

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E EMBRIOLOGÍA**  
**HUMANAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo embriológico de la glándula  
sublingual**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Alejandro Encinas Bascones**

DIRECTORES

**José Vicente Sanz Casado**  
**Antonio Bascones Martínez**

Madrid, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Anatomía y Embriología humanas**



**DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LA GLÁNDULA  
SUBLINGUAL**

**TESIS DOCTORAL**

**Alejandro Encinas Bascones**

**DIRECTORES**

**José Vicente Sanz Casado**

**Antonio Bascones Martínez**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Anatomía y Embriología humanas**

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas



**DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LA GLÁNDULA  
SUBLINGUAL**

TESIS DOCTORAL

D. Alejandro Encinas Bascones

Directores: PROF. Dr. D. José Vicente Sanz Casado

PROF. Dr. D. Antonio Bascones Martínez

Madrid, Abril de 2017

D. José Vicente Sanz Casado, Profesor Titular del Departamento de Anatomía y Embriología Humanas de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

D. Antonio Bascones Martínez, Profesor Emérito del Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucal) de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

**CERTIFICAMOS:** Que la Tesis Doctoral realizada bajo nuestra dirección por D. ALEJANDRO ENCINAS BASCONES, titulada: “ Desarrollo embriológico de la glándula sublingual”, reúne las condiciones de originalidad requeridas y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

El presente trabajo ha sido revisado por los que suscriben, encontrándolo apto para su presentación, lectura y defensa como Tesis Doctoral ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, firman el presente documento en Madrid, a seis de abril de dos mil diecisiete.

Fdo: Prof. Sanz Casado

Fdo: Prof. Bascones Martínez

*A MIS PADRES  
A MIS HERMANOS  
A MIS TÍOS  
A ELISA*

## AGRADECIMIENTOS:

El primer agradecimiento es a quienes debo que esta tesis haya prosperado tras 4 años de trabajo y a quienes desde el primer momento que me convertí en médico me animaron a ser Doctor: José Sanz y Antonio Bascones, dos referentes nacionales en la docencia universitaria, entregados a ella en cuerpo y alma desde jóvenes.

Sin mi madre jamás hubiera sido médico. A ella le debo todos mis éxitos en la carrera, en el MIR, en la residencia y en el actual trabajo, dado que en el fondo fue el artífice de aquel cambio fugaz de carrera universitaria. Su cara de felicidad al imponerme la beca de recién licenciado en el Auditorio de esta facultad en 2009 lo explicaba todo.

A mi padre le reconoceré siempre la habilidad e inteligencia con la que solucionaba y ayudaba en todos nuestros problemas. Por habernos educado en la cultura del esfuerzo, te debemos mucho Guille, Álvaro y yo.

A mis tíos maternos que siempre han seguido muy de cerca mis estudios y siempre han estado apoyando todas mis decisiones. A Guillerma y Pepa, que son como una madre más y nos han cuidado desde pequeños con mucho cariño.

En el plano de lo profesional, tengo que agradecer todo lo que soy en la actualidad a Manuel de Pedro. Parecerá un poco egoísta pero sin sus consejos, castigos y enseñanzas no hubiera llegado hasta esta meta o por lo menos no a pasos tan agigantados.

A Almudena, Arancha, Farzin, Jesús y Rafa, gracias por vuestro apoyo y protección durante los años de residencia y en esta nueva etapa como

compañeros que tenemos por delante. A los residentes, por el buen ambiente laboral que imponéis y por darnos un impulso diario para ser mejor profesionales. A María y Mar por vuestra buena organización en la consulta. A Oscar por tu amistad, estoy seguro de que nuestros caminos se juntarán dentro de poco.

Gracias a la ayuda administrativa tan eficaz de D<sup>a</sup> Ana Álvarez y al apoyo de D<sup>a</sup> Montse Juanilla en todas las tardes invertidas en el Departamento.

Y, como la amistad es algo más profundo que reírse un día a la semana con un grupo de personas, aquí va mi agradecimiento a todos ellos que “están siempre ahí” para lo bueno y para lo malo y que sabes que como son tantos años, será para siempre: Gracias Adrián, Alfonso, Andrés, Gonzalo, Héctor, Ignacio, Jaime, Jesús, Jose, Manuel, Miguel, Nicolás, Pablo y Rafael.

A Alfonso, Eduardo, José Rogelio, Juan y Pablo por ser el mejor estímulo en la carrera y enseñarme a ser mejor médico a través de vuestra amistad más sincera.

Finalmente, a Elisa, que ha sido en los últimos años el pequeño impulso que necesito día a día para mejorar como persona y dar lo mejor de mi mismo.

Gracias por tu ayuda en la puesta a punto de esta Tesis.

## ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina

BMP: Proteínas morfogenética de hueso

CS: Condroitin sulfato

EC: Etapas de Carnegie

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor de Factor de crecimiento epidérmico

Eda: Proteína de la ectodisplasina A

EdaR: Receptor de la ectodisplasina

FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico

FGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Fibroblástico

GAG: glucosaminoglicanos

GFR alpha-2: GDNF Family Receptor Alpha 2

HS: Heparán sulfato

IAP: Proteína Inhibidora de apoptosis

IGFBP: proteínas de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina

IL: Interleukina

M: Receptor muscarínico epitelial

MMP: Metaloproteasas

NRTN: Neurturina

PBS: suero salino tamponado con fosfato

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaqueta

PSG: Ganglio submandibular parasimpático

RHOK: RHO kinasa

Shh: Proteína Sonic Hedgehog

SL: glándula sublingual

SMG: glándula submandibular

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$  "

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNFR: Receptor de Factor de necrosis tumoral

VEGFR: Receptor de crecimiento endotelial vascular.

VIP: Péptido intestinal vasoactivo; VIPR: Receptor Péptido intestinal vasoactivo

Índice	Página
<b>Abstract</b>	13
<b>Resumen</b>	19
<b>Introducción</b>	25
- Anatomía e histología de la glándula sublingual	28
- Desarrollo y embriogénesis de la glándula sublingual	33
- Modo y causas del desarrollo glandular salivar	44
- Desarrollo embriológico de la glándula sublingual en rata	67
<b>Justificación, hipótesis y objetivos</b>	72
<b>Material y Método</b>	75
<b>Resultados</b>	81
- Embriones y fetos humanos	81
- Embriones de rata	133
<b>Discusión</b>	148
<b>Conclusiones</b>	160
<b>Bibliografía</b>	162

Índice de esquemas, tablas y figuras	Páginas
Esquema 1.- Esquema representativo de la arquitectura glandular	27
Esquema 2.- Sistema de conductos glandular	28
Esquema 3.- Morfología de los conductos secretores	29
Esquema 4.- Aporte simpático y parasimpático de las glándulas salivares mayores.	32
Esquema 5.- Interacciones del epitelio con tejido neuronal, endotelio, y membrana basal que regulan la ramificación glandular en las glándulas submandibular y sublingual.	45
Esquema 6.- Revisión esquemática de las proteínas necesarias para el desarrollo en ramificación de las glándulas salivares.	62
Esquema 7.- Estadíos del desarrollo de las glándulas salivares.	68
Esquema 8.- Representación esquemática de la invaginación epitelial en el mesénquima.	68
Tabla 1.- Etapas de la embriogénesis (O'Rahilly)	34
Tabla 2.- Desarrollo de la glándula submandibular y sublingual en ratón.	71
Tabla 3.- Embriones humanos empleados en el estudio	76
Tabla 4.- Embriones de rata empleados en el estudio	77

## Índice de esquemas, tablas y figuras

## Páginas

<u>Figura 1.</u> - Embrión humano CU de 15,5 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. (4x). Corte frontal.	82
<u>Figura 2.</u> - Embrión humano de 15,5mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte frontal (4x).	82
<u>Figura 3.</u> - Embrión humano de 15,5mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte frontal (4x).	83
<u>Figura 4.</u> - Embrión humano de 17,5 mm, GV1. Tinción con hematoxilina-eosina Corte Frontal 4x	84
<u>Figura 5.</u> - Embrión de 18 mm, MAR2. Tinción: Bielchowsky Corte: Frontal 4x	85
<u>Figura 6.</u> - Embrión de 18 mm, MAR2. Tinción: Bielchowsky Corte: Frontal. 4x	86
<u>Figura 7.</u> - Embrión de 18 mm, MAR2. Tinción: Bielchowsky Corte: Frontal. 4x	87
<u>Figura 8.</u> - Embrión de 20 mm, CAS. Tinción: H-E. Corte frontal. 4x.	88
<u>Figura 9.</u> -Embrión de 20 mm, CAS. Tinción: H-E. Corte frontal. 10x.	88
<u>Figura 10.</u> - Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 4x	89
<u>Figura 11.</u> - Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-Eosina. Corte frontal. 10x.	89
<u>Figura 12.</u> - Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 4x	90
<u>Figura 13.</u> - Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 10x	90
<u>Figura 14.</u> - Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 4x	91
<u>Figura 15.</u> - Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 10x	91
<u>Figuras 16, 17, 18, 19 y 20.</u> - secuencia de cortes ordenada ventro dorsalmente. Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 4x	92
<u>Figuras 21 y 22.</u> - Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 4 x.	93
<u>Figuras 23, 24 y 25.</u> - Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 4 x.	94
<u>Figura 26.</u> - Embrión humano NO2 de 21 mm. 4x. Tinción: Hematoxilina-eosina.	96
<u>Figura 27.</u> - Embrión humano NO2 de 21 mm. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4x	97
<u>Figura 28.</u> - Embrión humano NO2 de 21 mm. Tinción: Hematoxilina-eosina. 10x	97
<u>Figura 29.</u> - Embrión humano NO2 de 21 mm. Tinción Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 4x	97

