distingue de la glándu  
la sublingual situada en el polo cervical. Se extirpa  
el polo más caudal de la glándula. Para realizar la -  
simpactectomia realizamos la extirpación del ganglio  
cervical superior porque además de ser la técnica más  
usada (Asking y Ekstron ; (6) Ekstron (36), Wilborn  
y Schneyer (125), Almugren y DeHlstron (3) ; Garrett  
y Thulin (54) la consideramos la más efectiva, fia--  
ble y de mejor comprobación.

Para ello se utiliza el mismo campo operatorio ex  
puesto al realizar la incisión para extirpar la glándu  
la submaxilar. Se levanta la aponeurosis que cubre la  
musculatura superficial. Separamos la glándula submaxi  
lar y sublingual, así como la vena yugular externa y -  
sus ramas facial posterior y anterior hacia el lateral.  
Córto la aponeurosis y separo el músculo estenohiódeo.  
por dentro y estenomastoidco por fuera. Visualizamos -  
la traquea en la línea media y adosada a ella la arte-  
ria carótida bifurcándose en dos ramas, externa e in--  
terna. El ganglio se encuentra en esta bifurcación pe-  
ro por detrás. Para su extirpación hemos de levantar -  
el paquete vascular. Aparece como una formación alarga  
da y blanquecina, siendo separada cuidadosamente. Esta

fase es realizada con lupa de tres aumentos. El ganglio es remitido para su estudio histológico a fin de comprobar si corresponde a la estructura que buscamos.

Para la perfusión vía intracardiaca utilizamos el siguiente preparado:

Paraformaldehido -----	5 grs.
A.D. -----	200 c.c.
Sosa I N -----	4 abgotas
Glutaraldehido -----	20 c.c.
Bufferfosfato 0'4 M, ph 7'2 -----	150 c.c.
Clca 0'5% -----	2 c.c.
A.D. -----	Hasta 500 c.c.

Esta solución fijadora es ampliamente usada para la perfusión del sistema nervioso (Merchan y Colaboradores 87) . Con ella conseguimos una perfusión inmediata de las glándulas salivales evitando la degeneración de los gránulos del acino. Esta solución se coloca a un metro de altura de la mesa de operaciones, con el fin de conseguir suficiente presión para perfundir todo el animal. Realizamos una toracotomia e introducimos a través del ventrículo izquierdo en la aorta la canula por donde fluirá todo el líquido. Una vez conseguida la fijación se procede a la toma de las glándulas salivales.

#### E. TECNICA MICROSCOPIA OPTICA

La pieza extirpada es fijada en formol al 10% y procesada según el procedimiento rutinario de inclusión en parafina. Se realizan cortes de 4 a 5 micras con microtano Leitz. Por cada glándula extirpada se obtienen cuatro preparaciones. Son teñidas: una con la técnica de rutina, hematoxilina-eosina, otra con la técnica de PAS, otra con la técnica de azul-alcian y la última con la técnica PAS-azul alcian. Estas tres últimas se realizan a ph 2'5. Los cortes histológicos son observados con un microscopio Zeiss, valorándose los resultados y obteniéndose fotografías de interés.

#### Método Azul Alcian según Mowry

- 1º. Desparafinar y lavar con agua destilada.
- 2º. Tratar tres minutos con la solución lavadora.
- 3º. Teñir con azul alcian ph 2'5 durante 30 minutos.
- 4º. Lavar con la solución lavadora de 5 a 10 segundos.
- 5º. Lavar con agua destilada tres veces durante 1 ó 2 minutos.
- 6º. Contrateñir con rojo nuclear 5-6 minutos.
- 7º. Lavar, deshidratar y montar.

\* Reactivos:

- Lavador: es una solución de ácido acético en agua  
ph 2'5 se prepara con:

- . ácido acético ----- 3 ml.
- . agua destilada ----- 97 ml.

- Colorante:

- . azul alcian 8 GS -- 1 grs.
- . Solución lavadora - 100 ml.

Disolver agitando o filtrar a las 24 h.

- Rojo Nuclear:

- . Sulfato de Al ----- 5 grs.
- . Agua destilada ----- 100 ml.

Disolver calentando y añadir 0'1 grs. de rojo nuclear. Hervir 2 minutos, enfriar y filtrar a las 24 h.

Método PAS (periodic Acid Schiff) Mc. Manus

- 1º. Desparafinar y llevar al agua.
- 2º. Tratar con ácido periódico 1% durante 10 minutos.
- 3º. Lavar 5 minutos en agua destilada.
- 4º. Cubrir con Schiff (Merck) durante 10 minutos.
- 5º. Lavar en agua destilada durante 5 minutos.

6º. Contrateñir si se desea deshidratar y matar.

Método PAS y Azul Alcian ph 2'5

- 1º. Desparafinar y lavar en agua destilada.
- 2º. Tratar 3 minutos con la solución lavadora.
- 3º. Teñir con azul alcian ph 2'5 durante 30 minutos.
- 4º. Lavar con la solución lavadora 5-10 segundos.
- 5º. Lavar con agua destilada tres veces durante 1 ó 2 minutos.
- 6º. Tratar con ácido periódico 1% durante 10 minutos.
- 7º. Lavar con agua destilada durante 5 minutos.
- 8º. Cubrir con Schiff (Merck) durante 10 minutos.
- 9º. Lavar con agua destilada durante 5 minutos.
- 10º. Contrateñir si se desea, deshidratar y montar.

## F. TECNICA MICROSCOPICA ELECTRONICA

Una vez realizada la perfusión y extirpada la pieza, se realizan bloques de un milímetro cúbico aproximadamente. Se fijan durante 90 minutos a 4° C con glutaraldehído 3'5% tampon fosfato (Sorensen 0'125 M, 440 m Os M/1, ph 7'4). Tras lavado en buffer, se realiza postfijación durante 90 minutos a 4° C en tetróxido de osmio al 2% en el mismo vehículo, y posteriormente un breve lavado en búffer acetato de veronal (Palade) ph 7'4. Los tejidos así tratados fueron postfijados en acetato de uranilo frío al 2% en acetona al 70% durante 24 h. en nevera. Esta solución se prepara en el momento de ser utilizada. Posteriormente se procede a la deshidratación acetónica con acetona 90° (tres pasos de 20 minutos), acetona 100° (dos pasos de 20 minutos) y acetona deshidratada (tres pasos de 20 minutos). Después los bloques son sometidos a la acción del óxido de propileno (dos pasos de 30 minutos) y se comienza la inclusión en Araldita. (Fluka). El primer paso de la inclusión, consiste en someter a los bloques a la acción del óxido propileno con Araldita I a partes iguales en estufa a 50°C dejándose los bloques 24h. en esta situación. Posteriormente se pasa el material a Araldita II, dos horas en estufa de 50°C y por último en un segundo baño de Araldita II, ya en las cápsulas de inclusión, donde se dejan en estufa de 70°C dos

días, antes de poder ser cortadas en el ultramicrotomo LB.

La preparación del Buffer se realiza de la siguiente forma:

\* Buffer Fosfato (Sorensen)

- . Fosfato monopotásico 1'36% 80 c.c.
- . Fosfato disódico 1'78% 420 c.c.

Validez siete días a 4°C

\* Buffer Acetato de Veronal

- . Solución A Acetato Sódico 1'904%
- . Solución B Veronal Sódico 2'58 %
- . Solución C Acido Clorhidrico 0'1 N

Para preparar el buffer se mezclan en el momento de su uso: solución A 10 c.c.

solución B 10 c.c.

solución C 10 c.c.

agua destilada 20 c.c.

Se ha de comprobar el ph a 7'2 con papel de ph, -  
sinó está en 7'2 se ajusta con la solución B o la solución C. Las soluciones madre se guardan en la nevera.

Del material incluido en araldita se realizan cortes ultrafinos de color de interferencia gris-plateado, se montan para su estudio electro-microscópico en rejillas de 200 mesh , sin soporte fílmico, siendo por último los cortes ultrafinos contrastados con citrato de plomo.

Preparación de la solución de plomo según Reynold's

- . Citrato Sódico Deshidratado ----- 1'76 grs.
- . Nitrato de Plomo ----- 1'33 grs.
- . Agua Destilada ----- 30 c.c.

Agitar durante 30 minutos, añadir Sosa IN hasta ph 12.

Validez de seis meses a temperatura ambiente.

Los cortes fueron observados en un microscopio electrónico Siemens, modelo " El Miskop 102". que proporciona una resolución máxima del orden de 2 A°. Para la fotografía se utiliza la placa "Scientia" de 65 x 9 fabricada por la casa Agfa-Gevaert. Una vez positivos los negativos se realiza estereometría de los granulos de secreción de las células acinares mediante el aparato MOP modelo AM/03 de la casa Koutron.

73 5/8

---

---

### III. RESULTADOS

---

---

### III. RESULTADOS

#### A. MICROSCOPIA OPTICA

La glándula submaxilar es de tipo tubuloacinar está constituida por los siguientes elementos: acinos, conductos intercalados, conductos granulares, conductos estriados y conductos excretorios. Nuestro estudio se va a circunscribir a una sola de estas estructuras: el acino.

Los acinos contienen células seromucosas con características intermedias entre el tipo seroso y el mucoso. Muestran una gran variedad de tamaño, forma y número de células que contiene. La forma puede ser circular, ovoide o poligonal. Las células son de contorno triangular con la base más ancha que el ápice. El núcleo es prominente y elíptico, y está situado en la porción basal de la célula. El citoplasma es basófilo, apreciándose sobre todo a nivel apical granulaciones muy finas (Fig. 1 y 2).

Esta conformación del acino de la glándula submaxilar que hemos descrito nos sirve perfectamente

para la descripción de todos los grupos. En estos niveles no hemos constatado diferencias significativas especiales del PAS, azul alcian y PAS-azul alcian se han encontrado cambios en la coloración del citoplasma. Los datos aportados por estas técnicas están configurados en la Tabla I. En ella observamos que los grupos II-B, III-A y III-B presentan unas características similares entre sí y diferentes de los restantes grupos. Pero estas aptencias tintoriales en estos dos grupos no se dan con la misma intensidad en todas las células. Existen zonas que cumplen con la norma y otras que se parecen más al grupo de control. El grupo II-A presenta unas características intermedias entre los grupos II-B y III-A y B. El grupo IV es el más parecido al grupo de control salvo en una tinción más positiva para el azul alcian.

## B. MICROSCOPIA ELECTRONICA

### 1. Valoración de los resultados =====

Para un mejor estudio de los resultados obtenidos en nuestro trabajo no sólo hemos hecho una valoración descriptiva sino también cuantitativa. Estudiamos los cambios sufridos en la secreción de la glándula submaxilar ante una serie de estímulos. De todos los componentes de la célula acinar el más representativo es el gránulo de secreción. Por tanto, hemos realizado la medición de las áreas y de los diámetros en todos los grupos y obtenido la media y la T de Student. Los valores obtenidos son reflejados en los gráficos 1, 2 y 3. En los dos primeros consideramos la totalidad de los gránulos de la célula, la gráfica 1 para las áreas y la gráfica 2 para los diámetros. La gráfica 3 se consideran los gránulos totales y los gránulos con inclusiones sólo para los grupos en los cuales éstos últimos se daban con valores significativos desde el punto de vista estadístico.

Si comparamos los datos que nos ofrecen las gráficas a simple vista no obtendremos valores significativos para las conclusiones. Por tanto, para que estas comparaciones tengan valor científico hemos utilizado de nuevo el cálculo estadístico. Aplicamos

T-test para datos independientes y muestras  $N < 30$  en comparación de medias normalidad de varianza, los resultados se describen para un  $P < 0'005$  siendo los P mayores no significativos (N.S.) y los P menores se representan por su valor en las tablas. Así en la Tabla II efectuamos la comparación de las medias de las áreas y en la Tabla III de los diámetros de los gránulos totales de cada uno de los grupos. En la Tabla IV se comparan las áreas y los diámetros de los gránulos con inclusiones de los distintos grupos.

Estos cálculos comparativos también son realizados para los grupos con gránulos con inclusiones en contraposición a los gránulos totales del mismo grupo. En estos casos comparamos muestras agrupadas y aplicamos el T-test para los mismos, trabajando al nivel 0'05 y describiendo los resultados como en el caso anterior. Los resultados quedan reflejados en la Tabla V tanto para las áreas como los diámetros.

## 2. Grupo I =====

Describiremos a continuación la configuración ultraestructural de los acinos ya estudiados previamente con microscopia óptica. El estroma se encuen--

tra constituido por capilares sanguíneos (Fig. 3), gran cantidad de fibras colágenas y terminaciones nerviosas. Entre estas estructuras no es raro observar la presencia de células plasmáticas, linfocitos y macrófagos. Las terminaciones nerviosas contienen vesículas sinápticas de diferentes tamaños en su interior.

La célula acinar presenta una polaridad manifiesta en su ultraestructura, con una porción basal y una apical que conforman la luz del acino (Fig. 4). Este espacio en muchas ocasiones está ocupado por un material filamentososo e irregular. La membrana plasmática presenta características peculiares dependiendo de la zona estudiada. Su porción basal, en contacto con la lámina basal o con una célula mioepitelial, presenta un contorno sinuoso, sin interdigitaciones. Solamente cambia este aspecto en algunas zonas en contacto con una célula mioepitelial (Fig. 3). En ésta presenta un espacio claro separando ambas células hacia el cual protruyen evaginaciones de la membrana de igual manera que microvellosidades. La porción apical es irregular con evaginaciones. La membrana lateral, en su porción apical, presenta un típico complejo de unión, con su zona ocludens, zona adherens y desmosomas. Debajo de esta estructura se incrementan las invaginaciones de la membrana. A una altura media de la

célula las membranas laterales de dos células adyacentes se separan, formando la luz de un canalículo. No se diferencian de la luz del acino, excepto por su menor tamaño y situación más periférica. Ya en la proximidad de la porción basal, la membrana lateral vuelve a presentar interdigitaciones y contorno sinuoso (Fig. 4).

El núcleo de la célula se encuentra situado en el tercio basal. Su forma es redondeada, con la membrana de contorno sinuoso, sin invaginaciones. El nucleolo es prominente, inmerso en la cromatina laxa. La cromatina densa se encuentra situada en la periferia del núcleo en contacto con la membrana (Fig. 3).

El retículo endoplásmico es rugoso y muy abundante. Se dispone alrededor del núcleo más en su porción basal. Lo constituyen cisternas paralelas, con un recorrido sinuoso y un contenido de la misma densidad que el citoplasma. La membrana externa se encuentra recubierta por ribosomas. En dos casos de los estudiados el retículo presentaba unas cisternas ensanchadas, más irregulares y con un contenido claro en su interior (Fig. 5).

El aparato de Golgi es muy prominente y de localización basal. Lo forman cisternas más o menos irre-

gulares, agrupadas en número de cuatro a cinco. En sus extremos se encuentran algunas vesículas de contenido claro. En todo el citoplasma pueden contabilizarse de cuatro a cinco unidades del aparato de Golgi (Fig. 4).

Dispersos por todo el citoplasma se encuentran gran cantidad de ribosomas libres o agrupados. Las mitocondrias son escasas y se encuentran localizadas en la porción basal y central de la célula. Sólo ocasionalmente se pueden observar otras estructuras como vesículas con figuras de mielina en su interior (Fig. 6). También a veces se pueden observar a nivel apical algunos microfilamentos.

Pero la estructura característica y predominante de estas células son los gránulos de secreción. Estos ocupan todo el tercio medio y apical de la célula. Estas formaciones son redondeadas de tamaño regular y uniforme rodeadas de una membrana y con cierta tendencia a la fusión con los gránulos adyacentes.

El contenido de estos gránulos lo constituye un material finamente granular que le da un aspecto grisáceo en la fotografía ultraestructural. Este granulado en ocasiones es prominente (Fig. 3 y 4) y en otras no, teniendo el gránulo un contenido más homo-

géneo (Fig. 5). En muy raras ocasiones el contenido toma un aspecto granular más denso destacando del resto, no pudiendo ser contabilizados desde el punto de vista estadístico por su escasa frecuencia (Fig. 6).

Al igual que en todos los grupos se han realizado mediciones cuyos resultados quedan reflejados en las gráficas 1 y 2. Estos resultados son para las áreas de  $0'43 \pm 0'05$  micras cuadradas y para los diámetros de  $0'76 \pm 0'05$  micras. Estas medidas si las comparamos con los grupos restantes no se diferencian en gran medida, excepto con el grupo IV, según reflejan las Tablas II y III, y con el grupo II si comparamos los diámetros, pero no al comparar las áreas.

Esta célula que acabamos de describir no es la única. Situada entre ellas observamos otro tipo. Su tamaño es menor que el de la célula acinar, su forma es redondeada o alargada y estrecha. Su característica principal es la presencia de unos gránulos de igual o mayor tamaño que los antes descritos, con un contenido homogéneo, muy denso, opaco al haz de electrones (Fig. 5). El citoplasma tiene escasez de organelas, su núcleo se encuentra cerca de la lámina basal, el retículo endoplásmico es rugoso y con cisternas dilatadas.

El último tipo de célula existente es la célula mioepitelial. Está situada entre la célula acinar y la lámina basal. Presenta dos zonas, la que contiene al núcleo y las prolongaciones (Fig. 4). La primera además del núcleo contiene la mayoría de las organelas citoplásmicas y hace prominencia en el acino. El retículo endoplásmico es escaso, rugoso y con cisternas dilatadas. El aparato de Golgi no es prominente. Las mitocondrias son escasas. Las prolongaciones contienen gran cantidad de microtúbulos y filamentos. Estas prolongaciones con gran frecuencia se introducen entre dos células acinares. La membrana plasmática en estrecho contacto con la lamina basal es lisa, a diferencia de la opuesta que en gran número de ocasiones presenta invaginaciones y un espacio claro que la separa de la célula acinar.

### 3. Grupo II-A =====

Este grupo está constituido por glándulas salivales normales pero en el lado contralateral se ha realizado la extirpación del ganglio cervical superior. A grandes rasgos las características ultraestructurales de las células acinares no difieren de las estudiadas en el grupo precedente. Donde sí pode

mos constatar diferencias en los gránulos. Estos tienen una mayor tendencia a la fusión, suelen aparecer dos o tres gránulos unidos por una brecha (Fig. 7, 8, 9). El contenido de los gránulos no difiere del descrito en el grupo de control, finamente granular y más o menos homogéneo (Fig. 7 y 9). Pero existen en dos de los casos estudiados células cuyos gránulos presentan unas inclusiones que se destacan con nitidez del contenido. Están replegadas contra la membrana del gránulo y pueden ser granular, que es la forma más frecuente, o de tipo laminar. La forma granular es más nítida que la laminar (Fig. 8). Esta disposición de los gránulos aunque se ha comprobado en dos de los casos, no podemos considerarlos desde el punto de vista estadístico por su escasa frecuencia.