<u>Figura 30.</u> - Embrión humano NO2 de 21 mm. Tinción Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 10x	97
<u>Figura 31.</u> - Embrión humano NO2 de 21 mm. Tinción Hematoxilina-eosina. Corte Frontal. 4x	98
<u>Figura 32.</u> - Embrión humano NO2 de 21 mm. Tinción Hematoxilina-eosina. Corte Frontal. 10x	98
<u>Figura 33.</u> - Embrión humano NO2 de 21 mm. 4x. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte Frontal.	99
<u>Figura 34.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4 x	100
<u>Figura 35.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4 x	100
<u>Figura 36.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4 x	101
<u>Figura 37.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4 x	101
<u>Figura 38.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4 x	101
<u>Figura 39.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4x	103
<u>Figura 40.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 10x	103
<u>Figuras 41 y 42.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4x.	103
<u>Figura 43.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4x.	104
<u>Figura 44.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4x.	104
<u>Figura 45.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4x.	105
<u>Figura 46.</u> - Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital. 4x	105
<u>Figura 47.</u> - Aumento Figura 46 (10x).Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital.	106
<u>Figura 48.</u> - Embrión GI4 de 26,5 mm. Corte Frontal Tinción Azán. 4x	107
<u>Figura 49.</u> - Embrión GI4 de 26,5 mm. Corte Frontal Tinción Azán. 10x	107
<u>Figuras 50 y 51.</u> - Embrión GI4 de 26,5 mm. 4x. Corte Frontal Tinción Hematoxilina-Eosina	108
<u>Figura 52.</u> - Embrión GI4 de 26,5 mm. 4x. Corte Frontal Tinción Hematoxilina-eosina.	109
<u>Figura 53.</u> - Embrión GI4 de 26,5 mm. 10x. Corte Frontal Tinción Hematoxilina-eosina.	109
<u>Figura 54.</u> - Embrión GI4 de 26,5 mm. 4x. Corte frontal Tinción Azán.	110
<u>Figuras 55 y 56.</u> - Embrión GI4 de 26,5 mm. 4x. Cortes frontales Tinción Azán.	110
<u>Figura 57.</u> - Embrión GI4 de 26,5 mm. 4x. Corte frontal Tinción Azán.	111

<u>Figura 58.</u> - Embrión BR4 de 28 mm. Corte frontal 4x Tinción Azán.	112
<u>Figura 59.</u> - Embrión BR4 de 28 mm. Corte frontal 10x Tinción Azán.	112
<u>Figura 60.</u> - Embrión BR4 de 28 mm. Corte frontal Tinción Hematoxilina-Eosina. 4x.	113
<u>Figura 61.</u> - Embrión BR4 de 28 mm. Corte frontal Tinción Hematoxilina-Eosina. 4x	113
<u>Figura 62.</u> - Embrión BR4 de 28 mm. Corte frontal Tinción Azán 4x.	114
<u>Figura 63.</u> - Embrión BR4 de 28 mm. Corte frontal Tinción Azán. 4x.	115
<u>Figura 64.</u> - Embrión BR4 de 28 mm. Corte frontal Tinción Azán. 4x.	116
<u>Figura 65.</u> - Embrión BR4 de 28 mm. Corte frontal Tinción Hematoxilina-eosina. 4x	116
<u>Figura 66.</u> - Feto MO de 32 mm. Corte frontal Tinción Hematoxilina Eosina. 10x	117
<u>Figura 67.</u> - Feto MO de 32 mm. Corte frontal Tinción Hematoxilina Eosina. 10x	118
<u>Figura 68.</u> - Feto MO de 32 mm. Corte frontal Tinción Hematoxilina Eosina. 10x	118
<u>Figura 69.</u> - Feto MO de 32 mm. Corte frontal Tinción Azán. 10x	119
<u>Figura 70.</u> - Feto MO de 32 mm. Corte frontal Tinción Azán. 4x	119
<u>Figura 71.</u> - Feto MO de 32 mm. Corte frontal Tinción Hematoxilina Eosina 4x y 10x.	120
<u>Figura 72.</u> - Feto MO de 32 mm. Corte frontal Tinción Hematoxilina Eosina. 4x y 10x	120
<u>Figura 73.</u> - Feto MO de 32 mm. Corte frontal Tinción Hematoxilina Eosina. 4x	121
<u>Figura 74.</u> - Feto MO de 32 mm. Corte frontal Tinción Hematoxilina Eosina. 4x.	121
<u>Figura 75.</u> - Feto MO de 32 mm. Corte frontal Tinción Azán. 4x.	122
<u>Figura 76.</u> - Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 4x.	123
<u>Figura 77.</u> - Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 4x	124
<u>Figura 78.</u> - Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.	124
<u>Figura 79.</u> - Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.	125
<u>Figura 80.</u> - Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.	125
<u>Figura 81.</u> - Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.	126

<u>Figura 82.</u> - Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.	126
<u>Figura 83.</u> - Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.	127
<u>Figura 84.</u> - Feto OC de 43mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 4x	128
<u>Figura 85.</u> - Feto OC de 43mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 10x	128
<u>Figura 86.</u> - Feto OC de 43mm. Corte frontal. 4x	128
<u>Figura 87.</u> - Feto OC de 43mm. Corte frontal. 10x	128
<u>Figura 88.</u> - Feto OC de 43mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 4x	129
<u>Figura 89.</u> - Feto OC de 43mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 10x	129
<u>Figura 90.</u> - Feto OC de 43mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 4x	130
<u>Figura 91.</u> - Feto OC de 43mm. Corte frontal. Tinción Azán. 4x	130
<u>Figura 92.</u> - Feto OC de 43 mm, Corte frontal, Tinción Azán. 4x	131
<u>Figura 93.</u> - Feto OC de 43 mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4x.	131
<u>Figura 94.</u> - Feto OC de 43 mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4x.	132
<u>Figura 95.</u> - Espécimen de rata de 16 días. Corte frontal. Marcaje de NHK1 (1/35) 10x.	134
<u>Figura 96.</u> - Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 4x.	134
<u>Figura 97.</u> - Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 10x.	134
<u>Figura 98.</u> - Espécimen de rata de 16 días. Corte frontal. Marcaje de NHK1 (1/20) 10x.	135
<u>Figura 99.</u> - Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 4x.	136
<u>Figura 100.</u> - Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 4x.	136
<u>Figura 101.</u> - Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 10x.	137
<u>Figura 102.</u> - Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 10x. Lado derecho	137
<u>Figura 103.</u> - Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 10x. Lado izquierdo	138
<u>Figura 104.</u> - Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 4x	139
<u>Figura 105.</u> - Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 4x.	139
<u>Figura 106.</u> - Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 4x.	140

<u>Figura 107</u> .- Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 10x.	140
<u>Figura 108</u> .- Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 10x.	141
<u>Figura 109</u> .- Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 10x.	142
<u>Figura 110</u> .- Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. 4x Tinción: H-E, NHK1 1/15 con IgM 1/2000	142
<u>Figura 111</u> .- Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. 10x Tinción: H-E, NHK1 1/15 con IgM 1/2000	143
<u>Figura 112</u> .- Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. Tinción: H-E. 10x.	143
<u>Figuras 113 y 114</u> .- Especímenes de rata de 18 días. Corte Frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4 x.	144
<u>Figura 115</u> .- Espécimen de rata de 18 días. Corte Frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4 x.	145
<u>Figura 116</u> .- Espécimen de rata de 18 días. Corte Frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4 x.	146
<u>Figura 117</u> .- Espécimen de rata de 18 días. Corte Frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4 x.	146
<u>Figura 118</u> .- Espécimen de rata de 18 días. Corte Frontal. Tinción: Ac CBL 202 1/20, con IgG 1/300. 4 x.	147
<u>Figura 119</u> .- Espécimen de rata de 18 días. Corte Frontal. 4x Tinción: Hematoxilina-eosina con Ac NHK1 1/15 con IgM 1/2000.	147

**ABSTRACT:****INTRODUCTION:**

Studies on the embryological development of the major salivary glands have mainly focused on analyzing the submandibular gland. No important research has focused on the development and origin of the sublingual gland, which is considered a major tubuloacinar salivary gland. In an adult, it is located in a submucosal plane above the mylohyoid muscle.

With a double drainage system, saliva reaches the oral cavity through both the multiple Walther's ducts and the main Bartholin's conduct, which opens into the Wharton's duct of the submandibular gland.

Controversial ideas and discrepancies between different authors arise in determining the exact origin and morphogenetic development of the sublingual gland in human embryos.

In order to determine the details of what happens in a human major gland morphogenesis, tests in rats and mice have been performed thanks to the similar anatomy and development of these animals. These studies aim to assess the factors that influence gland morphogenesis:

- The importance of the interaction between epithelium and the underlying mesenchyme,
- The mesenchymal factors that influence the initial stages, branching morphogenesis and creation of light inside the ducts,
- The extracellular matrix factors and the basement membrane,

- The neuronal influence and the endothelial influence.

### OBJECTIVES

1. To determine the morphogenetic timing and the formation area of the human sublingual glands.
2. To describe the development of sublingual glands in humans and rats in the early embryonic and fetal periods.
3. To evaluate the influence of ectomesenchyme on the development of the sublingual gland using rats studies, extrapolated in humans.

### MATERIALS AND METHODS:

We used 12 human embryos and fetuses belonging to the Embryology Institute of Complutense University in Madrid, with lengths ranging from 15.5 mm to 43 mm, 9 belongs to the embryonic period and 3 to early fetal period. The embryos and fetuses have been stained with different techniques: Hematoxylin-eosin, Azan and Bielchowsky.

We used 7 Wistar rat embryos from 15 to 19 days, considering day 0 as the day of fertilization. In these embryos, Immunohistochemical techniques are applied. For our study, 2 antibodies were used: NHK-1 and CBL 202. The main antibody studied is NHK-1, which is considered a neuroectodermal tissue marker.

The Nikon Eclipse DXM 1200 optical microscope is used to perform the descriptive study, attached to a camera. Using ACT-1 software, photographs can be captured, modified and stored.

### RESULTS:

First signs suggesting the presence of the prospective sublingual area are seen at Carnegie stage 19 in a 17.5 mm embryo, anterior to the lateral paralingual groove. The medial paralingual groove presents greater development. From this medial groove, the submandibular gland is detached and starts its own development.

In Carnegie stage 20, the primordium of the major and minor sublingual glands are observed as epithelial invaginations in the underlying mesenchyme. The epithelial buds that will form the major sublingual gland seem to be detached from Wharton's duct and always appear with an underlying mesenchymal condensation. They acquire lights in the interior from stage 23 onwards.

Minor sublingual glands appear more lateral than major sublingual glands and are defined as solid buds, connected to the buccal epithelium with no lights inside. In the early fetal period, they appear to have less differentiation than major sublingual glands.

In our studies, submandibular glands present a higher degree of morpho-differentiation than sublingual glands. They acquire greater size and we observe a condensed mesenchyme that will create their stroma and capsule.

Regarding rat embryos, we can detect that underlying mesenchyme is stained with the neuroectodermal tissue marker antibody (NHK 1). In the early embryonic and fetal period, the evolution of sublingual gland rat morphogenesis is similar to those of humans.

#### DISCUSSION:

We observed in the human embryos the medial and lateral paralingual grooves described by multiple authors. Nevertheless, we consider that the prospective sublingual area is located more anterior to the paralingual lateral groove, which was traditionally considered as the origin of the sublingual gland by many classic authors.

At the same stage (Carnegie stage 20) major and minor sublingual glands emerge, according to our observations.

Through all the studied periods, major sublingual glands appear with a greater differentiation than minor sublingual glands, which remain solid and located posteriorly.

Underlying condensed mesenchyme in the epithelial invagination area is positive to NHK 1 and thus determine its neurocrestal origin, as claimed by many authors.

This mesenchyme is, in our opinion, responsible for guiding the epithelial invagination and orientating the development of the sublingual glandular primordium.

CONCLUSIONS:

1. In human embryos, the prospective sublingual area appears for the first time in Carnegie stage 19, as an epithelial thickening in the anterior region of the floor of the mouth, being independent and located anterior to the lateral paralingual groove.
  
2. In human embryos, in Carnegie Stage 20, the invagination of the oral epithelium lateral to the medial paralingual groove causes the rise of the primordium of the major sublingual gland, which may also rise from the anterior part of the Wharton's duct. The underlying mesenchyme is always condensed.
  
3. In human embryos, the minor sublingual glands originate in Carnegie Stage 20 from from the oral epithelium as independent buds, being always lateral to the area of origin of the major sublingual gland.
  
4. In rat embryos, the major sublingual glands emerge from the oral epithelium of the mouth's floor in relation to the anterior part of the Wharton's duct.
  
5. The condensed mesenchyme around the major sublingual gland is positively marked with the NHK 1 antibody, indicating its neuroectodermal origin.

6. In the early fetal period, the major sublingual gland has an intense caudal, dorsal and lateral growth distinguishing its duct, stroma and capsule.

7. In the early fetal period, the minor sublingual glands are formed by solid buds connected to the oral epithelium, without an obvious capsular formation.

8. In the early stages, sublingual rat glands show a similar development to human embryos. They can be considered a reliable study model. In the future, this embryological similarity will be useful for tissue regeneration studies, the understanding of abnormal glandular growth, and the etiopathogenesis and treatment of glandular tumors, opening new horizons in clinical research.

**RESUMEN:****INTRODUCCIÓN:**

Los estudios sobre el desarrollo embriológico de las glándulas salivares mayores han ido enfocados a analizar casi en exclusiva la glándula submandibular. Escasas investigaciones han centrado sus objetivos sobre el desarrollo y origen de la glándula sublingual, considerada una glándula salivar mayor tubuloacinar, de secreción mixta, pero predominio mucoso. En el adulto, está localizada en un plano submucoso por encima del músculo milohioideo que delimita el suelo de la boca. A través de un sistema de doble drenaje, la saliva alcanza la cavidad oral por los múltiples conductos de Walther y por el conducto principal de Bartholin que se abre al conducto de Wharton, de la glándula submandibular.

Las dudas surgen a la hora de determinar el lugar exacto de origen y el horario morfogenético de la glándula sublingual en el humano, existiendo discrepancias entre los diferentes autores.

Para lograr una aproximación de lo que ocurre en la morfogénesis glandular de los humanos, se han desarrollado unos modelos de estudio en rata y ratón, ya que éstos presentan una anatomía y un desarrollo glandular similar al humano. Estos estudios tienen como objetivo valorar los factores que influyen en la morfogénesis glandular y hacen hincapié en la importancia de la interacción entre el epitelio y el mesénquima subyacente; en los factores mesenquimales que influyen en el inicio, la ramificación y la formación de luz en el interior de

los conductos; en los factores de la matriz extracelular y la membrana basal; en la influencia neuronal y más recientemente, en la influencia endotelial.

### OBJETIVOS

1. Determinar el horario morfogenético y el área de origen de las glándulas sublinguales humanas.
2. Describir el desarrollo de las glándulas sublinguales en humanos y ratas en los periodos embrionario y fetal temprano.
3. Evaluar la influencia del ectomesénquima en el desarrollo de la glándula sublingual mediante técnicas de estudio en rata, extrapolables en humanos.

### MATERIAL Y MÉTODO:

Empleamos 12 especímenes humanos pertenecientes al Instituto de Embriología de la Universidad Complutense de Madrid, con longitudes que oscilan entre 15,5 mm y 43 mm, pertenecientes 9 al periodo embrionario y 3 al periodo fetal temprano. Los embriones han sido teñidos con diferentes técnicas: Hematoxilina-eosina, Azan y Bielchowsky.

Empleamos 7 especímenes de rata Wistar de 15 a 19 días de edad, considerando el día 0 como el día de la fertilización. En estos embriones, se aplican técnicas de Inmunohistoquímica. Para nuestro estudio se han empleado 2 anticuerpos: NHK-1 y CBL 202, junto a los anticuerpos secundarios. El principal anticuerpo estudiado es el NHK-1 que es considerado un marcador de tejido neuroectodérmico.

Para realizar el estudio morfodescriptivo, se emplea un microscopio óptico Nikon Eclipse DXM 1200, acoplado a una cámara y gracias a la plataforma ACT-1 se pueden capturar, modificar y almacenar las fotografías que en los resultados se exponen.

### RESULTADOS:

Los primeros signos que sugieren la presencia del área prospectiva sublingual se observan en el estadio 19 de Carnegie en un embrión de 17,5 mm, en una zona más anterior al surco paralingual lateral. El surco paralingual medial presenta mayor desarrollo y de él se desprende el esbozo de la glándula submandibular.

En el estadio 20 de Carnegie, se observan los primordios de las glándulas sublinguales mayor y menor como unas invaginaciones en el ectomesénquima subyacente.

Los cordones epiteliales que formarán la glándula sublingual mayor parecen desprenderse del propio conducto de Wharton y siempre aparecen con una condensación mesenquimática alrededor. Adquieren luz en el interior a partir del estadio 23.

Los brotes de las glándulas sublinguales menores aparecen más laterales y se definen como unos brotes sólidos conectados al epitelio bucal y carentes de luz. En el periodo fetal temprano, parecen tener menor diferenciación que las glándulas sublinguales mayores.

La glándula submandibular presenta en todos los estadios analizados un mayor grado de morfodiferenciación que la glándula sublingual. Adquiere mayor tamaño y un mesénquima condensado que perfila el estroma y la cápsula.

Respecto a los embriones de rata, podemos destacar que el mesénquima subyacente a los brotes que formarán las glándulas sublinguales, se tiñe con el anticuerpo marcador de tejido neuroectodérmico NHK 1 y que la evolución de la morfogénesis glandular sublingual es similar a la encontrada en humanos, en este periodo embrionario y fetal temprano.

#### DISCUSIÓN:

Observamos, en los embriones humanos, los dos surcos paralingual medial y lateral descritos por múltiples autores, pero consideramos que el área prospectiva sublingual se localiza más anterior al surco lateral del que tradicionalmente se pensaba que se originaba la glándula sublingual, estando en desacuerdo con varios estudios clásicos.

La aparición de las glándulas sublinguales mayor y menor se aprecia en el mismo estadio 20 de Carnegie, según nuestras observaciones. Otros autores señalan su aparición en etapas más tardías. La glándula sublingual mayor aparece con una diferenciación mayor en este periodo estudiado que las glándulas menores, que permanecen sólidas en una situación más posterior.

El mesénquima condensado subyacente al área de invaginación epitelial es positivo para NHH 1, determinando su origen neurocrestal como afirman numerosos autores.

Es, en nuestra opinión, el encargado de guiar la invaginación epitelial y orientar el crecimiento del esbozo glandular sublingual.

### CONCLUSIONES:

1. En embriones humanos, el área prospectiva sublingual aparece por primera vez en el estadio 19 de Carnegie, como un engrosamiento epitelial en la región anterior del suelo de la boca, independiente y anterior al surco paralingual lateral.
2. En embriones humanos, el esbozo de la glándula sublingual mayor surge en el estadio 20 de Carnegie por la invaginación del epitelio del suelo de la boca lateral al surco paralingual medial, pudiendo aparecer como unos brotes epiteliales del extremo anterior del conducto de Wharton. El mesénquima subyacente aparece siempre condensado.
3. En embriones humanos, las glándulas sublinguales menores se originan en el estadio 20 de Carnegie, del epitelio del suelo de la boca como unos brotes independientes, siempre laterales al área de origen de la glándula sublingual mayor.
4. En embriones de rata, las glándulas sublinguales mayores emergen del epitelio del suelo de la boca en íntima relación con el extremo anterior del conducto de Wharton.

5. El mesénquima condensado alrededor de la glándula sublingual mayor se marca positivamente con el Anticuerpo NHK 1, lo que indica su origen neuroectodérmico.
6. En el periodo fetal temprano, la glándula sublingual mayor tiene un crecimiento intenso caudo, dorso, lateral diferenciándose su conducto, el estroma y la cápsula.
7. En el periodo fetal temprano, las glándulas sublinguales menores están formadas por brotes sólidos conectados con el epitelio oral sin una formación capsular clara.
8. Las glándulas sublinguales de los embriones de rata presentan una evolución, en estas fases iniciales del desarrollo, similar al de los embriones humanos, por lo que pueden ser consideradas un buen modelo de estudio. En el futuro, esta similitud embriológica será útil para realizar estudios de regeneración tisular, entender el crecimiento anormal glandular y profundizar en la etiopatogenia y tratamiento de los tumores glandulares, abriendo nuevos horizontes en la investigación clínica.

## INTRODUCCIÓN:

Desde el siglo pasado, las glándulas salivares sublinguales han sido motivo de controversia y se han ido dejando apartadas de las investigaciones sobre su origen y posterior desarrollo, centradas más en las glándulas parótida y submandibular. Numerosos autores han analizado el desarrollo de éstas dos últimas, estando bien definidas sus etapas de desarrollo, anatomía, histología y factores que influyen en su morfogénesis. La poca literatura y estudios científicos que existen hacen referencia a la glándula sublingual en estudios más extensos relacionados siempre con la glándula submandibular.

Una de las primeras referencias bibliográficas sobre estas glándulas data de 1679, en un discurso pronunciado por Rivinius (1679) sobre la dispepsia.