Los datos estereométricos de los gránulos totales de este grupo son para las áreas  $0'44 \pm 0'10$  micras cuadradas y para los diámetros de  $0'8 \pm 0'06$  micras (Gráficas 1 y 2). Como se observa en las Tablas II y III estos datos no tienen diferencias significativas con ninguno de los grupos excepto con el IV y para los diámetros hay una diferencia con el grupo III y con el grupo I, pero no al comparar las áreas.

Las células mioepiteliales presentan unas características similares a las descritas para el grupo -

precedente. Las células de granos oscuros se ha observado en dos ocasiones. Se encuentran replegadas en la membrana basal, con gránulos más abundantes y de menor tamaño que el grupo anterior. El citoplasma presenta unas características similares al grupo I. En una de las ocasiones la célula parece estar en contacto con la luz del acino, pero sin observarse signos de excreción (Fig. 9).

#### 4. Grupo II-B =====

Las características ultraestructurales de este grupo de glándulas, a las que se le han extirpado el ganglio cervical superior, no difieren mucho de las descritas para el grupo primero. Así el aparato de Golgi, retículo endoplásmico, mitocondrias y membrana plasmática son similares. Donde sí se encuentra la diferencia es en los gránulos, pero no en el tamaño sino en el contenido. Las medidas cuantitativas realizadas para los gránulos totales se reflejan en las Gráficas 1 y 2, con los siguientes valores: para las áreas de  $0'47 \pm 0'04$  micras cuadradas y para los diámetros  $0'82 \pm 0'07$  micras. Estos valores si los comparamos con los demás grupos sólo presentan diferencias significativas con el IV y con -

el III-B para las áreas y para los diámetros y solamente para los diámetros con el grupo IV (Tablas II y III). La diferencia más significativa es la presencia de gránulos con inclusiones en todos los casos estudiados. Estas inclusiones se presentan de distintas formas, en una de ellas consisten en un punteado propiamente que destaca ligeramente del resto del contenido del gránulo (Fig. 10). Esta disposición es similar a la descrita en los grupos precedentes aunque más abundante. En otras ocasiones el punteado es mucho más prominente y nítido y ocupa una porción central o en uno de los extremos de los gránulos (Fig. 10 y 11). Por último en otros casos las inclusiones son láminas alargadas de disposición paralela. Esta forma de presentación es la menos frecuente y para nosotros consideramos que estos dos tipos de inclusiones son la misma que varían de acuerdo a la dirección del corte realizado a la glándula (Fig. 11). Los valores de las medidas de los diámetros y las áreas se han incluido en la Gráfica 3 acompañados de los valores de los gránulos totales. Los valores son para las áreas  $0'63 \pm 0'30$  micras cuadradas y para los diámetros de  $0'97 \pm 0'17$ . Si comparamos con los datos obtenidos para los gránulos totales de este mismo grupo según la tabla V, no existen diferencias significativas. Si comparamos con los gránulos con inclusiones de los grupos III-A y III-B solamente hay diferencias con el grupo III-B (Tabla IV).

Las células mioepiteliales en este grupo son más prominentes, el citoplasma contiene mayor número de filamentos (Fig. 12). El tipo celular del gránulo oscuro se observa en uno solo de los casos (Fig. 12), con un número más reducido y de menor tamaño de los gránulos.

##### 5. Grupo III-A =====

Este grupo lo constituyen las glándulas estimuladas con isoproterenol y la glándula contralateral es simpatectomizada. Las células acinares están más separadas unas de otras a modo de dehiscencias intercelulares, el espacio intermedio está ocupado por gran cantidad de microvellosidades (Fig. 13, 14 y 15). Esta separación se presenta no sólo en la zona de contacto entre dos células acinares sino también con la célula mioepitelial (Fig. 15) y suele llegar hasta una altura media de la célula. El aparato de Golgi es muy prominente y el retículo endoplásmico rugoso ocupa mayores zonas del volumen celular. Con cierta frecuencia se observan vacuolas el contenidos remediando figuras de mielina (Fig. 13 y 15).

Los gránulos de secreción presentan unos valores reflejados en las gráficas 1 y 2, éstos son para las áreas de  $0'51 \pm 0'19$  micras cuadradas y para los diámetros de  $0'83 \pm 0'15$ . Estos datos si los comparamos con los datos de otros grupos sólo presentan diferencias significativas con el grupo IV (Tabla II y III). En este grupo también se presentan gránulos con inclusiones y en una proporción similar a la del grupo precedente. Existen zonas donde no aparecen y otras donde si son evidentes, que es lo más frecuente (Fig. 13 y 14). Las inclusiones presentan las mismas características descritas, solamente apreciamos que en ciertas áreas hay una tendencia más acusada a las inclusiones laminadas (Fig. 14).

Los valores estereométricos obtenidos para estos gránulos son para las áreas de  $0'77 \pm 0'26$  micras cuadradas y para los diámetros de  $1'04 \pm 0'23$  micras (Gráfica 3). Si comparamos estos con los obtenidos en los grupos II-B y III-B para gránulos con inclusiones sólo existen diferencias con el III-B (Tabla III). Si la comparación se realiza con los gránulos totales sí existen diferencias significativas (Tabla V).

Las células mioepiteliales son prominentes y a veces se introducen entre las células acinares no -

haciendo prominencia en la membrana basal. Las células de gránulos oscuros sí se han encontrado en casi todos los casos estudiados. Las características ultraestructurales son similares a las descritas. - Núcleo ocupando una gran parte del volúmen celular, citoplasma algo más abundante, cisternas de retículo endoplásmico rugoso dilatadas, esféricas. Los gránulos son más numerosos y de menor tamaño. Estas células pueden estar relegadas a la membrana basal o alcanzar la luz del acino. En una ocasión se ha constatado la presencia a nivel del conducto intercalado (Fig. 16).

#### 6. Grupo III-B =====

Las células acinares pertenecientes a este grupo presentan unas dehiscencias intercelulares entre sí más prominentes que en todos los demás grupos. - Estos espacios están ocupados por gran cantidad de microvellisidades (Fig. 17 y 18). Esta característica también se presenta en el área de contacto con la lámina basal del acino y con la célula mioepitelial (Fig. 20). El citoplasma de estas células presenta un retículo endoplásmico más abundante, así como un aparato de Golgi más prominente. Se observa

con frecuencia células binucleadas (Fig. 17 y 18).

Los gránulos de secreción totales presentan los siguientes valores para las áreas de  $0'37 \pm 0'12$  micras cuadradas y para los diámetros de  $0'71 \pm 0'14$  micras, reflejados en las gráficas 1 y 2. Si los comparamos con los datos obtenidos con otros grupos, tablas II y III, presentan diferencias significativas - para las áreas y los diámetros con los grupos II-B y IV-A y B y sólo para los diámetros con el grupo II-A. El dato más destacable es el incremento tan notable experimentado por los gránulos con inclusiones, no sólo en cuanto al número de células que los contienen, que son casi todas, sino al número de gránulos dentro de cada célula. De los gránulos totales la tercera parte aproximadamente presentan gránulos con inclusiones. Triplica el número que presentaban los dos grupos anteriores. Las características de las inclusiones son las mismas, en ciertas áreas se presentan inclusiones laminares (Fig. 17 y 18) y en otras son del tipo granular (Fig. 18 y 19), aunque a nuestro entender predominan algo más que en los grupos precedentes las inclusiones laminadas. Los valores estereométricos para estos gránulos son para las áreas de  $0'36 \pm 0'15$  micras cuadradas y para los diámetros de  $0'74 \pm 0'18$  micras, que se encuentran reflejados en la Gráfica 3 donde

se acompañan de los valores los gránulos totales del mismo grupo. Si comparamos estos datos con los obtenidos en los otros dos grupos para los gránulos con inclusiones, Tabla IV, sí existen diferencias significativas. Pero si la comparación se hace con los gránulos totales de este mismo grupo, no hay diferencias significativas (Tabla V).

Las células mioepiteliales son más prominentes que en el grupo anterior, presentando en el citoplasma mayor cantidad de filamentos (Fig. 20). Las células de granos oscuros se encuentran en casi todos los casos. Suelen estar replegadas hacia la lámina basal. Los gránulos son más abundantes que en los grupos precedentes (Fig. 20). En una ocasión observamos un tipo celular diferente, sus características citoplásmicas son similares a la célula de grano oscuro pero sin presentar dichos gránulos (Fig. 20).

#### 7. Grupo IV-A =====

Este grupo está constituido por las glándulas estimuladas con noradrenalina y cuyas glándulas contralaterales han sido simpatectomizadas. El estrama presenta unas terminaciones nerviosas mucho más pro-

minentes, se encuentran situadas fuera de la membrana basal como es lo característico de la glándula submaxilar de la rata. Presenta unas vesículas sinápticas de mayor tamaño y en ocasiones presenta una o varias inclusiones electrodensas en su interior (Fig. 22).

Las células acinares presentan un retículo endoplásmico no tan abundante como el grupo III y un aparato de Golgi también menos prominente. Las porciones laterales suelen estar más unidas, sin existir tanto espacio intermedio ni microvellosidades como en el grupo precedente (Fig. 21).

La luz de los acinos es mucho más prominente e irregular y con mayor número de microvellosidades. Su contenido es claro, homogéneo sin restos de membranas en su interior (Fig. 22, 24 y 25).

Los gránulos de secreción presentan los siguientes valores para las áreas de  $1'12 \pm 0'38$  micras cuadradas y para los diámetros de  $1'32 \pm 0'28$  micras (Gráficas 1 y 2). Si comparamos estos datos con los demás grupos se observa que existen diferencias bastante significativas, Tabla II y III. Son unos gránulos menores en número pero mayores en cuanto al tamaño. El contenido de estos gránulos es finamente granular y homogéneo (Fig. 21). Solamente en algunas zo

nas el granulado es más prominente (Fig. 22 y 24) e incluso hay una tendencia a la laminación (Fig. 22 y 25). Pero estas inclusiones son escasas y muy poco nítidas, destacan muy poco del contenido del gránulo. Se dan con poca frecuencia y no las hemos podido considerar desde el punto de vista estadístico.

Las células mioepiteliales son también prominentes con gran número de filamentos en su interior. A nuestro entender en ocasiones se presentan signos de contracción: como si hiciesen presión hacía el interior del acino (Fig. 23). En una ocasión llegan a producirse unas indentaciones profundas en la superficie de los acinos (Fig. 21).

Las células de granos oscuros se presentan en casi todos los casos. Presentan unos gránulos abundantes y con evidentes signos de secreción hacía la luz del acino (Fig, 24 y 25). El citoplasma es abundante, con cisternas dilatadas de retículo endoplásmico rugoso muy numerosas. En dos ocasiones de todos los casos estudiados hemos observado un tipo de célula de grano oscuro que difiere de lo que hemos descrito. Presenta unos gránulos de secreción mucho más abundantes, pero son pocos los que su contenido es totalmente opaco al haz de electrones. La mayoría presen-

tan un contenido también denso pero más claro, que le da en la microfotografía un tono gris oscuro.- Este célula está en contacto con la luz acinar, hacia la cual excreta sus productos de secreción (Fig. 26).

#### 8. Grupo IV-B =====

En este grupo también se observan unas terminaciones nerviosas prominentes en el estroma. Contienen unas vesículas sinápticas de tamaño parecido al grupo precedente, en cuyo interior pueden observarse una o dos inclusiones electrodensas (Fig. 28). Los acinos presentan una luz muy evidente, irregular, con microvellosidades y un contenido claro y homogéneo. Las células acinares presentan un retículo endoplásmico escaso y un aparato de Golgi poco prominente (Fig. 27).

Los gránulos de secreción presentan los siguientes valores para las áreas de  $1'1 \pm 0'34$  micras cuadradas y para los diámetros de  $1'26 \pm 0'19$  micras, que quedan reflejadas en las gráficas I y II. Si estos datos se comparan con el resto de los grupos se observa que existen diferencias significativas excep

to con respecto al grupo IV-A (Tabla I y II), pues son de mayor tamaño. El contenido de estos gránulos es finamente granular, homogéneo (Fig. 27 y 29). En ocasiones el contenido de los gránulos puede presentar una tendencia a la granulación o laminación, pero al igual que en el grupo precedente estas inclusiones destacan muy poco del resto del contenido (Fig. 28). Se dan con alguna mayor frecuencia que en el grupo IV-A pero sin poder considerarlos desde el punto de vista estadístico.

Las células mioepiteliales son prominentes con teniendo su citoplasma gran número de filamentos y unas cisternas de retículo endoplásmico rugoso más abundantes (Fig. 30). Pueden llegar a observarse al gunos signos de contracción de estas células, que producen una indentación en la célula acinar (Fig. 29), pero esto se da con menor frecuencia e intensi dad que en el grupo precedente. Estas células establecen áreas de contacto que en ocasiones desarrollan desmosomas con las células de granos oscuros (Fig. 27). Este tipo celular se puede encontrar en casi todos los casos. Su citoplasma es abundante con teniendo cisternas dilatadas de retículo endoplásmico rugoso. El número de los gránulos oscuros es también abundante. Estas células en casi todas las ocasiones están en contacto con la luz acinar, hacia

la cual parece que excretan el contenido de los gránulos (Fig. 27). En una ocasión observamos un tipo celular diferente, el cual presenta un citoplasma, con escaso retículo endoplásmico y algunas mitocondrias. Están replegadas hacia la membrana basal (Fig. 30). En otra ocasión se da un tipo celular de características similares, pero el citoplasma es más claro al paso del haz de electrones (Fig. 31).

=====  
IV. DISCUSSION  
=====

#### IV. DISCUSION

Para relatar este apartado con mayor claridad, hemos variado la sistemática usada en los resultados. La discusión no se hará siguiendo los grupos experimentales sino las estructuras acinares que se ven alteradas. Estas estructuras se han agrupado en tres órdenes distintos: células acinares, células mioepiteliales y células de granos oscuros.

##### A. CELULAS ACINARES

Los resultados, que sobre la estructura normal de las células acinares, aportamos en nuestro trabajo no difieren de los ofrecidos por los distintos autores (105, 116, 127). Como ya expusimos el dato que caracteriza a estas células entre las demás es la gran cantidad de gránulos de secreción que contiene. El problema que existe para realizar el estudio de esta estructura es que inmediatamente a la interrupción del flujo sanguíneo se produce la lisis (82). Este problema ha sido superado utilizando una técnica de perfusión intracardiaca del producto de fijación. Con esto conseguimos una fijación inmediata y total de la

glándula submaxilar y unos resultados de gran fiabilidad. Como prueba de esto las medidas que para las áreas y los diámetros obtenemos en los gránulos de secreción del grupo de control, ver gráficas 1 y 2, no difieren de los establecidos previamente por los autores (72).

Según diversos autores (82, 120) otro problema que podríamos encontrarnos es que dependiendo del tipo de fijador usado variará la apariencia del contenido de los gránulos de secreción. Hemos de tener en cuenta, que en nuestro trabajo usamos el mismo producto de fijación y bajo las mismas condiciones experimentales en todos los grupos, por lo tanto si surgen variaciones éstas no pueden ser achacables a esto sino a las alteraciones que producimos en nuestro trabajo. En condiciones de normalidad el contenido es para nosotros finamente granular y homogéneo, parecido al que describen los autores (116). Pero, al igual que describe Kanda (72) no todos los gránulos presentan el contenido con estas características. Hay que destacar que este autor utiliza el mismo producto de fijación que nosotros. El describe algunos gránulos con un contenido con inclusiones amorfas o filamentosas. Para nosotros existen también gránulos cuyo contenido parece condensarse en un granulado amorfo más denso, que destaca del resto, Fig. 5, pero esto ocurre sólo

ocasionalmente.

Estos datos que hemos estudiado para el grupo de control se repiten para una parte del grupo siguiente, concretamente para las glándulas contralaterales a la simpatectomía. Solamente hacer una observación, si estudiamos la Tabla II no existen diferencias significativas de este grupo con el de control para las áreas, pero en la Tabla III sí observamos diferencias significativas para los diámetros. El valor de esta diferencia nos da una  $P < 0'05$ , que se encuentra en el límite que hemos puesto para considerar estadísticamente la diferencia como no significativa. Esto puede ser debido a que la muestra haya sido pequeña y por lo tanto desde un punto de vista práctico consideramos a los valores obtenidos sin diferencias con respecto al grupo de control. Pero además las características del contenido de los gránulos son las mismas. Este dato es importante destacarlo pues en el otro subgrupo, al que se le ha realizado una simpatectomía, existen gran cantidad de gránulos con inclusiones y el tamaño de los gránulos sigue igual. Además hemos de destacar que estas inclusiones las observamos en el grupo tratado con isoproterenol y no en el tratado con noradrenalina.

Se sabe con certeza que la glándula submaxilar

de la rata recibe inervación por parte del sistema nervioso simpático, pero el papel biológico que juega esta inervación adrenérgica no está bien establecido. Se conoce desde los trabajos de Ohlin (93) que la inervación simpática juega un relevante papel durante el reflejo de secreción salival. Incluso Harrop y Garrett (59) demuestran que la descarga de productos orgánicos producidos por la parótida de la rata por estimulación simpática es un proceso normal durante el momento de la comida. Por lo tanto es lógico suponer que una interrupción de las vías de inervación del sistema nervioso simpático produzca efectos sobre las glándulas submaxilares de la rata. Este aspecto ha sido objeto de estudio por numerosos autores (3, 30, 39, 43). Una vez interrumpida la inervación, los axomas degeneran y durante este proceso pierden los neurotransmisores que contienen. Estos productos son suficientes para activar las estructuras normalmente inervadas por ellos. Este fenómeno donde primero se descubre es a nivel de las glándulas salivales (39) y se le conoce como "secreción degenerada" o "activación por degeneración". Posteriormente se intenta establecer el momento en que aparece, así Delp y Emmelin (30) establecen que en la parótida de rata comienza al proceso a las 12 horas y acaba a las 24 horas. Bemiloud y Van Euler (11) demuestran bioquímicamente en la glándula submaxilar que la depleción de noradre

nalina empieza a las ocho horas y se completa a las veinticuatro horas. En la glándula parótida de la rata el fenómeno de la depleción es algo más tardío (53). La explicación a esta diferencia en el momento de aparición la da posteriormente un trabajo de Almgren y colaboradores (3). Estos autores realizan en la glándula submaxilar de la rata dos tipos de simpatectomías, una extirpando el ganglio cervical, denominado distal, y otra extirpando el tejido perihiliar, denominada proximal. Los resultados que obtienen son idénticos, solamente los efectos se producen dos horas antes en la denervación distal. Observan a las catorce horas y media sólo un 45% de noradrenalina tras la denervación proximal. Por lo tanto el momento de aparición del fenómeno dependerá de la distancia que exista desde el lugar de la simpatectomía hasta la glándula.

Los efectos que esta depleción provoca sobre la glándula es lo que hemos visto denominado por Emmelin (39) como secreción degenerada. Esta secreción Almgren y colaboradores (3) la empiezan a observar a las once horas de haber realizado la simpatectomía. Wilbon y Schneyer (125) realizan un estudio ultraestructural en la glándula parótida de la rata y observan como a las doce horas el citoplasma se encuentra repleto de gránulos y con un retículo endoplásmico poco notable.

A las veinticuatro horas los gránulos son escasos y el retículo prominente. Es de observar que esta depleción de gránulos es obtenida cuando se produce la depleción de noradrenalina. A las cuarenta y ocho horas la célula adquiere sus características habituales y a los catorce días presenta una atrofia de los acinos y alteraciones en el citoplasma celular. Este dato que conlleva una pérdida del peso de la glándula es observada también por otros autores (6, 36).

Si comparamos estos amplios datos que nos ofrece la bibliografía con los resultados obtenidos en nuestro trabajo hemos de establecer algunas diferencias. La más sustancial e importante es el tiempo de duración de nuestra fase experimental. No hemos encontrado en la literatura ningún trabajo con este tiempo de latencia. Lo que sabemos es que la simpatectomía produce una alteración en la glándula salival que se presenta a las pocas horas de realizada y que ésta se debe a la noradrenalina liberada en la degeneración. Por lo tanto al encontrar en nuestro trabajo alteraciones tras la simpatectomía, éstas no se pueden achacar a la depleción de noradrenalina. Esto concuerda con los resultados obtenidos con la noradrenalina, no tienen ninguna semejanza con los del grupo simpatectomizado, pues existen diferencias significativas en cuanto al tamaño y en cuanto al contenido de los grá-

nulos. En cambio las características de los gránulos del grupo tratado con isoproterenol sí son similares a los del grupo simpatectomizado. Esto nos obliga a sugerir que la responsable de estos cambios sea la estimulación del isoproterenol.

Muchos son los trabajos y estudios que se han hecho sobre los efectos del isoproterenol sobre las glándulas salivales. Estos efectos son muy diversos y complejos. Los primeros autores que observaron cambios en las glándulas salivales tras la administración repetida de isoproterenol fueron Selye y colaboradores (108). Estos autores demuestran un aumento de tamaño de las glándulas. Posteriormente se demuestra que este fenómeno se debe a la proliferación celular y a un incremento del tamaño de las células (8). Otros autores, Mira y colaboradores (88), en un estudio hecho con microscopía óptica observan también un incremento en el tamaño celular y además las células contienen un citoplasma casi repleto de gránulos de secreción, los cuales son altamente refractarios y se tiñen ligeramente. El citoplasma presenta una ligera alcianofilia y una buena positividad para el PAS. Pero estos cambios se tienen que corresponder con alteraciones en el equilibrio bioquímico de la célula. Así Barka (8) demuestra que existe un incremento en la síntesis del ADN celular y en la captación de ami-

noácidos. Así mismo se ha comprobado que el isoprote<sub>u</sub>renol es capaz de estimular la síntesis de cierto - grupo de proteínas celulares que juegan un importan- te papel como reguladores de la función celular (35,- 114) y altera el pool de aminoácidos de la glándula - submaxilar de la rata (35). Pero aparte de estas im- portantes consecuencias que sobre el metabolismo celu<sub>u</sub>lar ejerce este producto, se sabe que es un potente - estimulante de la secreción salival y que este efecto se consigue con una sola dosis de isoproterenol (72 , 111, 115). A la hora de haber administrado el produc- to se extirpa la glándula submaxilar y según Kanda - (72) se observa una depleción total de gránulos. Esta depleción según Simson y colaboradores (112) es eviden<sub>u</sub>te ya a los quince minutos y se completa a los cuaren<sub>u</sub>ta y cinco minutos. Radley (97) extirpa la glándula a la media hora y constata la misma depleción de gránu- los, además observa que la luz del acino y los canalí<sub>u</sub>culos se encuentran agrandados e invaginados dentro - del volúmen celular. Sólo ocasionalmente observa la - descarga de gránulos a la luz tras la fusión de éstos con la membrana plasmática. Otras veces observa como los gránulos protruyen a la luz envueltos en su mem-<sub>u</sub>brana plasmática, llegando incluso a estar aparente- mente libres dentro de la luz. Este mismo autor a las dos horas después de la estimulación observa la misma

escasez de gránulos y es a las cuatro horas cuando comienzan a regenerarse los gránulos de secreción. Otro autor, Simson (111), coincide con estas observaciones, pero da cuenta de una mayor degeneración celular. Los animales que sacrifica a la hora de administrar la dosis muestran unas células con un citoplasma de baja - densidad, indicativo de un aumento del agua intracelu - lar. Este dato coincide con el señalado por Barka (10) el cual observa que el isoproterenol produce un incre - mento del agua intracelular a costa de una reducción del espacio extracelular.

En nuestro trabajo la dosis administrada del pro - ducto es similar a la casi totalidad de los autores - consultados. El tiempo de latencia hasta el momento - de la extirpación de la glándula es de diez minutos. - Este tiempo es muy corto lo más aproximado que han - descrito los autores en los estudios estructurales es de quince minutos (113). En cambio existe un trabajo de Perez y colaboradores (96) en el cual los autores utilizan la misma dosis que nosotros y obtienen una respuesta secretora a los cinco minutos de haberse - administrado el isoproterenol. Por lo tanto hemos de suponer que a los diez minutos se hayan producido algunos cambios en la ultraestructura glandular. Para nosotros estos cambios a nivel de la estructura general del citoplasma son muy leves, existe un ligero -

incremento del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi pero a nuestro entender poco valorable. Este dato está de acuerdo con lo antes expuesto, pues el isoproterenol lo primero que produce es una expulsión del material y no es hasta más tarde cuando se incrementa la síntesis, afectándose estas organelas. Otro dato aportado en nuestro trabajo es que puede existir unas dehiscencias intercelulares muy acentuadas con un aumento de la separación entre las células acinares. Este dato estaría en relación con lo afirmado por Barka (10), para este autor existe un paso de agua extracelular al espacio intracelular. Podríamos suponer que este incremento del espacio intracelular sería un signo del paso del agua.

Si estudiamos los gránulos de secreción observamos que su tamaño es parecido al de los demás grupos excepto al grupo de la noradrenalina en que son mayores. Si comparamos los datos del grupo simpatectimizado y el grupo simpatectamizado y estimulado con isoproterenol existen diferencias significativas, este último grupo es algo más reducido de tamaño. Donde sí hay mayores diferencias es en el contenido de esos gránulos. Existe un incremento del número de gránulos con inclusiones además de adoptar formas algo diferentes. Si el isoproterenol lo que provoca es una excreción de gránulos, nosotros observamos a la célula en

el instante previo a que ésta se produzca. Como vimos en la introducción el proceso de secreción salival consta de varias fases, si lo que va a producirse es la descarga del material nosotros nos encontramos en las fases previas que son la condensación y maduración. Los principales fenómenos que se cree que ocurren son una formación de agregados moleculares largos que al reducir el número de partículas osmóticamente activas produce una salida pasiva de agua. Para nosotros los agregados moleculares serían las inclusiones producto resultante de la acción del glutaraldehído sobre un lugar de alta concentración proteica, pero la salida de agua del gránulo que produciría una disminución en el tamaño del mismo no es tan evidente. Este último aspecto tan sólo ha sido constatado en el grupo tratado con isoproterenol y simpatectomizado. Hemos de hacer constar que en estos grupos no encontramos los signos que los autores consideran como de descarga. Así Seliger y colaboradores (107) observaban que la glándula parótida estimulada con isoproterenol sus glándulas mostraban la formación de pseudopodos. King y colaboradores (73) observaron que la estimulación con isoproterenol en la glándula sublingual de la rata provoca una fusión de los gránulos. La formación de pseudopodos no ha sido observada en nuestro trabajo y la fusión de los gránulos sí se ha observado algo más incrementada si

se compara con el grupo de control, pero este dato ha sido para nosotros poco objetivable, por lo que no se le ha dado gran relevancia.

Las inclusiones de los gránulos no se presentan en los tres grupos con las mismas características. - Observamos que las inclusiones laminares son más frecuentes en el grupo tratado con isoproterenol y aún más en el grupo tratado con isoproterenol y simpatectomizado. En cambio en el grupo simpatectomizado las inclusiones son más bien granulares. Para nosotros estas inclusiones observadas con la microscopia electrónica tienen su reflejo a nivel de la microscopia óptica. Si observamos la Tabla I, en la cual se describen los resultados obtenidos con las técnicas especiales, en estos tres grupos existe un incremento en la afinidad por el PAS que les distingue de los otros grupos. Pero hemos de tener en cuenta que estos resultados no pueden ser considerados definitivos, pues hoy existen técnicas histoquímicas de mucha mayor precisión. Pero requerirían la realización de otro trabajo de la misma envergadura y además no ha sido el objetivo fijado por nosotros. No obstante este dato nos orientaría en el sentido de suponer que estas inclusiones serían glicoproteínas ácidas o neutras. Este dato están en consonancia con el trabajo de Abe y Dawes (1), en el cual encuentran que tras

la estimulación con isoproterenol la saliva de la glándula submaxilar presenta un incremento muy notable en la concentración de proteínas. Estas inclusiones han sido descritas previamente en la literatura en escasas ocasiones. Kanda y colaboradores (72) describe tras veinticuatro a treinta y seis horas de la administración de una sola dosis de isoproterenol unas inclusiones laminares concéntricas. Estas laminas son escasas, dos o tres como máximo y además son escasos los gránulos que lo contienen. Radley (97) describa unas inclusiones más parecidas a las encontradas en nuestro trabajo. Son varias láminas que unas veces son concéntricas y otras forman capas paralelas. Pero esto lo observa el autor en las ratas tratadas durante siete días con una inyección diaria de isoproterenol y realiza la extirpación de la glándula seis horas después de la última inyección. La característica común de estos trabajos y que difiere del nuestro es el tiempo tan amplio que media entre la administración del producto y la extirpación de la glándula. Por tanto los gránulos no se encuentran todos en la fase previa a la descarga que es el efecto más inmediato que provoca el isoproterenol, aunque esto no es óbice para negar la posibilidad que estos gránulos se dispongan a ser expulsados de la célula. Hemos de hacer resaltar que el producto de fijación usado por estos dos autores es el mismo que el nuestro.

Pero no sólo existen diferencias entre los tres grupos en cuanto a las características de las inclusiones. El grupo tratado con isoproterenol y simpatectomizado presenta mayor cantidad de gránulos con inclusiones que los otros dos. En cuanto al tamaño, si comparamos en estos tres grupos solamente las medidas obtenidas para los gránulos con inclusiones, observamos que el grupo tratado con isoproterenol y simpatectomizado es el único que presenta diferencias significativas. Pero estas diferencias están en consonancia con las diferencias que con los demás grupos si consideramos los gránulos totales, por lo tanto es una característica típica de todo el grupo. Si comparamos los datos obtenidos para los gránulos totales de cada grupo con los gránulos con inclusiones del mismo grupo, solamente existen diferencias en el grupo tratado sólo con isoproterenol. Todos estos datos - junto con los anteriores nos muestran que el hecho - de realizar la simpatectomía hace variar los resultados obtenidos.

Esto está de acuerdo con los datos suministrados por la literatura. Desde los trabajos de Cannon en 1.939 (23) se sabe que cuando se desnervan los órganos efectores autonómicos éstos se vuelven cada vez más sensibles a los mediadores y agentes químicos. Como ya sabemos en el curso de la degeneración

las fibras autonómicas seccionadas liberan mediadores almacenados, lo cual tiende a producir una hiperacción paradójica breve. Pero esta hipersensibilidad que se describe es desarrollada en los días consecutivos a la simpatectomía, llegando a su nivel máximo a los siete-catorce días. El mecanismo que da lugar a este fenómeno no se conoce bien, sólo se saben dos factores contribuyentes. En ausencia de terminaciones nerviosas, los mediadores no se reabsorben ni se inactivan con rapidez y además después de la denervación, desaparecen la colinesterasa y la MAO que normalmente inactivan los mediadores (90). Pero esta explicación que supone un incremento de los mediadores es sólo parcial, porque los tejidos denervados se vuelven sensibles a otros muchos compuestos, tanto fármacos como iones. Este fenómeno ha sido estudiado y comprobado en la glándula parótida de la rata (36), en la glándula submaxilar y sublingual de la rata. Así Perez y colaboradores (96) tras veinte días de realizada una simpatectomía estimulan con isoproterenol y observan un incremento en el volumen de saliva secretado. Asking y Ekstron (6) dan cuenta del mismo resultado y además la dosis mínima necesaria de isoproterenol para provocar secreción es mucho menor. Para estos autores la hipersensibilidad está totalmente desarrollada a la semana de realizada la simpatectomía y persiste a las cuatro y seis semanas. Para nosotros esta hiper

sensibilidad se manifiesta en nuestro trabajo por tres datos aportados previamente: aumenta el número de gránulos con inclusiones que difieren en cuanto al tamaño con los otros dos grupos, estas inclusiones tienen una mayor tendencia a la laminación que el grupo tratado sólo con isoproterenol y mayor aún al compararlo con el grupo simpatectomizado. Pero el problema estriba en la explicación que podemos dar a esta hipersensibilidad. Hemos visto que ésta no está del todo desarrollada hasta la semana (6, 96) y nosotros la constatamos a los diez minutos. Nosotros suponemos que la simpatectomía produce una estimulación de los receptores  $\beta$  por liberación de mediadores, si a esto le añadimos el isoproterenol desde el exterior, sería lógico suponer que la respuesta es más evidente por suma de efectos.

Una vez estudiados y discutidos los resultados obtenidos con la estimulación con isoproterenol, hemos de estudiar los efectos producidos con la noradrenalina. Cuando se estimula con este producto una glándula salival el efecto más importante que se produce es un incremento en el flujo salival. Pero este aumento tiene dos fases: en una primera el flujo salival es rápido e intenso y en una segunda se estabiliza disminuyendo (49). La explicación a este fenómeno da pensando que lo primero que se produce es una com



tracción mioepitelial, esto produce un incremento en la presión del conducto excretor y un aumento del flujo salival (42, 49). Este aspecto será discutido más ampliamente en el apartado que sobre las células mioepiteliales expondremos posteriormente. Pero este incremento en la secreción tan acusado en la primera fase no sólo se ha atribuído a la contracción mioepitelial. Scheyer (102) observa que este efecto es muy corto y rápido en su duración si lo comparamos con la duración de la primera fase. El ofrece otra explicación, los cambios en la concentración de potasio. Se sabe que la estimulación con simpaticomiméticos produce una elevación en la concentración de potasio en la saliva (127). Por lo tanto Scheyer (102) supone que el potasio intracelular pasa en esta fase en gran cantidad a la luz del acino y este paso tiene que ir acompañado de una salida abundante de agua por efecto de la presión osmótica. Existe un dato ofrecido en nuestro trabajo que estaría en consonancia con este aspecto. En los dos grupos tratados con noradrenalina la luz de los acinos se encuentra sensiblemente incrementada, con un contenido claro y homogéneo sin restos de membrana en su interior. Podríamos suponer que este aumento sería por una salida de potasio y agua desde la célula a la luz acinar.

La segunda fase en la cual el incremento de la secreción es menor se atribuye a un incremento de la secreción celular propiamente dicho (49). Existen estudios morfológicos, Seifer (106), que demuestran que la estimulación con noradrenalina a las pocas horas produce grandes vacuolas de secreción en el polo apical de la célula, tumefacción del retículo endoplásmico y del núcleo. También se sabe que la estimulación continua con noradrenalina produce alteraciones regresivas, con edema celular, descomposición de los acinos y fibrosis (44). Es lógico suponer que este no es el caso estudiado por nosotros, por el corto espacio de tiempo transcurrido para la acción del producto y por los resultados obtenidos. No existen esas alteraciones regresivas, ni se afecta el retículo endoplásmico ni el aparato de Golgi. Pero aunque el efecto sobre el aparato secretor no es evidente en nuestro trabajo, si existe un dato significativo y característico entre los demás grupos. Los gránulos de secreción se encuentran sensiblemente aumentados de tamaño. Además este aumento de tamaño va acompañado de una pérdida de las inclusiones, que aunque sería lógico no encontrarlos en el grupo estimulado sólo con noradrenalina, sí esperábamos encontrarlos en el grupo estimulado con noradrenalina y simpatectomizado. Las inclusiones sólo aparecen en estos dos grupos de manera ocasional y se parecen más a las obtenidas en el grupo de control que a las producidas con isoproterenol, pues

son poco evidentes y destacan poco del resto del contenido del gránulo. Al igual que el isoproterenol la noradrenalina no afectaría a las vías de secreción, pero sí a la condensación y maduración del material contenido en los gránulos. Si el isoproterenol parece provocar la formación de agregados moleculares largos, la noradrenalina parece diluirlos y hacer el contenido más homogéneo, incrementando el tamaño de los gránulos. Hemos de hacer constar que este efecto es tan potente que las inclusiones que suponemos que formaría la simpatectomía, son diluídas por la noradrenalina.

Al estudiar la bibliografía observamos que la realización de una simpatectomía provoca al igual que con el isoproterenol una hipersensibilidad cuando estimulamos con la noradrenalina. Así en el trabajo de Perez y colaboradores (96) estimulan con noradrenalina veinte días después de realizar la simpatectomía y observan un incremento en el volúmen de saliva secretado y una disminución en la dosis mínima necesaria para provocar la secreción. En otro trabajo de Asking y Ekstron (6) realizan la simpatectomía y estimulan con noradrenalina. Observan un incremento en el volúmen de saliva segregado y constatan que esta hipersensibilidad está desarrollada a la semana de la extirpación del ganglio cervical superior. Como

conocemos nuestro trabajo no presenta las mismas dife  
rencias significativas en cuanto al tamaño de los grá  
nulos al estudiar otros aspectos entre los dos grupos  
estimulados con noradrenalina. Por lo tanto a diferen  
cia del isoproterenol no encontramos signos morfológi  
cos que nos confirmen la hipersensibilidad. Esto es -  
lógico si observamos que las características del gru  
po simpatectomizado difieren notablemente con este -  
grupo y no podríamos suponer una suma de efectos como  
con el isoproterenol.