### Generalidades de las glándulas salivares mayores en adultos

Las glándulas salivares juegan un papel importante en los mamíferos, y ayudan en el proceso de digestión y fonación. Existen tres pares de glándulas salivares principales: dos en íntima relación con la cavidad oral, la glándula submandibular y la glándula sublingual, y otra que se desarrolla más alejada entre el maxilar y la mandíbula, la glándula parótida. Contribuyen aproximadamente a producir el 90 % de la saliva. Igualmente, existe un número muy alto de pequeñas glándulas (entre 600 y 1000) salivares menores repartidas por toda la cavidad oral (labios, paladar, mucosa yugal, lengua), cuyo tamaño no excede de los 5 mm.

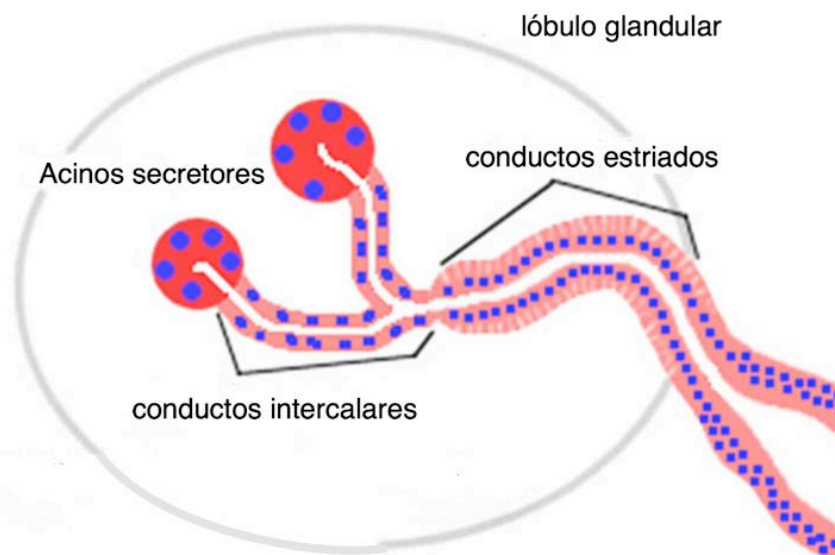
La función principal de las glándulas salivares es producir saliva. Se componen principalmente de agua ( 99%) y de enzimas, glicoproteínas e iones, esenciales para mantener la homeostasis oral. A parte de la  $\alpha$ -amilasa que contribuye a la digestión, la saliva también contiene calcio y fosfato para mantener la salud dental, lisozimas, ribonucleasa, prolina, histatinas e inmunoglobulinas A que ayudan a crear una barrera protectora para las mucosas frente a agentes bacterianos y micóticos. (Cannon K,2015; Orts Llorca,1972; Holsinger,2007; Johns,1977; Martinez-Madrigal,1989).

Las glándulas salivares mayores comparten elementos estructurales comunes. Están formadas por un parénquima, el propio tejido secretor y un estroma, tejido conectivo de soporte. (Holsinger, 2007)

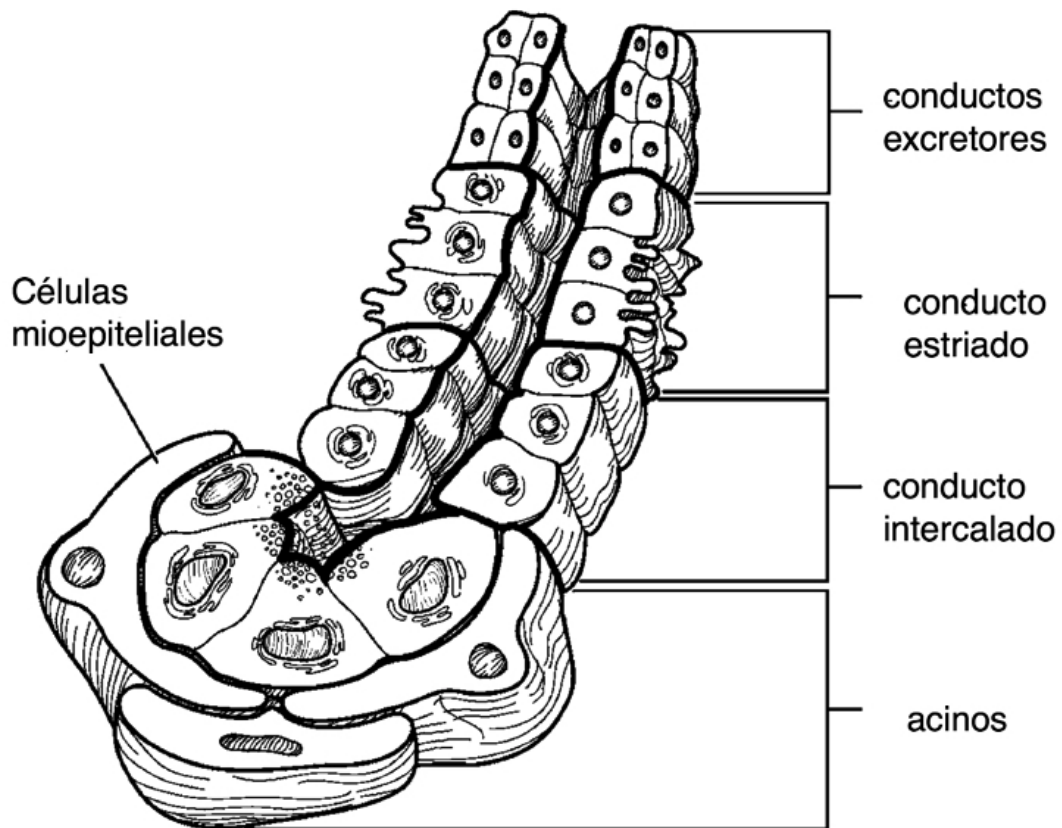
Son glándulas exocrinas tubuloacinares, definidas histológicamente por ser agregados de múltiples subunidades secretoras. Estas unidades están compuestas por acinos, donde se produce la secreción y un sistema de conductos que transporta la saliva a la cavidad oral y regula la concentración de agua y electrolitos. Existen tres tipos de unidades secretoras: las serosas, que contienen proteínas como las amilasas; las mucosas, donde se secretan sialomucinas, glicoproteínas con cadenas de carbohidratos que contribuyen a la viscosidad de la saliva; y las mixtas que se conforman de células serosas y mucosas. Atendiendo al predominio de cada población celular, las glándulas salivares se clasifican en tres categorías: serosas, mucosas y mixtas. El sistema ductal va a aumentando progresivamente de calibre y se compone de conductos intercalados y estriados que son intralobulares y son considerados

como conductos secretores por su actividad metabólica. Los otros conductos son interlobulares y con capacidad excretora. ( Martínez-Madriral,1989; Johns, 1977)

Las células mioepiteliales se sitúan entre las células epiteliales y la lámina basal de los acinos y los conductos intercalares. La característica principal es la presencia de filamentos citoplasmáticos en la vertiente basal como miofilamentos de actina, miosina y tropomiosina que permiten ejercer la actividad contráctil de estas células, acelerando el flujo de saliva y ayudando a la actividad secretora a realizar su función. Igualmente, contribuyen a estabilizar la glándula en periodos de hipersalivación cuando se incrementa la presión secretora (Tucker,2010; Murakami 1989).



Esquema 1: Esquema representativo de la arquitectura glandular.



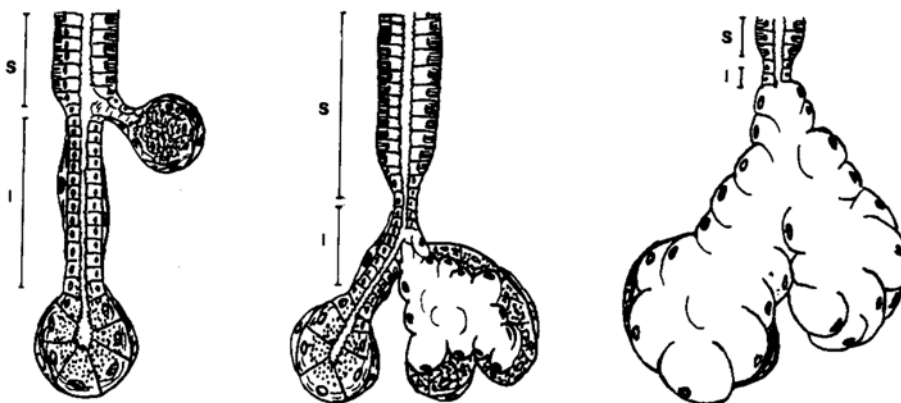
Esquema 2: Sistema de conductos glandular. Holsinger FC (2007).

### 1. Anatomía e histología de la glándula sublingual

Las glándulas sublinguales son las más pequeñas de las glándulas salivares mayores, pesan entre 2 y 4 gramos y son responsables de la secreción del 3-5% del total de saliva disponible en la cavidad oral. Están situadas a ambos lados del suelo de la boca, recubiertas únicamente por la mucosa oral. A través de un sistema de doble drenaje, la saliva alcanza la cavidad oral a través de los

conductos de Walther de manera directa al suelo de la boca en la zona de la plica sublingualis, o de un conducto principal de Bartholin de manera indirecta que se abre al conducto de Wharton, conducto de drenaje de la glándula submandibular y que acaba emergiendo a nivel de la carúncula sublingual (Orts Llorca, 1972; Cecchini 2013; Nagler 2003).

La glándula sublingual se define como una glándula tubuloacinar, de secreción mixta pero predominio mucoso, con muchos acinos mucosos y algunas semilunas serosas. Los acinos están compuestos de células mucosas localizadas en el centro y semilunas serosas localizadas más periféricamente. Contiene unos conductos intercalares y estriados muy cortos, en comparación con las otras glándulas salivares mayores. Los conductos estriados están formados por un epitelio simple columnar y los conductos interlobulares por un epitelio estratificado columnar, rodeados de tejido conectivo (Martinez-Madrigal 1989; Denny 1997)



Esquema 3: Morfología de los conductos secretores en la glándula parótida (a), glándula submandibular (b), glándula sublingual (c). Nótese el tamaño discreto de los conductos secretores en la última. Martinez-Madrigal (1989).

La glándula descansa en un plano submucoso donde forma un leve relieve, y está situada superior al músculo milohiideo. Lateralmente, se encuentra la cara lingual mandibular y a este nivel, la mandíbula presenta una depresión llamada fossa sublingualis. La cara interna o medial se apoya sobre el músculo geniogloso y tiene relaciones con el conducto de Wharton, el nervio lingual y la vena ranina. El extremo posterior está muy cerca o llega a contactar con el proceso sublingual de la glándula submandibular, mientras que el extremo anterior se encuentra a cada lado del frenillo lingual. La mayoría de los autores coincide en que tiene únicamente un recubrimiento mucoso superior (Orts Llorca, 1972; Holsinger 2007).