## B. CELULAS MIOEPITELIALES

Este tipo celular pasa casi totalmente desapercibido en la microscopia óptica y es únicamente con la microscopia electrónica como podemos realizar un estudio minucioso y detallado. La ultraestructura relatada en nuestro trabajo no difiere de la descrita previamente por los estudios de Tamarin (116) y de Garrett y Emmelin (49). Donde sí podemos aportar datos de interés es en los cambios sufridos por estas células al ser estimuladas con isoproterenol o noradrenalina, o al ser simpatectomizados.

De siempre ha sido objeto de numerosos estudios el papel que puedan jugar las células mioepiteliales en la secreción salival. En otras glándulas se ha podido demostrar directamente la contracción mioepitelial, en cambio en las glándulas salivales tan sólo se tienen signos indirectos de esa contracción. Entre éstos el más importante es el incremento en la presión de los conductos secretores. Según el trabajo antes citado de Garrett y Emmelin (49) hecho en el perro, demuestran que la estimulación de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos es la responsable de un incremento en la presión del conducto secretor. Este incremento hay autores que lo atribuyen a la contracción de las células mioepiteliales (41, 52, 119) y otros que lo atribuyen al vaciamiento de los gránulos de

secreción (117). En nuestro trabajo hemos observado - en el grupo estimulado con noradrenalina que las células mioepiteliales producen indentaciones sobre las - células acinares y llegan en ocasiones a introducirse profundamente en el acino. Esto podría considerarse - como signos directos de contracción mioepitelial y de acuerdo con los autores estaría mediatizado exclusiva mente con los receptores  $\alpha$ . En el mismo trabajo de Garrett y Emmelin (49) establecen que el incremento en la presión de la luz del conducto se produce en - dos fases: una primera rápida y de corta duración que se atribuye a la contracción mioepitelial y una segunda fase más lenta y duradera que se atribuye a un incremento en la secrección propiamente dicha. En nuestro trabajo no encontramos ningún signo de vaciamiento ni ruptura de los gránulos, todo lo más un aumento del volúmen de la luz del acino, punto ya discutido - en la discusión de las células acinares.

Pero no sólo son estos signos de contracción los únicos datos que aportamos. Hemos de observar que tan to en los grupos estimulados con noradrenalina, como con isoproterenol y con simpatectomía existen unas células mioepiteliales incrementadas en volúmen. Este incremento se debe a un aumento ostensible de los filamento del citoplasma. Se sabe que las células mioepiteliales no se ven afectadas por los estimulantes

de los receptores  $\beta$  (49) en cuanto a la producción de contracción mioepitelial. Si los receptores  $\beta$  producen un incremento en la presión de los conductos ésta se atribuye a la estimulación de la secreción salival. Pero aunque se haya demostrado que los receptores  $\beta$  no provocan una contracción esto no excluye la posibilidad que puedan provocar un incremento del volumen de la célula mioepitelial. El problema está en explicarnos el papel que pueda jugar este proceso en la secreción salival. Hay autores que no están de acuerdo con la explicación de la actividad contráctil mioepitelial (40). Estos autores atribuyen un papel pasivo, la célula mioepitelial se limitaría a impedir la dilatación del acino provocada por el aumento de volumen al aumentar la secreción salival, lo que provocaría el incremento de presión en el conducto. Para nosotros este incremento en el número de fibrillas de la célula mioepitelial podría ser un reforzamiento de la estructura celular para impedir de una manera pasiva la dilatación acinar. Por lo tanto pueden darse los dos mecanismos tanto activo como pasivo.

### C. CELULAS GRANULOS DENSOS

Este tipo celular ha sido descrito previamente por distintos autores (19, 68, 86, 126). Pero todos estos trabajos están referidos a ratas recién nacidas que no llegan a los catorce días de vida y presentan 50 grs. de peso corporal como máximo. En nuestro estudio la hemos encontrado en todos los grupos, si bien con características diferentes, siendo los animales adultos y con un peso comprendido entre los 280 grs. y 450 grs..

Uno de los trabajos anteriormente citados, Bresler (19) estudia la diferencia que puede ejercer en el desarrollo de la glándula submaxilar de ratas recién nacidas la administración de isoproterenol. Este producto es administrado a un grupo en una sola dosis. En el grupo monodosis observa las células más numerosas y con unos gránulos densos más abundantes que en los otros grupos. Este dato concuerda con los ofrecidos en nuestro trabajo, tengase en cuenta que administramos una sola dosis y la glándula es extirpada pocos minutos después. Para nosotros no sólo aumentan el número de gránulos sino que encontramos este tipo celular con mayor frecuencia en los grupos estimulados con isoproterenol y noradrenalina, no así en el grupo de control ni el grupo de la simpatectomización

que son raras. La ultraestructura de estas células desc<sup>ri</sup>tas por este autor son algo diferentes a las de nuestro trabajo. El citoplasma es más abundante y el aparato de Golgi y retículo endoplásmico están más desarrollados.

Otro trabajo realizado por Menaker y colaboradores (86) estudia también el efecto del isoproterenol sobre la glándula submaxilar de ratas recién nacidas. Administra la sustancia durante varios días seguidos. Describe la existencia de dos tipos celulares: células de gránulos os<sup>u</sup>ros y de gránulos claros. Siendo las características ul<sup>u</sup>traestructurales similares a las descritas por el anterior autor (19). Al administrarles isoproterenol las encuentra en un número reducido de ocasiones, pero presentan las mismas características citológicas. Estos autores describen además un tipo celular que presenta unos gránulos con características intermedias. Contienen un centro denso ro<sup>o</sup>deado de un halo claro alrededor. Para estos autores este tipo celular sería intermedio entre la célula acinar típi<sup>i</sup>ca y la célula de gránulos oscuros. La conclusión a la que llegan junto con otros autores como Jacoby y Leeson (68) y Jamashina y Barka (126) es que estas células de gránulos oscuros son las precursoras de las células acinares. Se sabe que el isoproterenol actúa incrementando la captación de aminoácidos (10,35) y que estimula la síntesis de cierto grupo de proteínas (35, 114) en la célula acinar. Por tanto podríamos suponer que facilitase la transforma

ción de este tipo celular en célula acinar.

En nuestro trabajo solamente hemos encontrado un tipo celular que podríamos clasificar como intermedio en el grupo estimulado con noradrenalina. En dos de los casos de este grupo encontramos una célula con unos gránulos medianamente opacos al haz de electrones, lo que da un aspecto grisáceo en la microfotografía (Fig. 26). Podríamos suponer que este tipo fuese una célula intermedia. Pero es un dato encontrado en ocasión muy rara y no podemos valorarlo como prueba definitiva. Para nosotros no sería cierta la tesis propuesta por estos autores. Además, consideramos que es una célula con una morfología y función totalmente distinta a las células acinar. Para nosotros su ultraestructura es muy diferente y sobre todo observamos como al ser estimuladas con noradrenalina los gránulos vierten su contenido hacia la luz del acino (Fig. 25). En nuestro trabajo encontramos un tipo celular en varias ocasiones que presenta un núcleo redondeado y de gran tamaño, un citoplasma escaso y unas organelas poco desarrolladas. Unas veces estas células están en contacto con la luz del acino (Fig. 31) y otras están relegadas hacia la basal (Fig. 20 y 30). Estas células podrían ser o las originarias de los gránulos oscuros, o estas mismas que han perdido por secreción sus gránulos. Simson (111) describe un tipo celular dentro del acino, que presenta un citoplasma claro y poco desarrollado.

Las considera macrofagos o linfocitos cuya misión sería eliminar las células defectuosas. Nosotros esta explicación nos valdría para uno de los casos (Fig. 31) pero no para los otros en que las características citológicas son diferentes y además llegan a tener contacto con la luz del acino con lo cual suponemos que tienen que tener alguna función específica. Existe un dato ofrecido por los autores (19, 86) y es que las células de gránulos oscuros disminuye su cantidad cuando el isoproterenol se administra repetidas veces. Si como suponemos no se transforma en células acinares debería de existir células con las mismas características ultraestructurales pero sin los gránulos, como hemos visto ocasionalmente en nuestro trabajo. Pero este dato no es aportado en los trabajos de la literatura. Existe un dato aportado por nuestro trabajo que nos invalida todas estas argumentaciones en pro y en contra de si las células de gránulos oscuros son las precursoras de las células acinares y es que las ratas son adultas. No creemos posible el que un tipo celular determinado puede encontrarse sin evolucionar en ratas adultas, por lo tanto para nosotros sería un tipo celular diferente de la célula acinar. El problema que proponemos es el papel que juegan estas células en el conjunto del proceso de secreción salival, aspecto que puede ser origen de múltiples investigaciones.

123

=====

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

=====

## V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

### RESUMEN

De todos es sabido el papel trascendental que juegan las distintas glándulas salivales en el mantenimiento del medio bucal. Por lo tanto, es importante el conocimiento de su fisiología y dentro de esto la regulación que sobre la secreción salival ejercen el sistema nervioso simpático y parasimpático. Este aspecto ha sido estudiado por numerosos autores y origen de múltiples controversias. Nosotros con nuestro trabajo intentaremos aportar algunos datos, para lo cual utilizamos la glándula submaxilar de la rata y la sometemos a cambios experimentales estudiando las alteraciones que a nivel ultraestructural se producen en el acino glandular. Estos cambios consisten en alterar el sistema nervioso simpático, estimulándolo químicamente con isoproterenol, actúa sobre los receptores  $\beta$  simpáticos, o con noradrenalina, actúa sobre los receptores  $\alpha$ . También extirpamos el ganglio cervical superior, punto visible del trayecto de inervación simpática, o combinamos ambos cambios. La extirpación de la glándula para su consiguiente estudio se realiza a los diez minutos.

Para verificar y comparar los resultados se establece un grupo de control. Este grupo muestra unas células acinares típicas con una polaridad manifiesta, su porción

basal descansa sobre la membrana basal del acino y su porción apical conforma la luz. El núcleo redondeado se encuentra situado en el tercio basal de la célula. El citoplasma presenta un retículo endoplásmico rugoso abundante, un aparato de Golgi muy prominente y en el tercio apical abundantes gránulos de secreción. Estos gránulos presentan un contenido homogéneo finamente granular. Este aspecto de los gránulos varía en el grupo simpatectomizado y en el estimulado con isoproterenol. Aparecen unas inclusiones granulares o laminares que destacan del resto del contenido y son el resultado de la acción del fijador sobre zonas de alta concentración proteica. Este detalle nos lleva a afirmar que en un primer momento la simpatectomía produce un efecto similar al isoproterenol. En el grupo estimulado con noradrenalina el contenido de los gránulos es el mismo que en grupo de control pero éstos se encuentran sensiblemente aumentados de tamaño. En los grupos en que combinamos la estimulación y la simpatectomía, si el producto es la noradrenalina no varían los resultados obtenidos, si es el isoproterenol se constatan las mismas inclusiones pero muy aumentadas en número lo que nos lleva a pensar en una posible hipersensibilidad provocada por la simpatectomía.

Pero no sólo en los gránulos de secreción se aprecian cambios. En los dos grupos estimulados con isoproterenol se aprecian unas deshiscencias intercelulares muy acusa-

das. Las membranas laterales de las células acinares se separan y aumentan el número de microvellosidades. Esto nos lleva a pensar en un traspaso de agua hacia el acino. En los dos grupos estimulados con noradrenalina se apreciaban un aumento ostensible de la luz acinar, provocado por una excreción de agua por parte de la célula.

Otro tipo celular que ha sido objeto de estudio es la célula mioepitelial que se encuentra situada entre la célula acinar y la membrana basal a modo de sostén del acino. El problema que siempre ha suscitado este tipo celular es el papel que ejercen estas células en el proceso de expulsión del material segregado. Los resultados obtenidos nos llevan a considerar que pueden ejercer un papel pasivo. En todos los grupos excepto en el de control existe un aumento del número de fibrillas del citoplasma, suponemos que es un reforzamiento de la estructura que impediría la dilatación del acino en el momento de la expulsión. Pero también hemos observado en el grupo estimulado con noradrenalina signos directos de contracción mioepitelial lo que sugiere que también pueden jugar un papel activo.

Por último hemos constatado la presencia de unas células de granos oscuros. Estas células están descritas en la literatura en ratas recién nacidas. Nuestro trabajo se realiza en ratas adultas. Hemos apreciado en los grupos

tratados con isoproterenol un incremento en el número de gránulos y en el tratado con noradrenalina existen signos evidentes de secreción hacia la luz acinar. Todo esto nos lleva a considerar esta célula con una fisiología independiente de la célula acinar y no como su precursora como sugieren algunos autores.

### CONCLUSIONES

1). La célula acinar del grupo de control general presenta las siguientes características, que concuerdan con las relatadas por la bibliografía:

- \* Una polaridad manifiesta con una porción basal que descansa sobre la membrana basal y una apical que conforma la luz del acino. En la porción lateral se encuentra un canalículo.
- \* Un núcleo redondeado y localizado en el tercio basal del citoplasma.
- \* Retículo endoplásmico rugoso muy abundante.
- \* Aparato de Golgi muy prominente.
- \* Gránulos de secreción ocupando todo el tercio apical con un contenido homogéneo finamente granular.

2). El segundo grupo de control cuya glándula contralateral es simpatectomizada presenta las mismas características citológicas que el grupo de control general.

- 3). La extirpación del ganglio cervical superior no produce a los diez minutos variaciones sustanciales en la ultraestructura general del acino. Los gránulos de secreción presentan el mismo tamaño que el grupo de control. El contenido de estos gránulos presenta con frecuencia un punteado prominente o unas laminillas paralelas que destacan del resto del contenido, son las denominadas inclusiones granulares y laminares.
  
- 4). La estimulación de la glándula con isoproterenol, - que actúa sobre los receptores  $\beta$  simpáticos, únicamente presenta como dato diferencial un mayor número de gránulos con inclusiones con un ligero predominio del tipo laminar sobre el granular.
  
- 5). La estimulación de la glándula con noradrenalina, - que actúa sobre los receptores  $\alpha$  simpáticos, provoca un incremento sustancial del tamaño de los gránulos. El contenido de los mismos es homogéneo finalmente granular, por tanto de iguales características que el grupo de control.

- 6). Al extirpar el ganglio cervical superior y estimular con noradrenalina no se encuentran diferencias con el grupo solo estimulado con noradrenalina.
- 7). Al extirpar el ganglio cervical superior y estimular con isoproterenol sí presenta diferencias con el grupo sólo estimulado con isoproterenol. Existe un incremento muy notable del número de gránulos con inclusiones, un predominio más patente del tipo laminar sobre el granular y el tamaño de los gránulos totales y los gránulos con inclusiones es menor.
- 8). Los dos grupos estimulados con noradrenalina, con y sin simpatectomía, presentan un aumento del volúmen de la luz acinar.
- 9). Los dos grupos estimulados con isoproterenol, con y sin simpatectomía, presentan unas deshisccencias intercelulares muy acusadas con gran cantidad de microvellosidades.
- 10). Las células mioepiteliales se presentan en los grupos estimulados con isoproterenol y noradrenalina y

en los simpatectomizados con un incremento en el número de filamentos lo que provoca un aumento del volumen citoplasmático. Los dos grupos estimulados con noradrenalina las prolongaciones producen con frecuencia indentaciones en la superficie del acino.

- 11). En todos los grupos se aprecia un tipo celular distinto de los anteriores de menor tamaño que la célula acinar, con un citoplasma escaso, núcleo redondeado, retículo endoplásmico poco desarrollado, con unos gránulos de secreción opacos al paso del haz de electrones, y de localización basal aunque en ocasiones toma contacto con la luz acinar. Se presenta con mayor frecuencia y con mayor número de gránulos en los grupos estimulados con isoproterenol. En los grupos tratados con noradrenalina se observan signos claros y evidentes de secreción de estos gránulos hacia la luz acinar. Consideramos a esta célula con una fisiología y características distintas de la célula acinar.

=====

VI. BIBLIOGRAFIA

=====

ABE, K.; DAWES, C.: "The effects of electrical and pharmacological stimulation of the types of protein secreted by rat parotid and sub mandibular gland".

Arch. oral Biol. 23, 367-372. 1.978.

ALM, P. and ERSTRONM, J.: "Cholinergic nerves of unknown origin in the parotid glands of rats.

Arch. oral. Biol. 21, 417-421. 1.976.

ALMAGREN, O.; DAHLSTROM, A.; HAGGEDAL, J.: "Degeneration secretion and noradrenaline disappearance in rat salivary glands following proximal or distal axotomy".

Acta Physiol. Scand. 98/4, 457-464. 1.976.

AMSTERDAM, A.; AOHAD, I.; SCHRAMM, M.: "Dynamic changes in the ultrastructure of the acinar cells of the rat parotid gland during the secretory cycle".

J. Cell. Biol. 41, 753-773. 1.969.

AMSTERDAM, A.; SCHRAMM, M.; OHAD, I.; SOLOMON, Y & SEUNGER, Z.: "Concomitant synthesis of membrane protein and exportable protein of the secretory granule in rat parotid gland".

Journal of Cell. Biol. 50, 187-191. 1.971.

- 6 ASKING, B. ; EKSTROM, J.: "Sensitization of the submaxillary gland of the rat after sympathetic denervation".  
Actapharmacol et toxicol. 44, 385-390. 1.979.
- 7 VAN BARDELEBEN, K.: "Glandula submaxillaris oder submandibularis oder mandibularis".  
Anat. Anz. 31, 320-326. 1.907.
- 8 BARKAT, T.: "Stimulation of D N A synthesis by isoproterenol in the salivary gland".  
Exp. Cel. Res. 39, 355. 1.965.
- 9 BARKAT, T.: "Induced cellproliferation. The effect of isoproterenol".  
Exp. Cel. Res. 37, 662. 1.965.
- 10 BARKAT, T.: "Effect of isoproterenol on amino acid transport into rat salivary glands".  
Exp. Cel. Res. 64, 371-379. 1.971.
- 11 BEN MOLOVID, M.; VON EULER, U.S.: "Effects of bretylium, reserpine, guanethidine and sympathetic denervation on the noradrenaline contents of the rat submaxillary gland.  
Acta physiol scand. 59, 34-32. 1.963.

12 BERNARD CLAUDE: "Memories sur le pancreas" 1.856.

13 BERNARDE, M.A.; FABIAN, E.N.; ROSEN, S.; HOPPERT, -  
C.A.; HUNT, H.R.: "A method for the collection of -  
large quantities of rat saliva".

J. Dental Res. 35, 326-327. 1.956.

14 BHOOLA, K.D. et al : "The influence of androgens on  
enzymes (chymotrypsin-and trypsin-like protoesas, -  
remina, kolicreina y amilasa) and o cellular struc-  
ture of the mouse submaxillary gland".

J. Physiol (Lond). 235, 503-522. 1.973.

15 BLOBEL, G.; DOBBERSTEIN, B.: "Transfer of proteins  
a coross membranes. I.presence of proteolytically  
processed and improcessed nascent inmuno".

J. Cel. Biol. 67, 835. 1.975.

16 BLOM FIELD, J.; VAN LENNEP, E.; SHOREY, C.D.; MALIN,  
A.S.; DASCALU, J; BRONN, J.M.: "Ultraestructure of  
the vitro formation of hidroxy a patite in submandi  
bular saliva of children with cystic fibrosis".

Arch. Oral. Biol. 19, 1153-1160. 1.974.

- 17 BOGART, B.I.: "Fine structural localization of cholinesterase activity in the submandibular gland".  
J. Histochem Cytochem. 18, 730-739. 1.970.
- 18 BOGART, B.I.; DE LEMOS, C.L.: "Adrenergic Innervation of the Rat Submandibular and Parotid Glands. An Electron Microscopic Autoradiographic Study of the Uptake of Tritiated Nor epinephrine".  
Anat. Rec. 177, 219-224. 1.973.
- 19 BRESSLER, R.S.: "Fine Structure of the Differentiating Acini in Submandibular Glands of Isoproterenol treated Rats".  
Am. J. Anat. 138, 431-448. 1.973.
- 20 BUTCHER, F.R.; GOLDMAN, R.H.: "A submandibular duct reservoir".  
J. Dent. Res. 51, 1105-1107. 1.972.
- 21 BUTCHER, F.R.; GOLDMAN, R.H.: "Effect of cytocholosin Bandcolchicine on  $\alpha$ -amylase release from rat parotid tissue slices. Dependence of the effect and  $N^6, 0^{21}$  - dybutyryl adenosine, 3', 5' - cyclic monophosphate concentration".  
J. Cel. Biol. 60, 519-523. 1.972.

2 CAJAL, S.R.: "Trab. Lab. Inv. Biol. Univ. Madrid".

12, 127. 1.914.

3 CANNON, W.B.: "The supersensitivity of denervated -  
structures alaw of denervation".

Am. J. Med. Sci. 198, 737. 1.939.

24 CARO, L.G.; PALADE, G.E.: "Protein synthesis, stora-  
ge, and discharge in the pancreatic exocrine cell. -  
An autoradiographic study".

J. Cel. Biol. 20, 473-495. 1.964.

25 CASTLE, J.D.; JAMLESON, J.D.; PALADE, G.E.: "Radio--  
autographic analysis of the secretory process in -  
the parotid acinar cell of the rabbit".

J. Cell. Biol. 53, 290-311.1.972.

26 COATS, D.A.; EMMELIN: "The shor-tenn effects of sym  
pathetic ganglionectomy on the cat's salivary secre  
tion".

J. Physiol. 162, 282-288. 1.962.

- 27 COHEN , S.: "Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal".  
J. Biol Chem. 237, 1555-1562. 1.962.
- 28 COHEN , S. y ELLIOTT, G.A.: "The simulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse".  
J. Invest. Derm. 40, 1-5. 1.963.
- 29 CUTLER, L.S.; CHAUDHRY, A.P.: "Differentiation of the myoepithelial cells of the rat submandibular gland in vivo and in vitro; an ultrastructural study".  
J. Morphol. 140, 343-354. 1.973.
- 30 DELFS, V; EMMELIN. : "Degeneration secretion of sympathetic ganglionectomy on the cat's salivary secretion".  
J. Physiol (Lond). 239, 623-630. 1.974.
- 31 DEROBERTIS, E.D.P.; SABATINI, D.  
J. Biophys. Biochem. Cytol. 4, 667-672. 1.958.

- 32 DOREY, G.; BHOOLA, K.D.: "II. Ultrastructure of duct cell granules in mammalian submaxillary glands".  
Z. Zellforsch. 126, 335-347. 1.972 b.
- 33 DOREY, G. and BHOOLA, K.D.: "I. Ultrastructure of acinar cell granules in mammalian submaxillary glands".  
Z. Zellforsch. 126, 320-334. 1.972.
- 34 DRUM, D.E.: "Simple Technique for Direct Camulation of Rat Salivary Ducts".  
J. Dental Res. 42, 892. 1.963.
- 35 EKFOR, T.; BARKA, T.: "The effect of Isoproterenol on Protein Synthesis in Rat Submandibular Glands".  
Lab. Invest. 24/3, 197-202. 1.971.
- 36 EKSTROM, J.: "Sensitization of the rat parotid gland to secretagogues following either parasymphathetic denervation or symphathetic denervation or decentralization".  
Acta Physiol. Scand. 108, 253-261. 1.980.

- 37 ELLISON, S.A.: "Protein and glycoproteins of saliva".  
En "Handbook of Physiology" (C.T. Code ed) section 6,  
vol. 2, pag. 531-554. American Physiological Society,  
Washington. 1.967.
- 38 EMMELIN, N.: "Sympathicolytic agents used to separate secretory and vascular effects of sympathetic stimulation in the submaxillary gland".  
  
Acta Physiol. Scand. 34, 29-37. 1.955.
- 39 EMMELIN, N.: "Submaxillary and sublingual secretion of saliva in cat's during degeneration of postganglionic parasympathetic fibres".  
  
J. Physiol (Lond). 162, 270-281. 1.962.
- 40 EMMELIN, N.; GARRETT, J.R.; OHLINP.: "Neural control of salivary mioepithelial cells".  
  
J. Physiol. (Lond). 196, 381-391. 1.968.
- 41 EMMELIN, N.; GJÖRSTRUP, P.: "The physiology salivary mioepithelial cells".  
  
In: Secretory mechanisms of exocrine glands. pag. -  
29-38.  
  
Ed. N.A. Thon y O.H. Potenen Munksgaad. Copenhagen  
1.974.

- 42 EMMELIN, N.; OHLIN, P.; THULIN, A.: "The pharmacology of salivary miopithelial cells indorgs".  
Br. J. Pharmacol. 37, 666-679. 1.969.
- 43 EMMELIN, N.; TRENDELENBURG, V.: "Degeneration activity after parasympathetic or sympathetic denervation".  
Ergebn. Physiol. 66, 147-211. 1972.
- 44 FISCHER, R.; KAWAI, K.: "Uber Verandemugen der Rattenspeichel drüsen nach Isoproterenol injektion".  
Verh. Dentsih. Ges. Path. 46, 257.261. 1.962.
- 45 GARRETT, J.R.: "Neuroeffector sites in salivary glands".  
En "Oral Physiology". (N. Emmelin y Y. Zottenan, eds.)  
pag. 83-97. Pergaman, Oxford. 1.972
- 46 GARRETT, J.R.: "Innervation of salivary glands, morphological considerations".  
"Secretory Mecaninms of Exocrine Glands". (N.A. Thon and O.H. Peterson, eds.). pag. 17-28. Munksgaard. Copenhagen. 1.974.

- 47 GARRETT, J.R.: "Recent advances in physiology of salivary glands".  
Brit. med. Bull. 31, 152-155. 1.975.
- 48 GARRETT, J.R.: "Structure and innervation of salivary glands".  
En "Scientific Foundations of Dentistry". B. Cohen y J.R.H. Kraner, eds. pag. 449-516. Hernemann. London. 1.976.
- 49 GARRETT, J.R.; EMMELIN, N.: "Activities of salivary myoepithelial cells a review".  
Med. Biol. 57/1, 1-28. 1.979.
- 50 GARRETT, J.R.; HARROP, T.; KIOD, A; THULIN, A.: "Nerve induced secretory changes in salivary glands".  
En "Nerves and the Gut". F. Brooks y P.N. Evers ed. - pag. 13-49. C.B. Slack, Thorofore. 1.977.
- 51 GARRETT, J.R. RIDD, A.: "Acid phosphatase and peroxidase in "resting" acinar cells of the major salivary glands of cat's and their possible movement into secretory granules".  
Histochem. J. 8, 523-538. 1.976.

- 52 GARRETT, J.R.; PARSON, P.A.: "Alkaline phosphatase - and myoepithelial cells in the parotid gland of the rat".  
Histochem. J. 5, 463-471. 1.973.
- 53 GARRETT, J.R.; THULIN, A.: "Changes in Parotid Acinar Cells Accompanyng Salivary Secretion in Rats on Sympathetic or Parasympathetic Nerve Stimulation".  
Cell. Tiss. Res. 159, 179-193. 1.975.
- 54 GARRETT, J.R.; THULIN, A.: "Structural Changes Associated with Parotid "Degeneration Secretion" af ter Post-Ganglionic Sympathectomy in Rats".  
Cell. Tiss. Res. 162, 1-12. 1.975.
- 55 GOLDSTEIN, M.N. y BURDMAN, J.A.: "Studies of the nerve growth factor in submandibular glands of femølemice treated with testosterane".  
Anat. Rec. 151, 199-203. 1.965.
- 56 GUTMAN, Y. etal : "Renin-like activity of the rat - submaxillary gland: characterization and the effect of several dsugs and stimuli".  
Brit. J. Pharmacol. 47, 59-68. 1.973.

- 57 HAMOSH, M. y SCOW, R.O.: "Lingual lipase".  
En "Fourth Symposium on Oral Sensation and Perception. Development in the Fetus and Infant". (J.E.-Bosma, ed.) pag. 311-322. U.S. Department of Health, Education and Nerfore. Bethesda. 1.973.
- 58 HAND, A.R.: "Nerve-acinar cell relationships in the rat parotid gland".  
J. Cell. Biol. 47, 540-543. 1.970.
- 59 HARROP, T.J.; GARRETT, J.R.: "Effects of Preganglionic Sympathectomy on Secretory Changes in Parotid - Acinar Cells of Rats on Eating".  
Cell. Tiss. Res. 154, 135-150. 1.974.
- 60 HEBEL, R.; STROMBERG, M.W.: "Anatomy of the Laboratory Rat".  
Ed. The Willians and Wilkins Company. Baltimore. - 1.976.
- 61 HEIDEN HEIN, M.: "Plasma and zelle".  
G. Fischer (Jena) 1.907.

- 62 HELLEKANT, G.; KASAHARA, Y.: "Secretory fibers in the trigeminal part of the lingual nerve to the mandibular salivary gland of the rat".  
Acta Physiol.Scand. 89, 198-207. 1.973.
- 63 HERZOG, V.; MILLER, F.: "Die Lokalisation endogener  $\text{P}_e$  oxydase in der Glandula parotis de Ratte".  
Z. Zellforsch. 107, 403-420. 1.970.
- 64 HOWELL, S.L.: "The molecular organization of the  $\beta$  - granule of the islets of Langerhans".  
En "Advances in Cytoparmacology". (Bleccoselli F. - Clemnti y J. Meldolesied) vol. 2, pag. 312-327. Ravar Pess, New York. 1.974.
- 65 HURLEY, H.J.; SHELLEY, W.B.: "The role of the myoepithelium of the human apocrine sweat gland".  
J.Invest. Dermatol. 22, 143-156. 1.954.
- 66 ITO, Y.: "Parotin: a salivary gland enzyme".  
Ann. N.Y. Acad. Scien. 85, 228-312. 1.960.

- 67 TCHIKAWA, A.: "Fine structural changes in response to homanol stimulation of the perfused canine pancreas".  
J. Cell. Biol. 24, 369-385. 1.965.
- 68 JACOBY, F.; LEESAN, C.R.: "The postnatal development of the rat submaxillary gland".  
J. Ant. (Lond). 93, 201-216. 1.959.
- 69 JAMIRSON, J.D.; PALADE, G.E.: "Condensing Vacuola - conversion and zymogen granule discharge in pancreatic exocrine cells metabolic studies".  
J. Cell. Biol. 48, 503-522. 1.971.
- 70 JENKINS, G.N.: "The Physiology and Biochemistry of the Mouth".  
Blackwell Scientific Publication. Londres. 1.978.
- 71 JOUNG, J.A.; VAN LENNEP, E.N.: "The morphology of salivary glands".  
Academic Press. Inc. New York. 1.979.

- 72 KANDA, T; MAYFIELD, E.D.; GHIDOM, S.J.: "Ultrastructural alterations in submaxillary cells following isoproterenol administration: A new form of secretion granule".  
Exp. Molec. Path. 9, 189-196. 1.968.
- 73 KIM, S.K.; NASLETI, C.E.; HAN, S.S.: "The Secretion Processes in Mucaus and Serous secretory Cells of the Rat Sublingual Gland".  
J. Ultrastruct. Res. 38, 371-389. 1.972.
- 74 KOENIG, M.: "The SALPS of storage Granules".  
En "Cytopharmacology of secretion". (Cecconelli, B.; Clementi, F.; Meldolesi, J.), pag. 273-301. Raven Press (Nueva York). 1.974.
- 75 LONGLEY, J.N.: "On the reaction of cells and nerve endings to certain poisons (nerve endings and receptive substance)".  
J. Phisiol. 33, 374-380. 1.905.

- 76 VAN LENNEP, E.N.; KENNERSON, A.R.; COMPTON, J.: -  
"The ultrastructure of the sheep parotid gland".  
Cell. Tiss. Res. 179, 377-392. 1.977.
- 77 LEVI-MONTALCINI, R. y ANGELETTI, P.V.: "Growth con-  
trol of the sympathetic system by a specific pro-  
tein factor".  
Quart. Rev. Biol. 36, 99-108. 1.961.
- 78 LEVI-MONTALCINI, R.y ANGELETTI, P.V.: "Hormonal -  
control of the NGF content in the submaxillary -  
glands of mice".  
En "Salivary Glands and Their Secretions". (L.M. -  
Sreebny and J. Meyer ed.) pag. 129-141. Pergamar,-  
Oxford. 1.964.
- 79 LEVI-MONTALCINI, R. y COHEN, S. : "Effects of the  
extract of the mouse submaxillary salivary glands  
on the sympathetic system of manurals".  
Am. N.Y. Acad. Sci. 85, 324-341. 1.960.

- 80 LUNDVALL, J.; HOLMBERG, J.: "Dynamics of saliva secretion and tissue volume changes densy parasympathetic stimulation in the constant flow perfused - cat submandibular gland".

Acta Phisiol. Scand. 102, 382-384. 1.978.

- 81 MARTIN, C.J.; YOUNG, J.A.: "A microperfusion investigation of the effects of a sympathomimetic and a perassymphomimetic drug on water and electrolyte-fluxes in the main duct of the rat submaxillary - gland".

Pfluegers Arch. 327, 303-323. 1.971.

- 82 MARTINEZ-HERNANDEZ, B.; NAKANE, P.R.; PIERDE, G.B.: "The secretory granules of the acinar cells of - the mouse submaxillary gland".

Amer. J. Anat. 133, 259-267. 1.972.

- 83 MASON, D.K.; CHISHOLM, D.M.: "Salivary glands in - health and Disease".

W.B. Saunders Company Ltd. London-Philadepphia-Toronto . 1.975.

- 84 MATTHEWS, R.W.: "Studies of the granular convoluted tubule in the rat submandibular gland (special issue)".  
J. Dentral. Res. 53, 143. 1.974.
- 85 MATTHWS, R.W.: "The effects of autonomic stimulation upon the rat submandibular gland".  
Arch. Oral. Biol. 19, 989-994. 1.974.
- 86 MENAKER, L.; JAMES, H.; SHEETZ, A.B.; CHARLES, M. COBB; JUAN M. NAVIA: "Gel Electrophoresis of Whole Sa l i v a and Associated Histologic Changes in Submandibu lar Glands of Isoproterenol-Treated Rats".  
Lab. Invest. 30, 341-349. 1.974.
- 87 J. MERCHAN; LUISA GARCIA COHEN; MIGUEL MERCHAN; M<sup>a</sup> DOLORES LUDEÑA: "Estudios electromicroscópico del ó r g a n o d e G o r t i d e l c o b a y a M é t o d o s d e E s t u d i o".  
Actas primer congreso nacional de histología. Zaragoza . 1.980.

- 88 MIRA, E.; GERZELLI, G. DE PICEIS, P; VIDI, J.: "Histofunctional changes in isoproterenol enlarged submaxillary glands of adults male rats".  
Acta. Anat. 80, 235-249. 1.971.
- 89 MONTCASTLE, V.B.: "Fisiología General".  
Segunda Edición C.V. Mosby Co. San Luis. 1.977.
- 90 NAUGHTON, M.A.; KOCH, J.; HOFFMAN, H.; BENDER, V.; HAGOPIAN, H. y HAMILTONE, E.: "Isolation and activity of a thymocyte-transforming factor from the mouse submaxillary gland".  
Exp. Cell. Res. 37, 95-103.
- 91 NORBERG, K.A.; OLSON, L.: "Adrenergic Innervation of the Salivary Glands in the Rat".  
Z. Zellforsch. 68, 183-189. 1.965.

- 92 NORBERG, K.A.; HOKFELT, T.; ENEROTH, C.M.: "The autonomic Innervation of Human Submandibular and Parotid Glands".  
J. Neuro-Visc. Relat. 31, 280-290. 1.969.
- 93 OHLIN, P.: Secretory responses of innervated and denervated submaxillary glands of rats".  
Acta Univ. Lund. Sect. 11. 23, 1-12. 1.965.
- 94 PALADE, G.E.: "Intracellular aspects of the process of protein synthesis".  
Science. 189, 347-358. (Nobel Prize lecture, Stockholm, 1.974).
- 95 PALADE, G.E.; SIERFVITZ, P.; CARO, L.G.: "Structure chemistry and function of the pancreatic exocrine cell".  
En "The Exocrine Pancreas". (A.V.S. de Revck and M. P. Cameron, eds.). pag. 23-55. Churchill-London. 1.962.

- 96 PEREC, C.J.; STEFANO, F.; BARRIOENDO, M.: "Long-Casting superensivity af ter 6-hydroxi dopamine in the submaxillary gland of the rat".  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 186/2, 220-229. 1.973.
- 97 RADLEY, J.M.: "Ultrastructural Changes in the Rat Submaxillary Gland Following Isoprenaline".  
Z. Zellforsch. 97, 126-211. 1.969.
- 98 ROBISON, G.A. y COLS.: "Cyclic A M P ".  
Academic Press., Inc., New York. 1.971.
- 99 ROLL, T.N.; GILMAN, A.G. (Eds.): "The role of cyclic A M P in the nervous system".  
Neurosci. Res. Prog. Bull. 8, 221-323. 1.970.

- 100 ROTHMAN, S.S.: "Protein transport by the pancreas".  
Science. 190, 747-753. 1.975.
- 101 SCHNEYER, L.H.: "Sympathetic control of Na, K transport in perfused submaxillary mainduct of rat".  
Amer. J. Physiol. 230, 341-345. 1.976.
- 102 SCHNEYER, L.H.; FLATLAND, R.T. : "Evaluation of a reservoir in the main excretory duct of rat submaxillary gland".  
J. Appl. Physiol. 39, 519-522. 1.975.
- 103 SCHRAMM, M.; SELINGERT, Z.: "The function of  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic receptors and a cholinergic receptor in the secretory cell of rat parotid gland".  
En "Advances in Cytopharmacology (B. Ceccorrelli, F. Clementi y J. Meldolesi, eds.). Vol. 2, pag. 29-32.-  
Raven Press, New York. 1.974.