Desde los estudios de Paulov a principios del siglo XX, la función glandular ha sido relacionada con el aporte neuronal, hasta el punto que la ablación del sistema nervioso provoca una atrofia glandular y como consecuencia el cese de la producción salivar. De la misma manera, se ha relacionado el sistema nervioso autónomo con el desarrollo glandular, ya que se ha observado en ratones que al extirpar las ramas nerviosas autónomas las glándulas se atrofian y acarrear defectos congénitos en su desarrollo (Proctor 2007; Ferreira 2013).

El sistema nervioso autónomo se encarga de la regulación del sistema glandular corporal. Tanto el sistema simpático y parasimpático inervan la glándula sublingual. La inervación parasimpática ocurre a través de las fibras parasimpáticas transportadas por el nervio facial. Las fibras preganglionares parasimpáticas nacen del núcleo salival superior en el puente troncoencefálico

y a través del nervus intermedius pasan al conducto auditivo interno para unirse al nervio facial (VII par craneal). Las fibras son transportadas por el nervio cuerda del tímpano a la mastoides y penetran en la fosa infratemporal. En ésta, las fibras preganglionares se unen al nervio lingual (rama del nervio trigémino), que conduce las fibras para que sinapten con el ganglio submandibular. Pequeñas ramas postsinápticas abandonan el ganglio para inervar la glándula submandibular y sublingual y estimular la secreción seromucosa y mucosa, respectivamente (Ferreira y Hoffman 2013; Cannon 2015).

Diversos estudios demuestran la presencia de fibras aferentes de centros cardiacos y respiratorios que convergen en las fibras preganglionares parasimpáticas y tienen como función la regulación del flujo sanguíneo y la secreción salivar, a través de las células mioepiteliales probablemente.

Los centros primarios simpáticos están localizados en los segmentos superiores torácicos de la médula espinal. Desde el ganglio torácico, el tronco paravertebral simpático lleva las fibras preganglionares para que sinapten con el ganglio cervical superior. Las fibras postganglionares emergen del ganglio cervical para inervar las regiones cervicales y craneofacial. Las fibras simpáticas alcanzan las glándulas salivares a través del plexo de la arteria carótida externa y sus ramas, incluidas la facial. Desde el plexo, las fibras postganglionares simpáticas se dirigen hacia las glándulas salivares mayores (Ferreira y Hoffman 2013).



encargados del drenaje linfático sublingual son los ganglios submandibulares (Orts Llorca 1972).

## 2. Desarrollo y embriogénesis de la glándula sublingual

En la literatura científica, la mayoría de las referencias bibliográficas versan sobre la glándula submandibular. Según Tucker (2007), las tres glándulas salivares mayores parecen seguir el mismo patrón morfogénético de desarrollo aunque cada una de ellas inicie su formación en un momento diferente.

La embriogénesis puede clasificarse en función de la edad, el tamaño o las características morfológicas del embrión. Los estadios o etapas de Carnegie ( EC) fueron definidos por O’Rahilly y Müller en 1987, permitiendo clasificar las muestras embrionarias de manera más precisa, aunando los tres criterios anteriormente descritos (O’Rahilly, Muller, 2010)

A continuación, se enumeran todos los 23 estadios de Carnegie para que nos sirva de guía en la posterior descripción de los embriones:

Etapa Carnegie	Días	Tamaño embrionario humano	Características morfológicas
Etapa 1	1 día	0.1 a 0.15 mm	Fase de cigoto (óvulo fertilizado)
Etapa 2	2 a 3 días	0.1 a 0.2 mm	Fase de Mórula
Etapa 3	4 a 5 días	0.1 a 0.2 mm	Fase de blastocito
Etapa 4	5 a 6 días	0.1 a 0.2 mm	Fase de implantación
Etapa 5	7 a 12 días	0.1 a 0.2 mm	El blastocito se adhiere fuertemente al endometrio
Etapa 6	13 a 15 días	0.2 mm	Aparece el mesodermo
Etapa 7	15 a 17 días	0.4 mm	Fase de gastrulación: ectodermo, mesodermo y endodermo
Etapa 8	17-19 días	1 a 1.5 mm	Desarrollo de la médula espinal
Etapa 9	19-21 días	1.5 a 2.5 mm	Inicio estructura de cerebro y corazón
Etapa 10	22-23 días	2 a 3.5 mm	Fusión celular en la médula espinal
Etapa 11	23-26 días	2.5 a 4.5mm	Tejido óseo y vertebral
Etapa 12	26-30 días	3 a 5 mm	Tubo neural ( SNC)

Etapa 13	28-32 días	4 a 6 mm	Yemas de extremidad inferior, estructuras orgánicas
Etapa 14	31-35 días	5-7 mm	Estructuras ojo y oído
Etapa 15	35-38 días	7-9 mm	Esbozos de miembros, brazos especialmente, estructura nasal
Etapa 16	37-42 días	8-11 mm	Surco nasolagrimal, áreas pies y manos
Etapa 17	42-44 días	11-14mm	Dedos en manos y pies, cerebro se desarrolla.
Etapa 18	44-48 días	13-17 mm	Formación de huesos
Etapa 19	48-51 días	16-18 mm	Codos y dedos de los pies visibles, estiramiento de tronco. Cadera y rodilla
Etapa 20	51-53 días	18-22 mm	Flexura del codo.
Etapa 21	53-54 días	22-24 mm	Brazos y piernas giran hacia dentro.
Etapa 22	54-56 días	23-28mm	Párpados, Conducto auditivo externo, trago y antitrago, tabique nasal

Etapa 23	56-60 días	27-31 mm	Paso a feto.
Tabla 1: Etapas de la embriogénesis. (O'Rahilly 2010)			Desarrollo facial y craneal.

El desarrollo de la glándula sublingual ha sido estudiado poco en profundidad y ha creado cierta controversia entre los anatomistas clásicos. La mayoría de las referencias a esta glándula se engloban dentro de estudios más amplios referentes a la glándula submandibular.

En un discurso pronunciado en 1679, Rivinius señala la existencia de un conducto excretor independiente al conducto de Wharton, que circula sobre él. Pocos años después, en 1685, Bartholin describe el conducto de drenaje de la glándula sublingual en estudios llevados a cabo en ternero, oveja y oso y se atribuye a sí mismo el descubrimiento. Es más tarde, en 1909, cuando Poirier asegura que la glándula sublingual es una aglomeración de glándulas independientes, de 12 a 15, cada una con su canal excretor.

Testut (1914), en uno de sus célebres escritos de anatomía, asegura que del surco paralingual interno deriva la glándula submandibular y del surco paralingual externo las glándulas sublinguales principales y accesorias. De hecho, este autor junto a Torneaux (1921), Brachet (1935), Celestino da Costa (1948), Dubrevil (1956) y Giroud (1960), describen que la glándula sublingual sigue un desarrollo similar al de la glándula submandibular, es decir, mediante una invaginación del estomodeo en el mesénquima del suelo de la boca.

Diversos autores en el contexto del análisis de las glándulas salivares mayores, señalan el origen de la glándula sublingual a partir de la 8ª semana de

desarrollo. Aseguran autores como Alcalá-Santaella (1929), Sudler (1902) y Chievitz (1885) que a la 7ª semana no hay señales de la glándula, y otros menos concretos como Chiarugi (1940), Genis (1969) o Moore (2013) no fijan la fecha y señalan que su aparición es más tardía que la de la glándula submandibular. Churchill (1914) afina más y señala que en embriones de 24 mm ya se ven los primeros elementos que esbozan la glándula. Todos coinciden en que la glándula sublingual es la glándula salivar mayor que más tarde se desarrolla.

Bornet (1963), asegura que el conducto sublingual está contenido dentro de la misma vaina fibrosa que el conducto de Wharton y deduce que el origen de las dos glándulas es similar.

Dozin (1965) afina más y menciona que la glándula sublingual surge a partir de la vertiente lateral del surco paralingual medial.

Orts Llorca (1972) y Velázquez-Santana (1952) definen tres estrías o surcos en el suelo del estomodeo o boca primitiva, y más concretamente en la región alveolo-lingual: estría medial, intermedia y lateral que representan respectivamente las áreas prospectivas de las glándulas submandibular, sublingual mayor y sublingual menor.

Velázquez-Santana (1952), en su Tesis Doctoral sobre la morfología de la glándula submandibular, aporta datos sobre la glándula sublingual mayor y menor. La mayor deriva de la estría media y la menor de la estría lateral.

Orts Llorca (1972) afirma que la parte interna de la glándula procede de una evaginación de la estría medial y su porción de origen se fusiona con el

conducto excretor de la glándula submandibular para desembocar juntos en la papilla salivariis sublingualis. A esta porción glandular, se le denomina glándula sublingual mayor y a su conducto, conducto de Bartholin. La parte externa de la glándula sublingual procede de la estría lateral, constituyendo un número variable de pequeñas glándulas salivales (5-15) cuya porción glandular se denomina glándula sublingual menor. Los conductos excretores, llamados de Walther, desembocan en el suelo de la boca por fuera de la papilla salivariis sublingualis.

Young y Van Lennep (1978) dividen en cinco fases el desarrollo glandular sublingual y sugieren que estas fases están influenciadas por la interacción entre mesénquima y epitelio:

- Formación de un brote inicial
- Elongación del cordón celular
- Ramificación
- Canalización del cordón y de los lóbulos
- Diferenciación morfológica y funcional de los conductos y acinos.

Moore (1975) describe que las glándulas sublinguales aparecen un poco más tarde que las otras y se desarrollan como yemas múltiples endodérmicas en el surco paralingual. De estas yemas surgen una serie de conductos sólidos con extremos redondeados. Más adelante, desarrollan luces en el interior y los extremos se transforman en acinos.

Serrano (1983), en su tesis doctoral sobre el desarrollo de la glándula submandibular, aclara unos conceptos sobre la vecina glándula sublingual:

---

lateral al surco paralingual medial, aparece otro que denominan surco paralingual lateral entre los que existen diferencias, siendo el medial el que adquiere una mayor diferenciación celular. A esta área prospectiva del suelo de la boca, le apoda listón mandíbulo-lingual. Serrano aboga por la siguiente secuencia: conforme crece el surco paralingual medial, queda incorporado a él la condensación paralingual lateral, desapareciendo el surco paralingual lateral e incorporándose al proceso de invaginación del epitelio submandibular.