- 104 SCHWAB, M.E.; STOCHEL, K. y THOENEN, H.: "Immunocytochemical localization of nerve growth factor (NGF) - in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy".  
Cell. Tiss. Res. 169, 289-299. 1.976.
- 105 SCOTT, B.L.; PEASE, D.C.: "Electron Microscopy of the Salivary and Lacrimal Glands of the Rat".  
Anat. J. Anat. 104, 115-161. 1.959.
- 106 SEIFERT, G.: "Experimentelle Proteo-Oxydationen in der Kopfspeicheldrüse".  
Beitr. Path. Anat. 126, 280-299. 1.962.
- 107 SELINGER, Z.; SKARONI, Y.; SCHRAMM, M.: "Modification of the secretory granule during secretion in the rat parotid gland".  
En "Advances in Cytopharmacology". (B. Ceccarelli, F. Clementi y J. Meldolesis, ed.). Vol. 2, pag. 23-28.  
Raven Press, New York). 1.974.

- 108 SELYE, H.; VEILLEUX, R.; CANTIN, M.: "Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol".  
Science 133, 44. 1.961.
- 109 SETSER, M.E.; SPICER, S.S. ; SIMSON, J.A.V.; MARTINEZ, J.R.: "Altered Granule Discharge Amylase Secretion of Parotid Glands in Reserpine-Treated Rats".  
Lab. Invest. 41, 256-264. 1.979.
- 110 SHACKLEFORD, J.M.; SCHNEYER, L.H.: "Ultrastructural Aspects of the Main Excretory Duct of Rat Submandibular Gland".  
Anat. Rec. 169, 679-696. 1.971.
- 111 SIMSON, J.A.V.: "Evidence of Cell Damage in Rat Salivary Glands after Isoproterenol".  
Anat. Rec. 173, 437-452. 1.972.

- 112 SIMSON, J.A.V.; SPICER, S.S.; HALL, B.J.: "Morphology and Cytochemistry of Rat Salivary Gland Acinar - Secretory Granules and Their Alteration by Isoproterenol. I. Parotid Gland".  
J. Ultrastruc. Res. 48, 465-482. 1.974.
- 113 SIMSON, J.A.V.; SPICER, S.S.; SETSER, M.E.; MARTINEZ, J.R.: "Histochemistry and Ultrastructure of Rat Submandibular Acinar Cells". Effects Chronic Reserpine - on Secretion.  
Lab. Invest. 39, 157-166. 1.978.
- 114 STEIN, G.; BASERGA, R.: "The synthesis of acidic nuclear proteins in the prereplicative phase of the - isoproterenol stimulated salivary gland".  
J. Biol. Chem. 245, 6097. 1.970.
- 115 TAKAHAMA, M. ; BARKA, T.: "Electro microscopic alterations of submaxillary gland produced by isoproterenol".  
J. Ultrastruct. Res. 17, 452, 474. 1.967.

- 116 TAMARIN, A.; SREEBNY, L.M.: "The Rat Submaxillary -  
Salivary Gland. A correlative study by light and Elec-  
tron Microscopy".  
J. Morph. 117, 295-352. 1.965.
- 117 TANDLER, B.; DENNING, C.R.; MANDEL, I.D.; KUTSCHER,-  
A.: "Ultrastructure of human labio salivary glands.  
III Myoepithelium and ducts".  
J. Morph. 130, 227-245.
- 118 THULIN, A.: "Motor and secretory effects of automa-  
tic nerves and drugs in the rat submaxillary gland".  
Acta. Physiol. Scand. 92, 217-223. 1.974.
- 119 THULIN, A.: "Motor and secretory effects of nerves  
on the parotid gland of the rat".  
Acta Physiol. Scand. 96, 606-611. 1.976.

- 120 TRUMP, B.F.; BULGER, R.E.: "New ultrastructural characteristics of cells fixed in a glutaraldehyde-osmium tetroxide mixture".  
Lab. Invest. 15, 368-379. 1.966.
- 121 VAN VEUROAIJ, W.J.; KUJPER-LEUSTRA, A.H.; KRAMER, M. F.: "Interrelation ship between aminoacid pools and protein synthesis in the rat submandibular gland".  
Biochim. Biophys. Acta. 312, 392-392. 1.973.
- 122 WARSHAWSKY, H. ; LEBLONO, C.P.; DROZ, B.: "Synthesis and migration of proteins in the cells of the exocrine pancreas as revealed by specific activity determination from radioautography".  
J. Cell. Biol. 16, 1-23. 1.963.
- 123 WEIMAR, V.L. y HARAGUCHI, K.H.: "A potent new mesodermal growth factor from mouse submaxillary gland. A quantitative, comparative study with previously described submaxillary gland growth factors".  
Physiol Chem. Phys. 7, 7-21. 1.975.

- 124 WILBORN, W.H.; SHACKLEFORD, J.M.: "The citology of submandibular glands of the opossum".  
J. Morph. 128, 1-34. 1.969.
- 125 WILBORD, W.H.; SCHNEYER, C.A.: "Effect of Postganglionic Sympathectomy on the ultrastructure of the Rat Parotid Gland".  
Z. Zellforsch. 130, 471. 480. 1.972.
- 126 YAMASHINA, S.; BARKA, T.: "Development of endogenous peroxidase infetal rat submandibular gland".  
J. Histochem Cytochem. 21, 42-50. 1.973.
- 127 YOUNG, J.A. MARTIN, C.J.: "The effect of sympatho- and a parosympathomimetic drug on the electrolyte concentrations of primary and final saliva in the rat submaxillary glands".  
Pflugers Arch. 327, 285-302. 1.971.

158.3

---

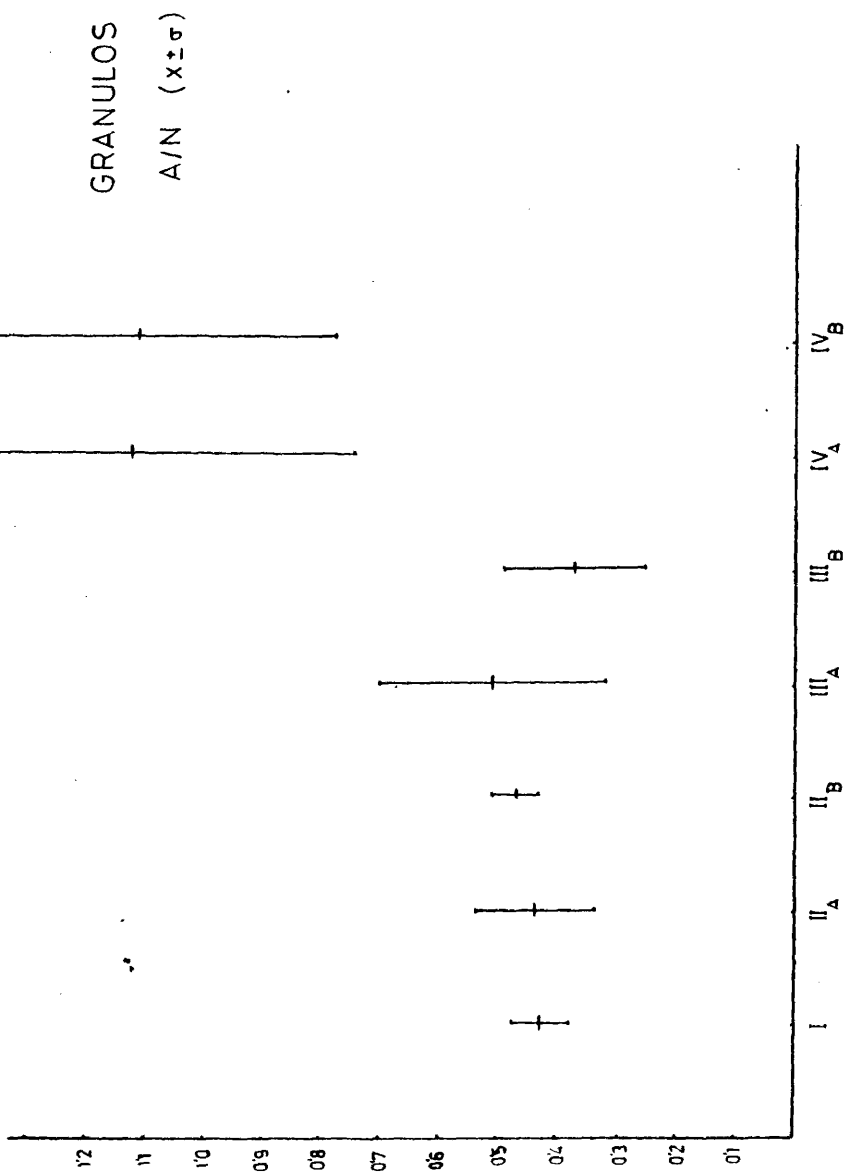
---

VII. GRAFICOS, TABLAS Y FIGURAS

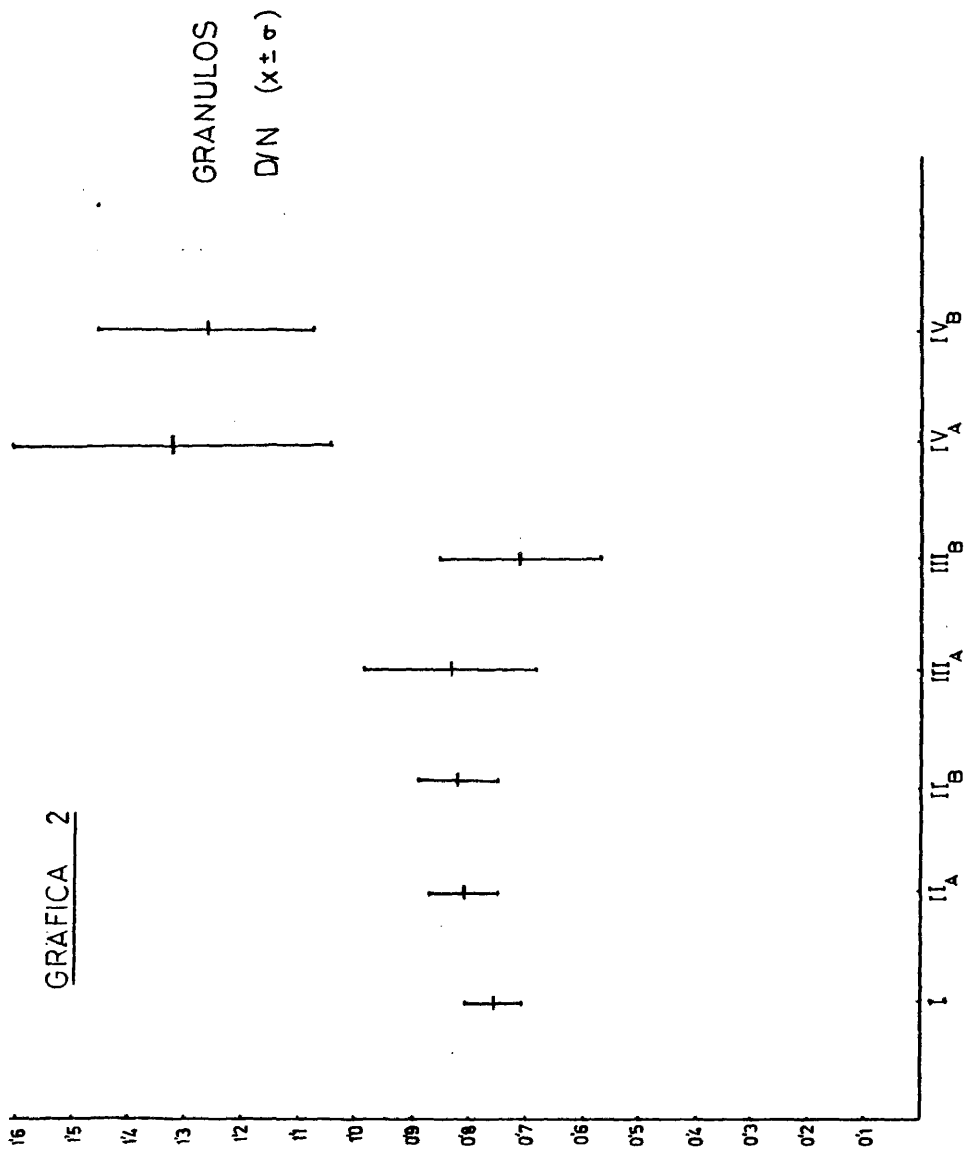
---

---

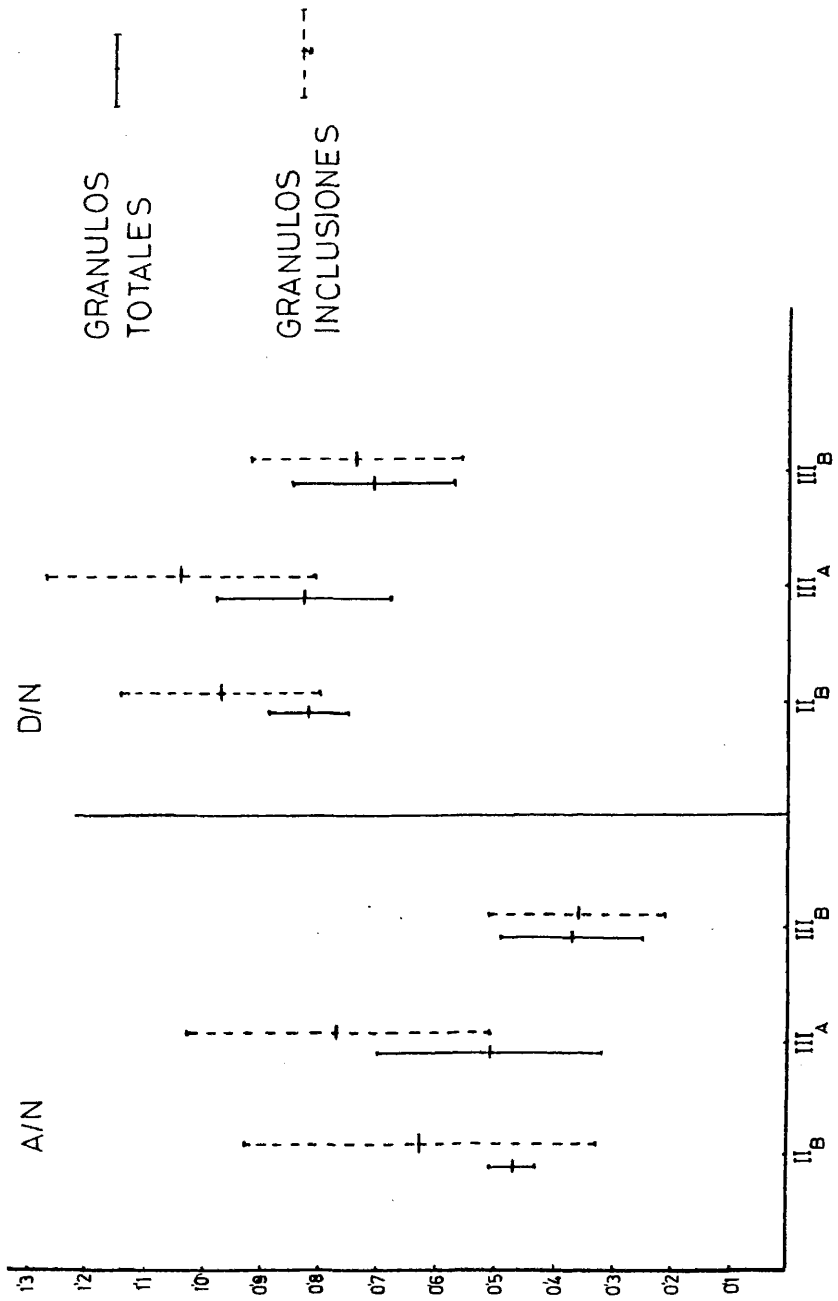
GRAFICA 1



GRAFICA 2



GRAFICA 3



M.O. TECNICAS

	PAS	A-A	PAS-AA
GRUPO I	+/-	-	+/- magenta
GRUPO II <sub>A</sub>	+	+	morado
GRUPO II <sub>B</sub>	+	+	morado
GRUPO III <sub>A</sub>	+	+	morado
GRUPO III <sub>B</sub>	+	+	morado
GRUPO IV <sub>A</sub>	+/-	+	+/- morado
GRUPO IV <sub>B</sub>	+/-	+	+/- morado

TABLA II  
GRANULOS A/N

GRUPOS	I	II <sub>A</sub>	II <sub>B</sub>	III <sub>A</sub>	III <sub>B</sub>	IV <sub>A</sub>	IV <sub>B</sub>
I	X	NS	NS	NS	NS	P<0001	P<0001
II <sub>A</sub>		X	NS	NS	NS	P<0001	P<0001
II <sub>B</sub>			X	NS	P 0025	P<0001	P<0'001
III <sub>A</sub>				X	NS	P<0001	P<0001
III <sub>B</sub>					X	P<001	P<0001
IV <sub>A</sub>						X	NS
IV <sub>B</sub>							X

GRANULOS D/N

GRUPOS	I	II <sub>A</sub>	II <sub>B</sub>	III <sub>A</sub>	III <sub>B</sub>	IV <sub>A</sub>	IV <sub>B</sub>
I	X	P<005	P<005	NS	NS	P<0001	P<0001
II <sub>A</sub>		X	NS	NS	P<005	P<0001	P<0001
II <sub>B</sub>			X	NS	P<005	P<0001	P<0001
III <sub>A</sub>				X	NS	P<0001	P<0001
III <sub>B</sub>					X	P<0001	P<0001
IV <sub>A</sub>						X	NS
IV <sub>B</sub>							X

TABLA IV

D/N	II <sub>B</sub>	III <sub>A</sub>	III <sub>B</sub>
II <sub>B</sub>	X	NS	P<001
III <sub>A</sub>		X	P<0005
III <sub>B</sub>			X

GRANULOS  
INCLUSIONES

TABLA V

A/N	II <sub>B</sub>	III <sub>A</sub>	III <sub>B</sub>
II <sub>B</sub>	X	NS	P<0025
III <sub>A</sub>		X	P<0001
III <sub>B</sub>			X

GRANULOS TOTALES

D/N	II <sub>B</sub>	III <sub>A</sub>	III <sub>B</sub>
II <sub>B</sub>	NS	X	X
III <sub>A</sub>	X	P<0025	X
III <sub>B</sub>	X	X	NS

GRANULOS  
INCLUSIONES

GRANULOS TOTALES

A/N	II <sub>B</sub>	III <sub>A</sub>	III <sub>B</sub>
II <sub>B</sub>	NS	X	X
III <sub>A</sub>	X	P<002	X
III <sub>B</sub>	X	X	NS

GRANULOS  
INCLUSIONES

166

Fig. 1

Grupo I. Fotografía de microscopía óptica que muestra un aspecto general de la glándula con los acinos conteniendo células seromucosas (M.O., 40x).

Fig. 2

Grupo I. Se aprecian con mas detalle la gran variedad de tamaño y forma de los acinos. Las células contienen un núcleo prominente situado en la porción basal. El citoplasma contiene unas granulaciones muy finas. (M.O., 100x).

168



Fig. 3

Grupo I. Células acinares que presentan un núcleo (N) situado en el tercio basal, retículo endoplásmico abundante y gran cantidad de gránulos de secreción (G) con un contenido homogéneo. El estroma intermedio contiene un capilar sanguíneo (C) y abundantes fibras colágenas (M.E., 9000x).

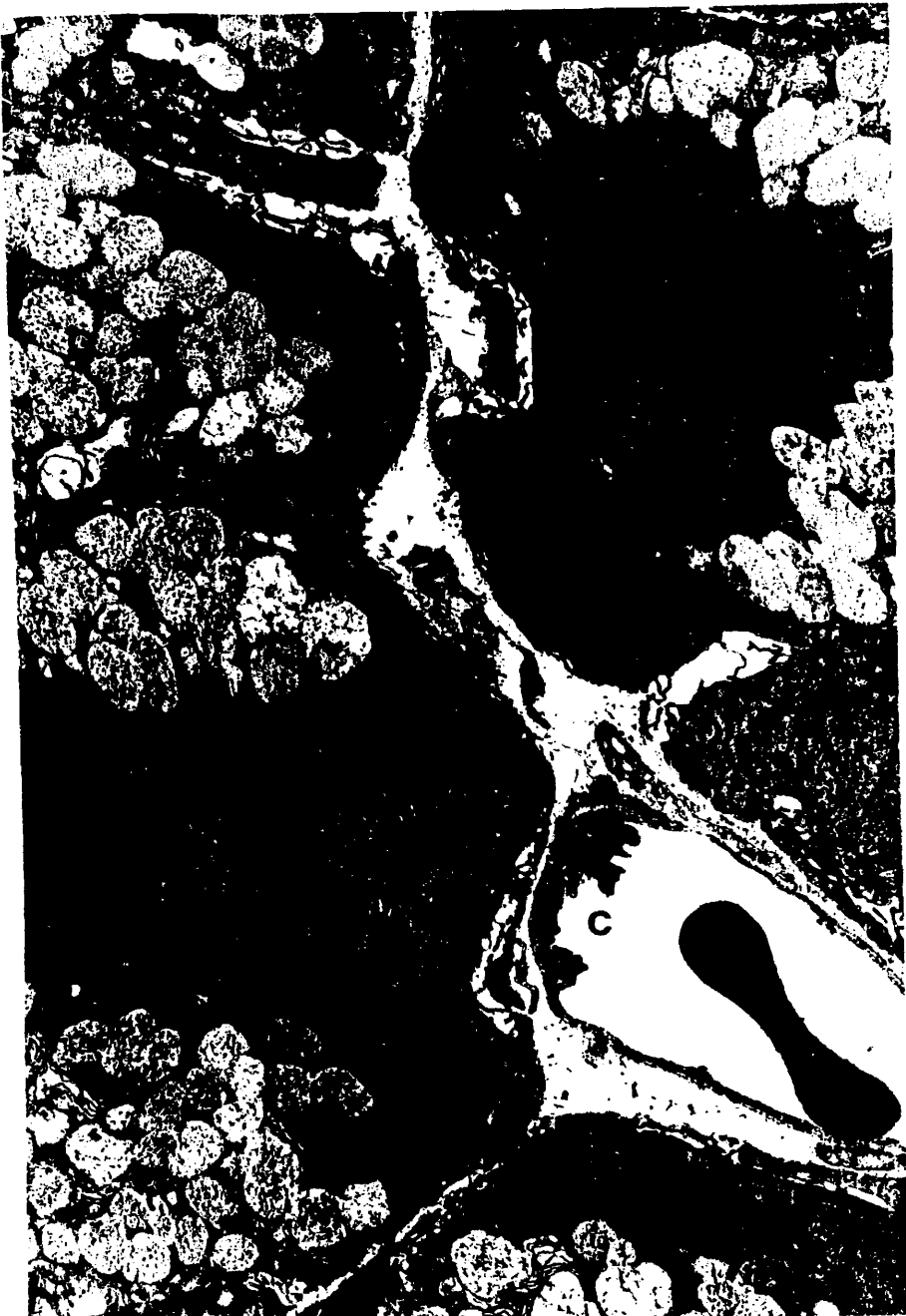


Fig. 4

Grupo I. Células acinares que presentan gran cantidad de gránulos de secreción con un contenido homogéneo y aparato de Golgi (A) prominente. Las membranas plasmáticas laterales presentan un recorrido sinuoso, a una altura media se observa la presencia de un canalículo lateral (C). Asimismo, se observa una célula mioepitelial (M) con su núcleo y sus prolongaciones citoplasmáticas. (M.E., 9.000x).



Fig. 5

Grupo I. Fotografía ultraestructural que muestra células acinares con un retículo endoplásmico -- con cisternas ensanchadas e irregulares (R). Así mismo se aprecia una célula de gránulos oscuros (O). (M.E., 12.000x).



Fig. 6

Grupo I. Area de gránulos de secreción con un contenido homogéneo finamente granular, excepto en un gránulo en que aparece un punteado más prominente (P). Asimismo, se aprecia una vacuola con cuerpos remediando figuras de mielina (M). (M.E., - 24000x).

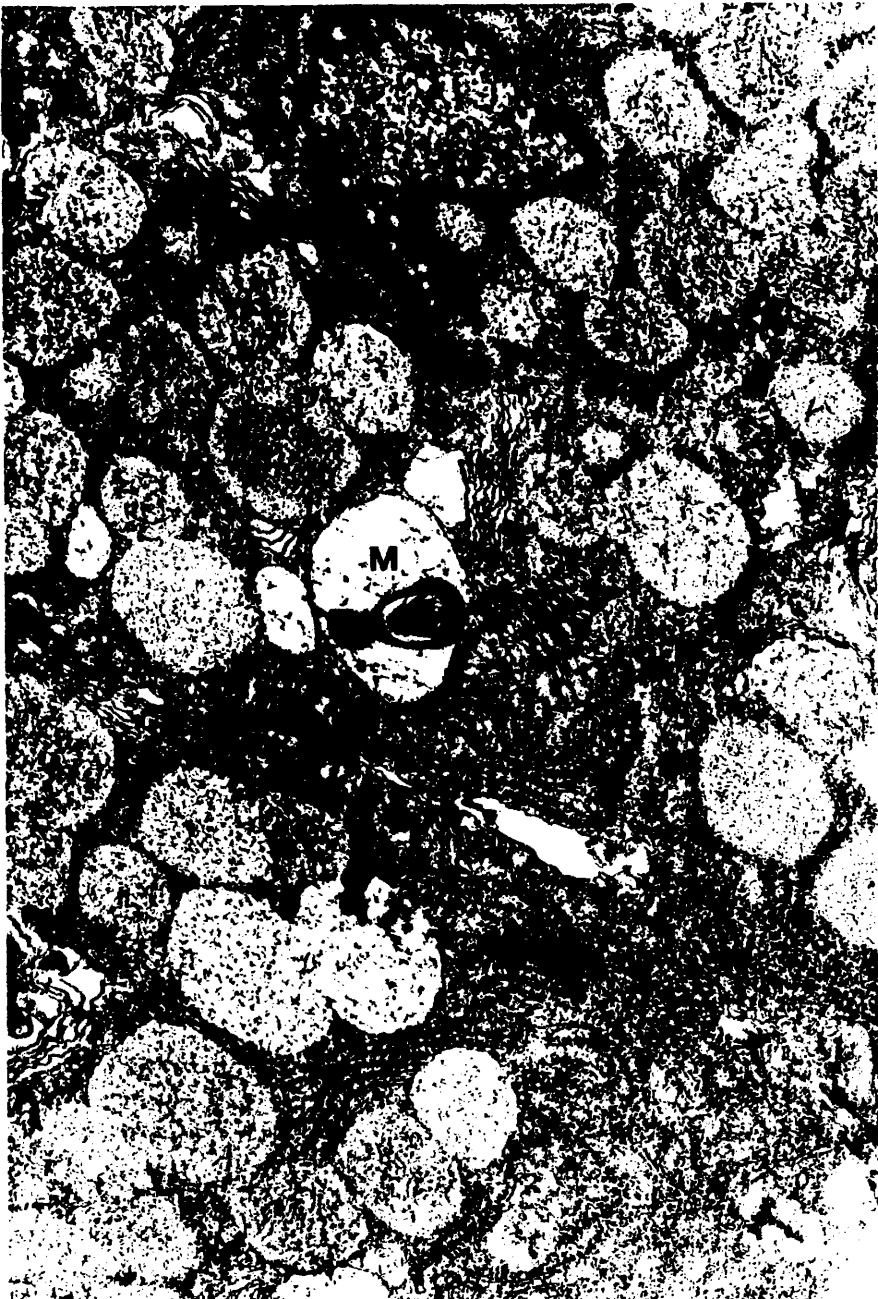


Fig. 7

Grupo II-A. Células acinares que presentan núcleos prominentes y gran cantidad de gránulos con un contenido finamente granular y con tendencia a la fusión. El aparato de Golgi es prominente (A). Se observan canalículos laterales separando las células (L). (M.E., 9000x).

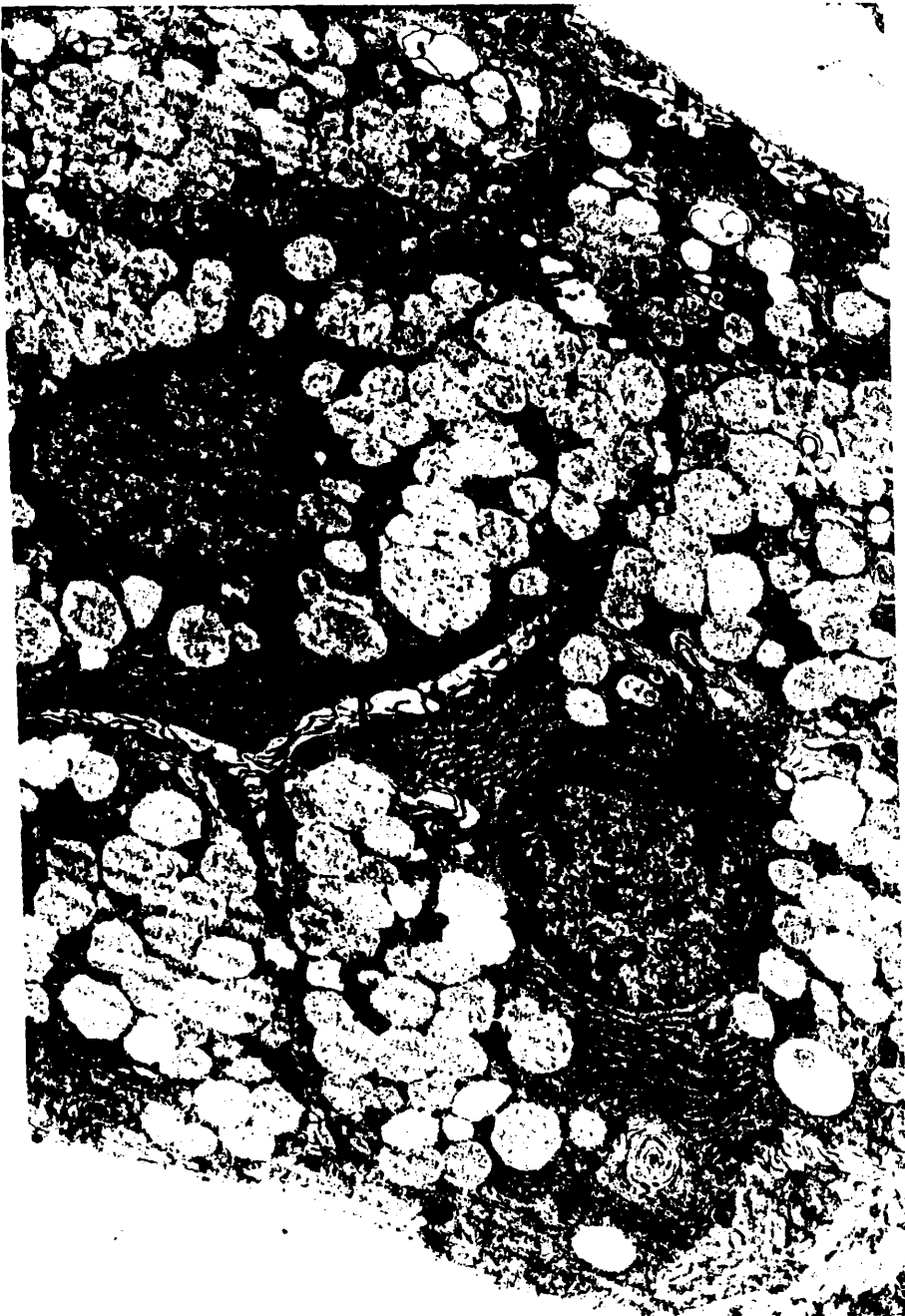


Fig. 8

Grupo II-A. Area de células acinares en la que se aprecia como el contenido de los gránulos de secreción presenta unas inclusiones de forma granular (G) ó laminar (L). (M.E., 9.000x).



Fig. 9

Grupo II-A. Area de células acinares con gránulos de secreción con un contenido finamente granular en la cual se aprecia la presencia de una célula de granos oscuros (0) replegada en la proximidad de la membrana basal, pero en contacto con la luz acinar y con gran cantidad de gránulos en su cito plasma. (M.E., 12.000x).

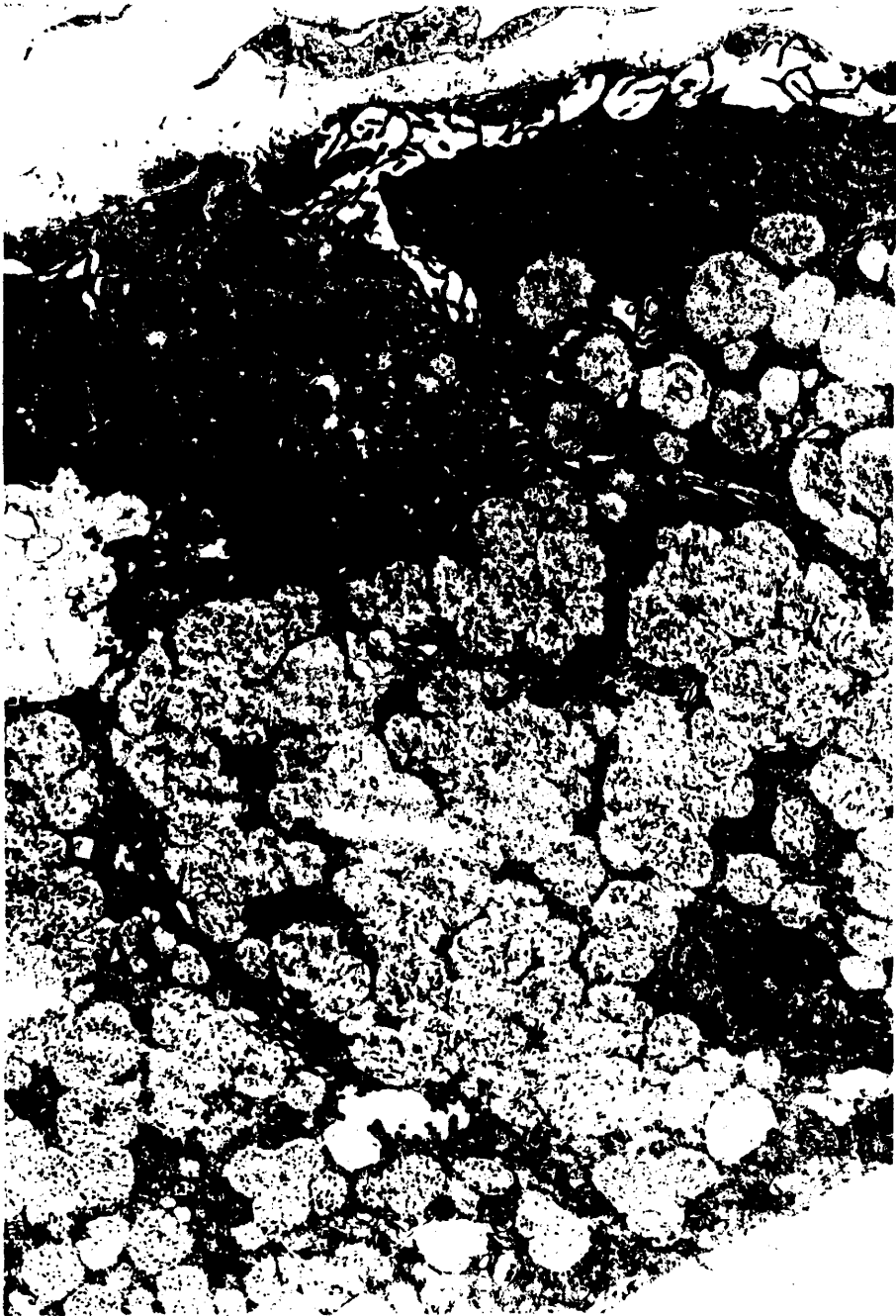


Fig. 10

Grupo II-B. Células acinares cuyos gránulos de se  
creción presentan inclusiones granulares en unas  
zonas más agrupadas (A) y en otras menos (B). Así  
mismo, se observa un cuerpo multivesicular (M).  
(M.E., 9.000x).



Fig. 11

Grupo II-B. Célula binucleada cuyos gránulos de secreción presentan inclusiones granulares y laminares típicas y un gránulo donde se aprecia una transición entre ambas formas (T). (M.E., 1.500x).



Fig. 12

Grupo II-B. Fotografía ultraestructural en la cual se aprecia una célula mioepitelial (E) - prominente que contiene abundantes filamentos y dos células de granos oscuros (O). (M.E., 9.000x).



Fig. 13

Grupo III-A. Células acinares que presentan unos gránulos con inclusiones granulares abundantes y laminares escasas (L). El citoplasma presenta -- una vacuola con un contenido remedando figuras - de mielina (F). (M.E., 15.000x).