En cuanto a la presencia de la cápsula glandular, existen ciertas diferencias entre los autores. Moral (1915), concluye que la glándula sublingual no posee ninguna cápsula independiente. En cambio, Fishel (1929) expresa que la cápsula embrionaria se forma por un estímulo del epitelio y Johns (1971) menciona que el mesénquima se condensa para crear un esbozo capsular en forma de tejido conectivo común para todas las glándulas sublinguales, y que cronológicamente aparece antes en la glándula submandibular y sublingual que en la glándula parótida. Moore (1975) describe que la cápsula glandular deriva del mesénquima circundante.

En su Tesis Doctoral, Rodríguez Vázquez MC(1987), describe un anlage capsular independiente y propio para el esbozo de la glándula sublingual, a partir del inicio del periodo fetal.

El origen del epitelio es otro elemento de controversia y se debate si el origen es del ectodermo o endodermo. Las discrepancias sobre qué porción exacta del epitelio oral contribuye a iniciar la formación de las glándulas salivares se justifica por la dificultad en discernir donde se encuentra exactamente la unión que separa el endodermo del ectodermo (Johns, 1977)

Moore (2013) en su libro comenta que las glándulas sublinguales se desarrollan a partir de múltiples yemas epiteliales endodérmicas, en el surco paralingual. Coincidiendo con él, Martínez Madrigal (1989) asegura que el parénquima glandular parece derivar del endodermo. En la misma línea, Schoenwolf (2014) en el libro Larsen's Human embryology defiende la hipótesis endodérmica.

Sin embargo, Johns (1977) generaliza y establece el origen de las glándulas salivares mayores en el ectodermo, menos la glándula parótida que la sitúa en el endodermo. Aún así, deja abierto el debate y sugiere realizar más investigaciones para esclarecer el origen, ya que la presencia de glándulas sebáceas en la parótida sugieren un origen ectodérmico.

Dubrevil (1929) considera que las glándulas salivares derivan del epitelio bucal ectodérmico.

Chi (1996) tiene ciertas dudas sobre el origen epitelial de la glándula submandibular y sublingual, pero asegura que son de origen ectodérmico probablemente, al contrario de lo que ocurre con las glándulas menores linguales que, sin duda, derivan del endodermo.

Más recientemente, el uso del rastreo genético usando marcadores específicos ha ayudado a esclarecer el origen embriológico de muchas células, incluidas las de origen salivar. El mesénquima y los nervios tienen un origen en la cresta neural, como indica su marcaje con Wnt1-Cre, en un estudio de Jaskoll (2003). Rothova (2012) intenta esclarecer la duda sobre la contribución del endodermo a la formación de los tejidos de la cavidad oral. Con unos marcadores (Sox 17-2A-iCre/R26R), en ratones, las células progenitoras endodérmicas son rastreadas y se valora la presencia de endodermo en dientes, glándulas y papilas gustativas. Concluyen que no hay rastro de células endodérmicas en las glándulas salivares ni en los dientes mientras que en las glándulas menores de la lengua sí se puede confirmar el origen endodérmico. Sugieren, por lo tanto, un origen ectodérmico.

Patel (2014) hace referencia en su artículo investigando posibles vías de regeneración salival que, en modelos animales y humanos afectados de ectodisplasias (afectan específicamente a órganos ectodérmicos), muestran glándulas aberrantes, aludiendo a su origen ectodérmico. Asegura que son necesarios más estudios en profundidad con un marcador específico ectodérmico para confirmar esta hipótesis.

A pesar de esta controversia, Tucker (2007) en su libro sobre las glándulas salivares, afirma que las glándulas mayores están reconocidas como órganos ectodérmicos junto a otras glándulas exocrinas como la glándula mamaria, las glándulas sudoríparas y sebáceas, y órganos como los dientes, el pelo o las uñas. Como todo órgano ectodérmico, se origina de dos tejidos adyacentes

pero de distinto origen, el epitelio y el mesénquima, que continuamente entran en una relación recíproca, secuencial y constante a nivel biológico y molecular.

Para tener una aproximación más certera de lo que ocurre en humanos, la tesis de Rodríguez Vázquez MC (1987) sirve como perfecta descripción y actualización del desarrollo de la glándula sublingual. Mediante el estudio de 28 embriones y fetos humanos de la Embrioteca del Departamento de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de Granada, describe el periodo embrionario y fetal hasta las 14 semanas, para aportar datos sobre esta glándula poco estudiada y que hasta el momento consideramos ser la mejor referencia bibliográfica para describir el horario morfogénico de esta glándula.

Los embriones y fetos tienen una edad que oscila entre los 48 días y 14 semanas y una longitud entre los 17 mm y los 117mm.

La primera descripción que se realiza del esbozo de la glándula sublingual es a finales del estadio 21 de O'Rahilly en un embrión de 23 mm, donde se visualizan unas pequeñas crestas epiblasticas glandulares que se originan a partir del área prospectiva sublingual y que se invaginan en el mesénquima. Sirven para originar el primordio de la glándula sublingual mayor.

En el estadio 22 (24,5 mm), existe la yema o brote epiblastico que esboza la glándula sublingual mayor junto a un pequeño cordón sólido. Junto a esta glándula, más lateral, surge el esbozo de glándula sublingual menor, considerándose una de las apariciones más precoces que se conocen de esta

---

pequeña glándula. El área prospectiva sublingual adopta una forma y tiene un espacio más definido, mientras que la glándula submandibular está más avanzada y está en su periodo de arborización. En embriones de 27, 28, 29, 30 mm, menciona que el desarrollo de la glándula sublingual parece “entretenido” y no avanzar rápido. Destaca que no parece presentar ningún signo de engrosamiento capsular. Entrando en el periodo fetal temprano (8ª semana), en fetos de más de 40 mm, el desarrollo continúa dando lugar a la arborización glandular. Aparecen los botones secundarios glandulares sólidos y surgen múltiples pequeñas glándulas sublinguales menores. En fetos de 50 mm, se evidencia un mayor desarrollo de la glándula mayor, con más arborización, luces intracanaliculares y septos interlobulillares. La glándula sublingual menor parece ser más lenta en su desarrollo. Más allá de los 60 mm, la unidad anatómica de la glándula sublingual tal y como la conocemos en el adulto parece una realidad. Es la suma de glándula sublingual mayor y menor. En un feto de 90 mm, asegura que desde el punto de visto citoestructural la glándula submandibular y sublingual son superponibles. En este punto, existe una arborización considerable y se evidencian los nervios que parten del ganglion sublingual. Al estar en la vecindad de la glándula submandibular, se puede fácilmente confundir el polo posterior de la glándula sublingual con la porción sublingual de la glándula submandibular. Finalmente, a las 14 semanas (113 mm), la glándula sublingual emula en miniatura a la glándula sublingual del adulto.

### 3. Modo y causas del desarrollo glandular salivar

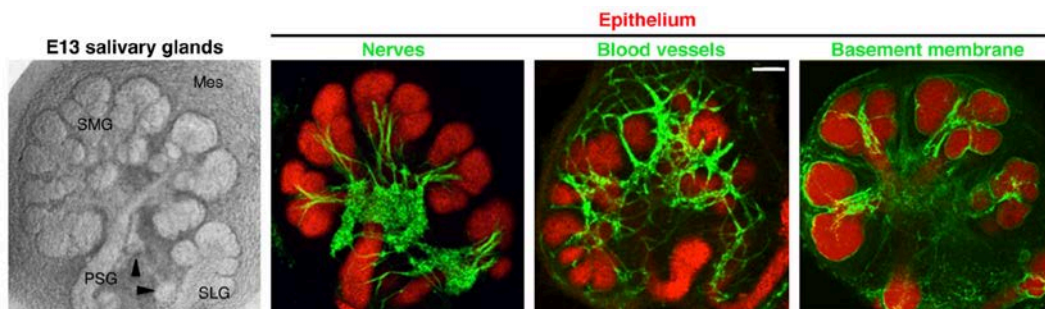
Las tres glándulas salivares mayores tienen estructuras histológicas muy distintas pero comparten mecanismos comunes en el desarrollo embriológico siguiendo el patrón de morfogénesis en ramificación (Denny 1997). La organogénesis implica coordinación entre células, proliferación celular, diferenciación, migración, apoptosis e interacción epitelio-mesénquima-endotelio-nervio (Knosp 2012).

#### Interacción epitelio-mesénquima: estudios clásicos

La formación y desarrollo completo del complejo sistema de las glándulas salivares necesita de una perfecta conjugación entre el epitelio y el mesénquima, en el cual se invagina, al igual que una coordinación entre células endoteliales, neuronales y linfáticas, que promueven la proliferación, la supervivencia, la apoptosis, el recambio celular, la adhesión y la movilidad celular. El papel del endotelio y el sistema linfático no está bien estudiado y en la actualidad los estudios se centran en el papel esencial del contacto epitelio-mesénquima y del epitelio-tejido neuronal. La glándula submandibular es el modelo ideal para realizar este tipo de estudios puesto que sus componentes epitelial, mesenquimal y neuronal pueden ser separados independientemente

para facilitar su estudio de manera individual o recombiniéndolos con otras extirpes celulares (Tucker 2007).

Los estudios modernos han ido encaminados a determinar de qué manera los embriones son capaces de generar glándulas para utilizar estos mismos mecanismos en las terapias regenerativas tisulares y así posibilitar el recambio de una glándula enferma, atrófica o tumoral (Denny 1997, Patel 2006)



Esquema 5: Interacciones del epitelio (rojo) con tejido neuronal (Tubb3), endotelio (Pecam), y membrana basal (Perlecan) que regulan la ramificación glandular en las glándulas submandibular (SMG) y sublingual (SLG). Patel y Hoffman (2014).

En este sentido, comienza Borghese (1950) a investigar sobre las causas del desarrollo glandular mediante estudios in vitro en ratones ( *Mus musculus*) en

los que las glándulas salivares son explantadas y posteriormente estudiadas in vitro. Este estudio es el que proporciona el sustrato básico para las futuras investigaciones. En su discusión, comenta que el desarrollo global in vitro es muy similar a lo que ocurre en el embrión normal, aunque existen ciertas diferencias: cuando las yemas son explantadas en una etapa más prematura su desarrollo se ve enlentecido. Esto lo demuestra objetivando que in vitro a los 4 ó 5 días se han formado solamente una docena de brotes, mientras que una glándula de características similares produce miles de acinos in vivo.