Fig. 14

Grupo III-A. Célula acinar que presenta un retículo endoplásmico (R) y un aparato de Golgi (A) bien desarrollados. Los gránulos de secreción presentan inclusiones abundantes, siendo la mayoría del tipo laminado. (M.E., 15.000x).



Fig. 15

Grupo III-A. Célula acinar binucleada con un citoplasma que presenta un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi bien desarrollado, unos gránulos de secreción sin inclusiones y una vacuola (V) con un contenido que remeda figuras de mielina. Además presenta unas dehiscencias intercelulares (I) muy prominentes con las células adyacentes. Asimismo observamos una célula mioepitelial (E) prominentemente introducida entre dos células acinares. (M.E., 9.000x).



Fig. 16

Grupo III-A. Diversos aspectos de las células de granos oscuros, los gránulos son mas numerosos. Estas células se pueden encontrar relegadas en la membrana basal (A), en contacto con la luz -- acinar (B) ó incluso en el conducto intercalado (C) (A y B, M.E., 10.000x; C, M.E., 6.000x).

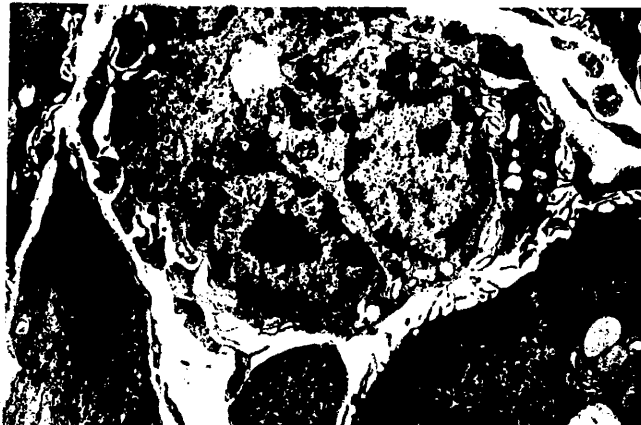
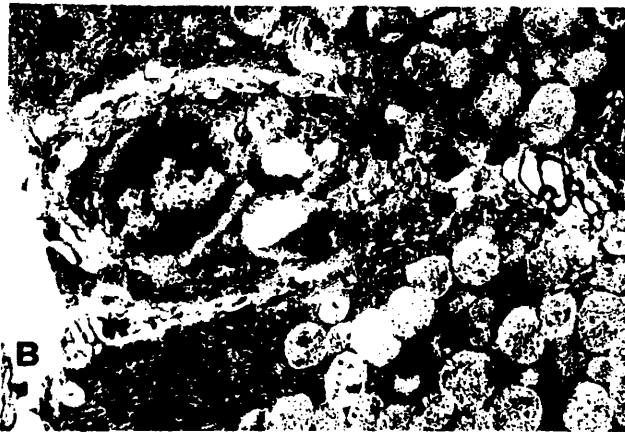


Fig. 17

Grupo III-B. Célula acinar binucleada que presenta unas dehiscencias intercelulares (I) muy prominentes con las estructuras adyacentes. El citoplasma contiene abundante retículo endoplásmico y aparato de Golgi prominente. Los gránulos de secreción presentan inclusiones con gran frecuencia, la mayoría del tipo laminado. (M.E., 9.000x).

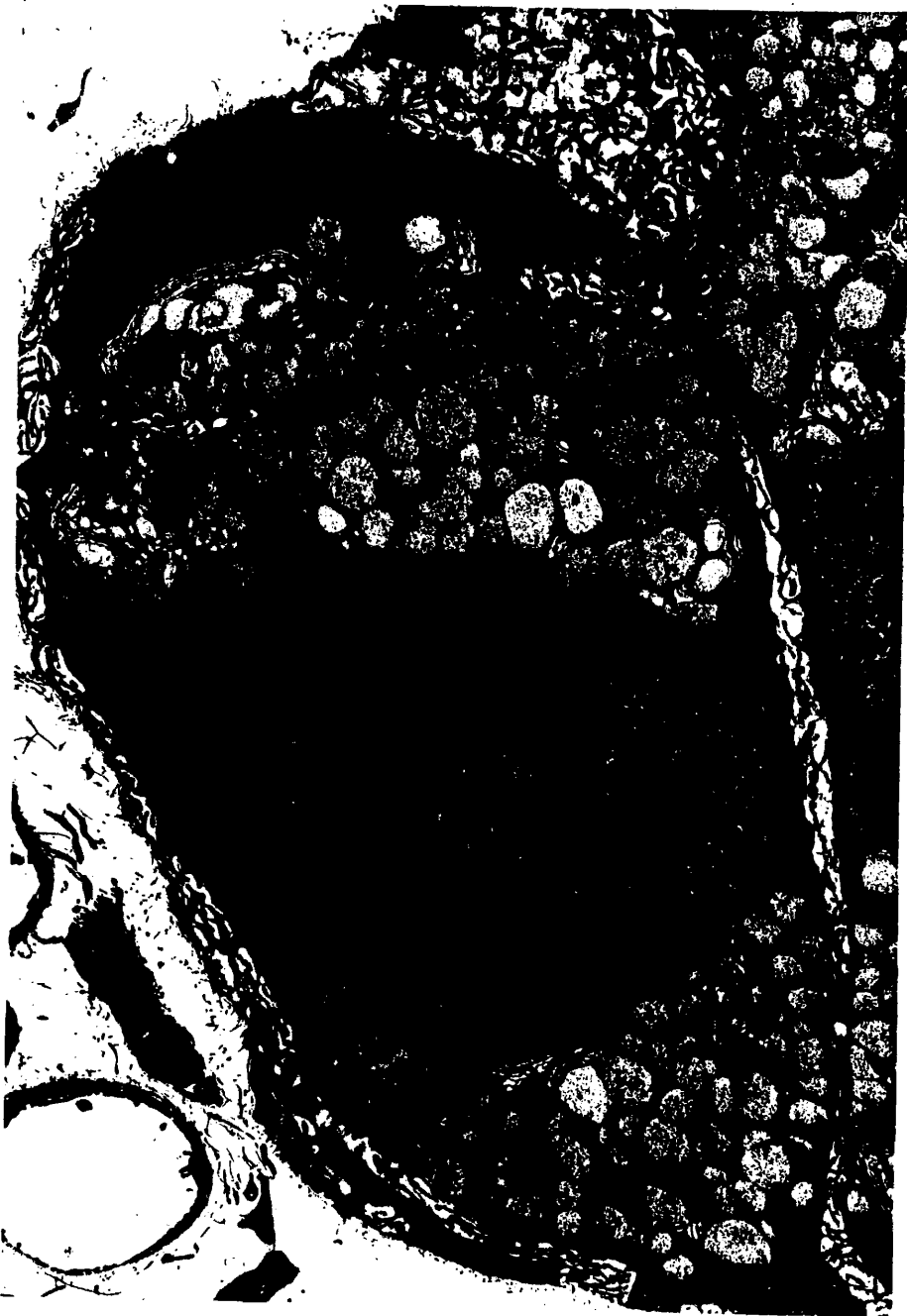


Fig. 18

Grupo III-B. Acino en el cual se aprecia una célula binucleada (N). Existen dehiscencias intercelulares (I) prominentes con gran número de microvellosidades. Los gránulos de secreción presentan inclusiones del tipo granular (M.E.,9.000x).



Fig. 19

Grupo III-B. Fotografías ultraestructurales que muestran dos áreas de gránulos con inclusiones a gran aumento. Se aprecian inclusiones laminares (L) y granulares (G) típicas. (A, M.E., 30.000x; B, M.E., 20.000x).

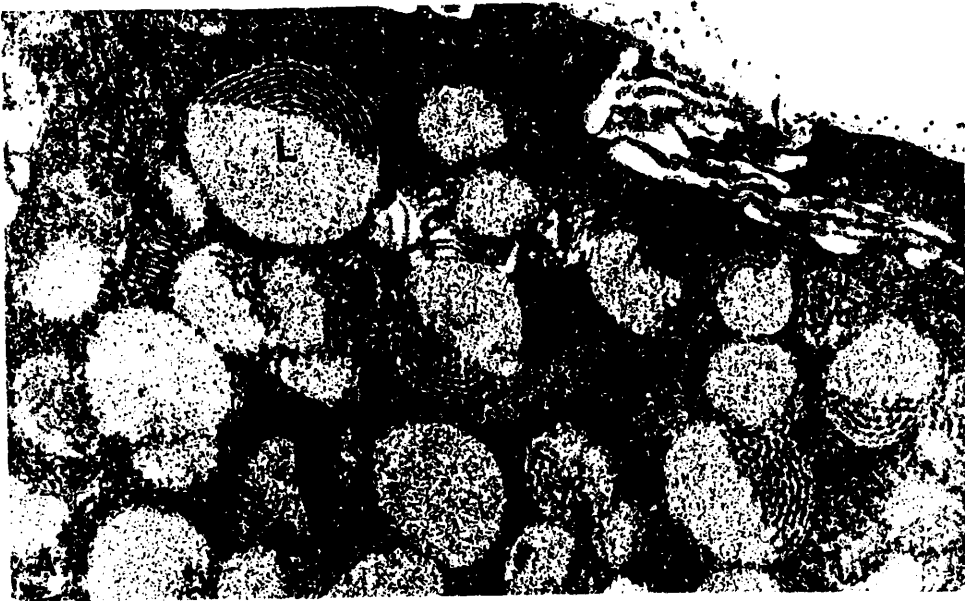


Fig. 20

Grupo III-B. Porción de un acino que muestra unas dehiscencias intercelulares (D) prominentes. La célula mioepitelial (E) es prominente con un gran número de filamentos. Además podemos observar una célula agranular (A) de pequeño tamaño y otra célula de grano oscuro (S) en que estos se encuentran aumentados en número (M.E., 12.000x). En el recuadro observamos otra célula con estas mismas características (M.E., 60.000x).



Fig. 21

Grupo IV-A. Fotografía ultraestructural de bajo aumento que muestra la configuración de un acino. Las células acinares muestran unos gránulos de secreción abundantes y con un contenido homogéneo sin inclusiones. Se observan dos indentaciones profundas (I) de la superficie del acino en cuyo fondo existen gran cantidad de fibras - colágenas (M.E., 4.500x).



Fig. 22

Grupo IV-A. Células acinares que presentan unos gránulos de secreción con un contenido homogéneo en algunos parece destacar algunas inclusiones granulares (G) o laminadas (L), pero son poco prominentes. La luz del acino (A) es de gran tamaño. En la proximidad se observan dos terminaciones nerviosas (T) con unas vesículas con una o varias inclusiones electrondensas (M.E., 15.000x).



Fig. 23

Grupo IV-A. En estas microfotografías apreciamos signos de contracción mioepitelial (E) introduciéndose las prolongaciones de la célula profundamente entre las células acinares (A, M.E., 6.000x) o produciendo una indentación en la superficie celular (B, M.E., 10.000x).

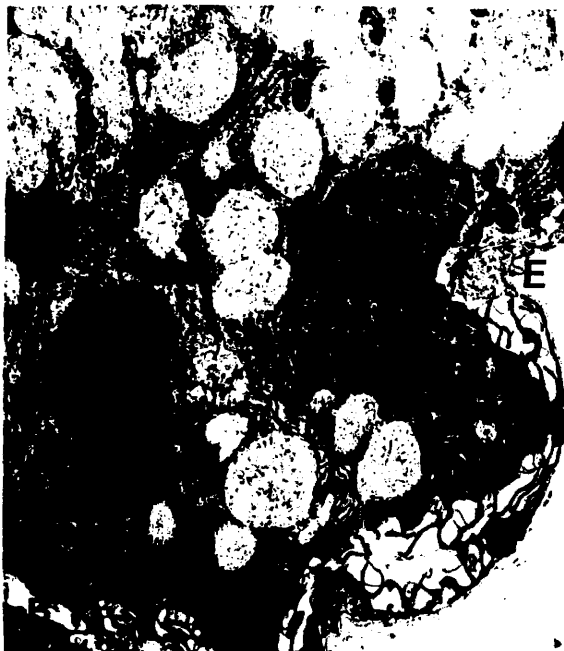


Fig. 24

Grupo IV-A. Célula de grano oscuro (O) cuyo citoplasma contiene cisternas dilatadas de retículo endoplásmico (R) y numerosos gránulos, el núcleo redondeado ocupa gran parte del volumen celular. La luz del acino (A) se presenta aumentada de volumen. El citoplasma de las células acinares adyacentes presenta unos gránulos de secreción (S) -- que en alguna ocasión presenta un granulado más prominente (M.E., 9.000x).



Fig. 25

Grupo IV-A. Porción de citoplasma de una célula de grano oscuro que muestra evidentes signos de secreción hacia la luz. El gránulo momentos antes de la excreción presenta un halo claro en la periferia (O). Los gránulos de secreción de las células adyacentes presentan un contenido homogéneo excepto en una zona en que hay algunas inclusiones laminadas (I). (M.E., 24.000x).

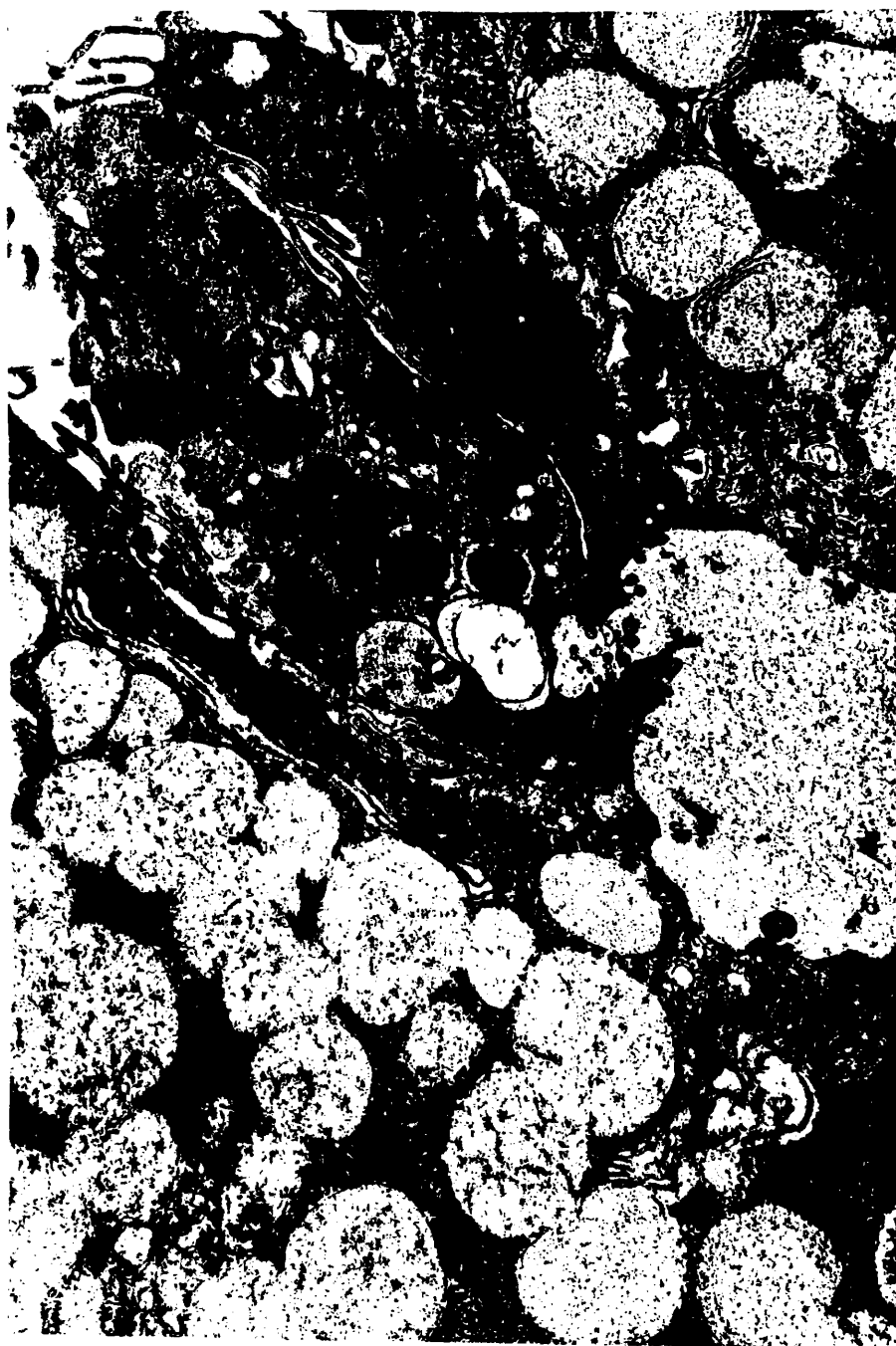


Fig. 26

Grupo IV-A. Fotografía ultraestructural que muestra en el centro una luz acinar dilatada (L), en la porción superior se observa una célula de grano oscuro (O) con evidentes signos de secreción y en la porción inferior una célula (R) con abundantes gránulos en su interior que presentan un contenido de una densidad intermedia entre los gránulos oscuros y los de secreción. (M.E., 9.000x).



Fig. 27

Grupo IV-B. Imagen que muestra el citoplasma de dos células acinares con unos gránulos de secreción (G) con un contenido homogéneo. Asimismo, observamos dos células de grano oscuro (S) con un núcleo voluminoso, un citoplasma con cisternas dilatadas de retículo endoplásmico y abundantes gránulos oscuros en la proximidad de la luz acinar (L). Asimismo observamos una célula mioepitelial con un desmosoma (flecha) en la zona de contacto con una de estas células (M.E., 12.000x).



Fig. 28

Grupo IV-B. Células acinares cuyos gránulos de secreción presentan un contenido homogéneo, aunque se aprecian algunas zonas con inclusiones laminares o granulares poco evidentes (I). (M.E. 12.000x). En el recuadro observamos una terminación nerviosa cuyas vesículas sinápticas presentan inclusiones electrondensas en su interior (M.E., 8.000x).



Fig. 29

Grupo IV-B. Célula acinar que presenta unos gránulos de secreción con un contenido homogéneo y un núcleo que presenta una indentación en la cual se aloja la prolongación de una célula mioepitelial. (M). (M.E., 15.000x).



Fig. 30

Grupo IV-B. Se observa la presencia de una célula mioepitelial (M) con gran aumento de filamentos y cisternas de retículo endoplásmico rugoso abundante. Asimismo observamos una célula con un citoplasma con escaso retículo endoplásmico y algunas mitocondrias (T) pero sin gránulos de secreción. (M.E., 15.000x).



Fig. 31

Grupo IV-B. Fotografía ultraestructural que muestra una célula clara (C) en contacto con la luz - del acino, con un núcleo de gran volumen, escaso retículo endoplásmico, algunas mitocondrias y sin gránulos de secreción (M.E., 15.000x).