Sin embargo, un desarrollo más normal se obtiene cuando se explantan las glándulas que ya han producido 4-10 brotes epiteliales en el momento de la explantación. El desarrollo en este caso es prácticamente normal in vitro. En estadíos más avanzados aún, cuando la glándula tiene varios brotes, la glándula in vitro continúa ramificándose copiosamente, produciendo una secreción mucosa normal. Los conductos excretores y los acinos se encuentran más dilatados. Otra conclusión a la que llega es que las glándulas submandibular y sublingual se desarrollan más corrientemente si se explantan juntas con una cápsula única que cuando se separan y disecan aparte. Refiere como última conclusión en su artículo original que su trabajo apoya la teoría de Heidenhain (1920) que afirma que existe una unidad morfológica glandular terminal, que repetidamente se divide y forma un árbol glandular.

Otro estudio clásico del desarrollo embriológico glandular es el de Grobstein (1953). Sostiene la teoría de que el mesénquima de tipo salivar es el único que proporciona un sustrato adecuado para un patrón de ramificación normal del epitelio. Este estudio se considera el más representativo, ilustrando la

especificidad mesenquimal en las etapas del desarrollo embriológico y que posteriormente, con las mejoras en las técnicas de laboratorio y de inmunohistoquímica, han inspirado estudios más modernos que se han centrado en cómo el mesénquima ejerce su influencia en el patrón de desarrollo epitelial (Quiros 2015).

En los años 70, se realizan estudios sobre recombinación tisular heterotópica, donde el mesénquima de las glándulas salivares es recombinado con epitelio de otras zonas: Lawson (1972) aporta epitelio parotídeo, Sakakura (1976) con epitelio mamario, Tyler y Koch (1977) con epitelio palatino destinado a convertirse en epitelio oral y nasal. La conclusión que generan estos estudios es que el mesénquima glandular submandibular fuerza al epitelio a seguir un patrón de ramificación similar al glandular, manteniendo cada epitelio su tipo de citodiferenciación. Igualmente, demuestran que el resultado de la recombinación es muy dependiente del estadio en el que se realice.

Existen estudios que indican que la diferenciación celular sigue un camino diferente del proceso de ramificación, sugiriendo que existen unos mecanismos reguladores diferentes para cada proceso (Tucker 2007).

Aunque el patrón de morfogénesis en ramificación puede verse modificado por el mesénquima, la citodiferenciación de las células epiteliales no se puede alterar en muchos casos. Lawson (1972) utiliza mesénquima submandibular de rata y lo combina con epitelio parotídeo de rata, y observa que el epitelio continúa secretando amilasa en los acinos serosos, en vez de acinos mucosos, como debería de ser en la glándula submandibular de rata.

En las recombinaciones realizadas entre epitelio de glándula mamaria y mesénquima glandular, se observa que el patrón de ramificación es el glandular pero el epitelio sigue la vía mamaria y es capaz de secretar proteínas lácteas cuando se estimula (Sakakura 1976).

Sin embargo, estos estudios establecen una limitación: el resultado puede ser variable en función del tipo celular utilizado y del momento de la recombinación. Así, Kusakabe (1985) recombina el epitelio hipofisario temprano (8,5 días) con mesénquima glandular y describe que desarrollan una morfología glandular y una secreción de amilasa. Sin embargo, el epitelio hipofisario más tardío no tiene esta flexibilidad.

Asimismo, mediante la recombinación se puede evaluar la influencia sobre la arquitectura glandular, además del patrón de ramificación y de la citodiferenciación, como ya hemos visto. Cuando se recombina el epitelio pulmonar con mesénquima glandular, el epitelio pulmonar pierde su polaridad característica, empieza a colapsarse y desaparecen las luces, sugiriendo un control del mesénquima sobre la integridad arquitectónica del epitelio (Tucker 2007).

Cutler (1977, 1980, 1973, 1974, 1991) relata que las interacciones entre el epitelio y el mesénquima no sólo son necesarias para el desarrollo de las glándulas salivares, sino de otros tejidos como la piel, los dientes, la glándula mamaria, el timo, el tiroides, el páncreas y otros. Sin embargo, por aquella época se desconocían la mayoría de los mecanismos de interacción que hoy en día están más esclarecidos.

---

En 1980, demuestra que el epitelio de la glándula submandibular de rata en el día 16 (etapa de ramificación precoz) es capaz de diferenciarse en ausencia de mesénquima, mientras que los del día 15 (sin ramificación) no lo eran. En este periodo de tiempo, demuestra igualmente que existen unas uniones verdaderas entre el mesénquima y las células epiteliales del brote invaginado, y que este tipo de interacciones tiene una duración de 2 días únicamente y ocurre exclusivamente en este momento del desarrollo (Cutler, 1980; Denny, 1997). Redman y Ball (1978), describen estas uniones transitorias en la glándula sublingual en un momento similar del desarrollo. Parece por lo tanto, que los mecanismos que fijan el fenotipo celular se completan durante este periodo corto de tiempo, antes que los que regulan el crecimiento morfogenético.

Wells (2013) demuestra mediante la recombinación hereditaria tisular en diferentes estadios del desarrollo de la glándula submandibular, que el epitelio y el estroma poseen una capacidad reprogramadora intrínseca dependiente del tiempo de desarrollo. La capacidad de inducir el desarrollo reside en el epitelio y en el mesénquima salivar antes del estadio de 12, 5 días. Sin embargo, más adelante, la información necesaria para conducir el desarrollo glandular está contenida únicamente en el mesénquima glandular.

Las interacciones entre el epitelio y el mesénquima son necesarias para la morfogénesis glandular pero Cutler también insiste, sobre el papel de la interacción epitelio-mesénquima para la diferenciación de las células secretoras (Cutler, 1991) .

En el momento en que la glándula en ramificación forma una barrera epitelial (15 días), las células muestran los primeros signos de diferenciación hacia células productoras de proteínas, con un retículo endoplasmático rugoso extenso, un complejo de Golgi muy activo y unos gránulos de secreción. En este momento, mediante técnicas inmunohistoquímicas, se detectan las primeras proteínas secretadas. Estos hallazgos aparecen en la glándula submandibular hacia el día 15 y continúan después del nacimiento para diferenciarse definitivamente (Cutler, 1974). En la glándula parótida, el desarrollo es más lento y los primeros gránulos de secreción aparecen un día después del nacimiento (Redman y Sreebny, 1971). Cutler asegura que los contactos directos que se establecen entre el epitelio y el mesénquima juegan un papel esencial iniciando la secuencia de eventos que permiten la adquisición de la capacidad secretora de las células. Cuando se separa el epitelio salivar del mesénquima antes de establecerse los contactos celulares directos entre el epitelio y el mesénquima, la diferenciación de las células secretoras no ocurre. Sin embargo, si las células epiteliales son separadas del mesénquima y cultivadas, después de que los contactos hayan existido, la mayoría de las células desarrollan la actividad secretora. En esa diferenciación hacia células secretoras, hace hincapié en el papel de la membrana basal y la matriz extracelular (Cutler 1980, 1991).

Kashimata y Gresik (1996) establecen una serie de requisitos para que el proceso de morfogénesis en ramificación glandular se haga efectivo. En primer lugar, refieren que la ramificación del espécimen es directamente dependiente

de la cantidad de mesénquima subyacente y que solo se produce si este mesénquima está vivo. La matrix extracelular y la existencia de una membrana basal son fundamentales y la ramificación requiere de una participación exhaustiva del esqueleto epitelial, compuesto por actina fundamentalmente.

Desde los estudios de Cutler, el estudio de las relaciones epitelio-mesénquima ha ido encaminado a descifrar las vías de señalización molecular y los genes que están implicados en el desarrollo de la glándula submandibular. Se han identificando múltiples factores y cascadas de señalización liberados por el mesénquima, cuyos receptores se encuentran en la membrana plasmática del epitelio, que facilitan la interacción epitelio-mesénquima. Todas las vías de señalización convergen para regular los fenómenos morfogenéticos que ocurren en el desarrollo de las glándulas salivares.

Todas las glándulas exocrinas y otros órganos como el pulmón o el riñón siguen un patrón de desarrollo similar basado en una morfogénesis en ramificación. El análisis ex vivo de las glándulas salivares submandibulares del embrión de rata es una herramienta potente para investigar los mecanismos moleculares que intervienen en la ramificación glandular (Denny 1997; Patel, 2006; Gresik, 2009; Harunaga 2011).

### Factores mesenquimales implicados en el inicio del desarrollo

En los estadios **iniciales** de la formación glandular, no están todavía aclaradas las señales que provocan que las células de la cresta neural migren para

formar la condensación mesenquimática en el lugar apropiado, es decir, debajo justo del epitelio oral (Tucker 2007). En cambio, se sabe que el mesénquima aporta señales que permiten que se inicie el desarrollo glandular. Al estudiar unos ratones en los cuales se anulan genes como Fgf 10, Fgfr2b, Pitx1 y p63, se observa una aplasia de las glándulas salivares y se deduce que estos genes tienen un papel crítico para iniciar la formación glandular (Tucker 2007).

### Factores mesenquimales implicados en la ramificación o estadio pseudoglandular

La proliferación de los brotes en el proceso de **ramificación** está coordinada por unos factores de crecimiento, principalmente localizados en los brotes más periféricos (Patel, 2006).

Uno de los más estudiados e importantes es el factor de crecimiento fibroblástico (FGF). FGF es un factor de crecimiento que aumenta el índice de actividad mitótica y síntesis de ADN, actuando como factor de señalización. 22 y 23 FGF han sido identificados en humanos y ratones, respectivamente.

Ejercen su función a través de una unión específica con sus 4 receptores con actividad tirosin-kinasa (FGFR 1-4) y así regulan múltiples procesos celulares como la proliferación, la supervivencia, la apoptosis, la migración, la morfogénesis y el mantenimiento de células madre. Cuando se liberan los FGF, necesitan del cofactor Heparan Sulfato (HS) para aumentar la afinidad en la unión FGF:FGFR (Cannon, 2015).

Los ratones desprovistos de FGF10 y FGFR2B no desarrollan glándulas salivares, lo que sugiere un papel crucial de FGF10:FGFR2b como señalizador en el inicio de la formación glandular ( Jaskoll, 2005; Patel 2006; Tucker, 2007; Gresik, 2009; Yamada, 2016).

En cuanto al desarrollo de la ramificación glandular y la proliferación, los FGF juegan un papel importante. FGF 7 y FGF 10 se unen al mismo receptor FGFR2B. Steinberg (2005) establece un rol diferente a FGF 7 y a FGF 10 en ratones estimulados con ligandos FGFR2b. FGF 7 produce o estimula la aparición de brotes epiteliales mientras FGF10 induce la formación de estructuras ductales alargadas (Patel, 2006; Tucker, 2007; Patel, 2011). La señal producida por la unión FGF10:FGFR2b parece amplificar la señal de los receptores FGFR, incrementando la transcripción de FGFR1B, FGFR2B y FGF1, necesarias para la proliferación de los brotes terminales y su diferenciación (Wells, 2013). Patel (2006) sugiere que FGF 8 interviene en estadios más avanzados, ya que los ratones FGF8 - consiguen iniciar su desarrollo pero tienen defectos en la diferenciación y no pasan de un estadio inicial. En estudios donde la expresión de FGFR1 y FGFR2 disminuye, se observa una disminución en la morfogénesis en ramificación de la glándula. (De Moerlooze, 2000; Hoffman, 2002; Steinberg ,2005).

El papel de los FGF en el desarrollo epitelial también ha sido objeto de estudios. Eliminando el mesénquima, se eliminan los factores de crecimiento endógenos y el epitelio experimenta una degeneración. Una combinación de FGF 7 y de factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimula el crecimiento

epitelial en ausencia de mesénquima, en un estudio de Takahashi y Nogawa (1991).

La proteína Sonic Hedgehog (Shh) participa en la morfogénesis en ramificación de los pulmones, riñones y glándulas salivares. En los ratones Shh-, las glándulas salivares detienen su crecimiento después del día 14. Cuando se añade Shh a los cultivos glandulares, la ramificación aumenta, mientras que usando un inhibidor de Shh (ciclopamina) se observa una reducción de la proliferación y la ramificación. Este fenómeno puede ser rescatado añadiendo FGF 8 (Jaskoll, 2004).

La unión de los FGF con sus receptores encadena una cascada de activación intracelular que da lugar a una activación de la transcripción y un aumento de la expresión génica. Las vías de señalización incluyen PLC  $\gamma$  1, PI3K/PKB, FRS2/Ras/MAPK, con efectos en el citoesqueleto, antiapoptosis, y proliferación, respectivamente (Lombaert, 2011). Por ejemplo, Koyama demuestra que la inhibición de PI3K provoca la disminución de la morfogénesis en ramificación (Koyama, 2003).

Otra familia de factores de crecimiento, los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), modulan la señal de los FGF. Mediante la señal de PDGF, los FGF 1, 3, 7 y 10, producidos por el mesénquima, se potencian. Cuando se añade PDGF exógeno, se induce la expresión de FGF y la proliferación epitelial; mientras que la pérdida de la señal PDGF provoca la inhibición de la expresión de FGF. Aún así, el defecto de la morfogénesis

causado por la inhibición de los PDGF puede ser revertido añadiendo FGF7 y FGF10 exógeno (Yamamoto, 2008).

La familia de las proteínas secretadas WNT forman parte de un grupo de moléculas señalizadoras que juegan un papel crucial en las comunicaciones célula-célula durante el desarrollo (Patel, 2011). La señalización por la vía WNT está muy presente durante el desarrollo de la glándula submandibular. Durante los primeros estadios, están localizadas en el mesénquima pero a partir del estadio día 14,5, se depositan en el epitelio de la región ductal. Haara demuestra que la reducción en la señal de las WNT reduce la morfogénesis en ramificación glandular. En los brotes terminales, la señalización WNT está inhibida por la señal FGF, a través del antagonista sFRP. Este hecho mantiene los brotes terminales en un estado de indiferenciación mientras que las estructuras ductales siguen diferenciándose (Haara, 2011; Ryu, 2013).

La vía de la ectodisplasia (Eda) está implicada en la morfogénesis en ramificación glandular y pertenece a la superfamilia de los factores de necrosis tumoral (TNF). Esta vía tiene múltiples funciones en el desarrollo glandular: ramificación, formación de lúmenes y diferenciación (Jaskoll, 2003; Haara, 2011). Más adelante detallamos un poco más en relación a la fase canalicular.

El factor de crecimiento epitelial (EGF) mediante su receptor EGFR (4 receptores) participa en el proceso de proliferación durante la morfogénesis

como demuestra el estudio en el que los ratones EGFR – tienen menos proliferación, ramificaciones y maduración del epitelio (Haara, 2011). El receptor EGFR está muy presente en las estructuras ductales en desarrollo y tanto el EGF como el factor de necrosis tumoral (TNF) pueden actuar como ligandos. En la rata con anulación del EGFR, los tejidos epiteliales son anormales y mueren antes del 8º día de nacimiento por los defectos causados en los órganos epiteliales. En la glándula submandibular sin EGFR, se observan menos brotes terminales, pero sin diferencia en la maduración de esos brotes (Patel, 2006).

La superfamilia de los factores de crecimiento transformante (TGF  $\beta$ ) también juega un papel crucial en la morfogénesis en ramificación de las glándulas salivares. Cuando se añaden TGFs a cultivos de glándula, se observa un incremento de la ramificación, aunque no existan defectos glandulares en ratones con delección de TGF  $\beta$ 1, TGF  $\beta$ 2 (Jaskoll 1999, 2002; Tucker, 2007).

Tucker (2007) también hace referencia a las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP), de tal manera que en el ratón BMP7 - , el mesénquima está desorganizado y el tejido epitelial poco ramificado y con menos luces en su interior. La ramificación se inhibe por BMP 4, pero se estimula por BMP 7. Éste último es capaz de rescatar la ramificación en cultivos tratados con inhibidores de FGF, indicando de nuevo el rol de promotor de la proliferación y ramificación (Tucker, 2007; Patel, 2006).

Patel en su extensa revisión, hace alusión a otros factores implicados en la morfogénesis en ramificación como las activinas  $\beta A$ , y  $\beta B$ ; gen p63, manteniendo las células progenitoras necesarias para el desarrollo epitelial y la morfogénesis; Six1; Pitx1; Interleukinas (IL-6) que aumenta el número de ramificaciones y brotes terminales (Patel, 2006.)

### Factores mesenquimales implicados en la fase canalicular

El proceso de **formación de luz** en el interior de los conductos , en la fase canalicular, no está bien aclarado, pero se propone que está guiado por la apoptosis de las células centrales ductales para dejar espacio a la luz. El mediador de la apoptosis ha sido indentificado en esta zona como una proteasas llamada caspasa 3. Las células más periféricas que sobreviven a la muerte celular programada expresan una proteína inhibidora de la apoptosis (IAP), llamada survivina. Se ha demostrado que consigue inhibir eficazmente a las caspasas y se encuentra en las glándulas salivares en las células de revestimiento de las luces, actuando como una barrera para evitar la difusión de la apoptosis (Tucker, 2007).

El equilibrio entre apoptosis y proliferación se ha vinculado al Factor de Necrosis tumoral (TNF), de tal manera que el receptor TNFR1 está relacionado con el lugar de la formación de las luces y puede transducir señales tanto de proliferación como de muerte celular (Tucker, 2007).

Otro factor que juega un papel en la formación de luces, es el Shh, de la familia de los péptidos hedgehog. La sobreexpresión de Shh provoca la formación prematura de luces en glándulas submandibulares de 14 días (Hashizume A, 2006).

La vía de la ectodisplasia es clave en el desarrollo de los órganos de origen ectodérmico. La proteína ectodisplasia A (Eda) pertenece a la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF) y manifiesta su función mediante el receptor Edar. En humanos, las mutaciones que afectan a la vía Eda:Edar provocan una displasia ectodérmica, con unas glándulas salivares disfuncionales, y glándulas sudoríparas hipoplásicas. Eda se expresa en el mesénquima mientras que su receptor Edar se encuentra en el epitelio glandular. En las glándulas donde la proteína Eda está mutada, se observan unas glándulas hipoplásicas, y las mutaciones que afectan a Edar generan unas glándulas displásicas, sin acinos ni luces. Eda está igualmente vinculado con la proliferación de la ramificación glandular, ya que cuando se añade Eda a cultivos de glándulas submandibular, la ramificación está incrementada.

(Melnick 2000, 2009; Jaskoll, 2003; Harunaga, 2011; Haara 2009, 2011)

## Factores de la matriz extracelular y la membrana basal implicados en la fase de desarrollo pseudoglandular y ramificación

La membrana basal es una fina capa de la matriz extracelular que separa el epitelio del mesénquima subyacente. La matriz extracelular es una malla de proteínas fibrilares y no fibrilares y cadenas de glucosaminoglicanos donde lípidos, enzimas y factores de crecimiento están entremezclados y cohabitan en continuo recambio (Tucker, 2007).

Al separar el epitelio glandular del mesénquima por un filtro in vitro, el epitelio de la glándula se desarrolla escasamente. En cambio, si se interpone un sustituto de la membrana basal, Matrigel, la morfogénesis en ramificación glandular retoma su vía habitual (Takahashi, 1991).

La membrana basal que rodea el epitelio contiene un número muy elevado de moléculas como los glucosaminoglicanos (GAG), colágeno y fibronectina, integrinas, lamininas, etc, que permiten realizar las interacciones celulares con la matriz extracelular (Patel, 2006).

Los GAG se acumulan en los lugares donde el epitelio crece rápidamente y donde se produce la ramificación. En el estadio inicial, el Condroitín Sulfato (CS) es el glucosaminoglicano más preponderante, pero es remplazado por el Heparán Sulfato (HS) cuando progresa la ramificación y la maduración (Banarjee, 1977). En cultivos de glándula submandibular, el CS exógeno o su inhibidor (condroitinasas) no afectan a la ramificación. Por otro lado, si se

elimina el HS se inhibe la ramificación (Thompson y Spooner, 1983; Nakanishi, 1993).

Los estudios de Grobstein mostraron, entre otros resultados, que el colágeno circundante a los conductos y en las hendiduras epiteliales estaba implicado en la ramificación. El colágeno tipo I y III se acumulan preferentemente en las hendiduras epiteliales y su degradación con colagenasas provoca la inhibición de la ramificación (Grobstein y Cohen, 1965).

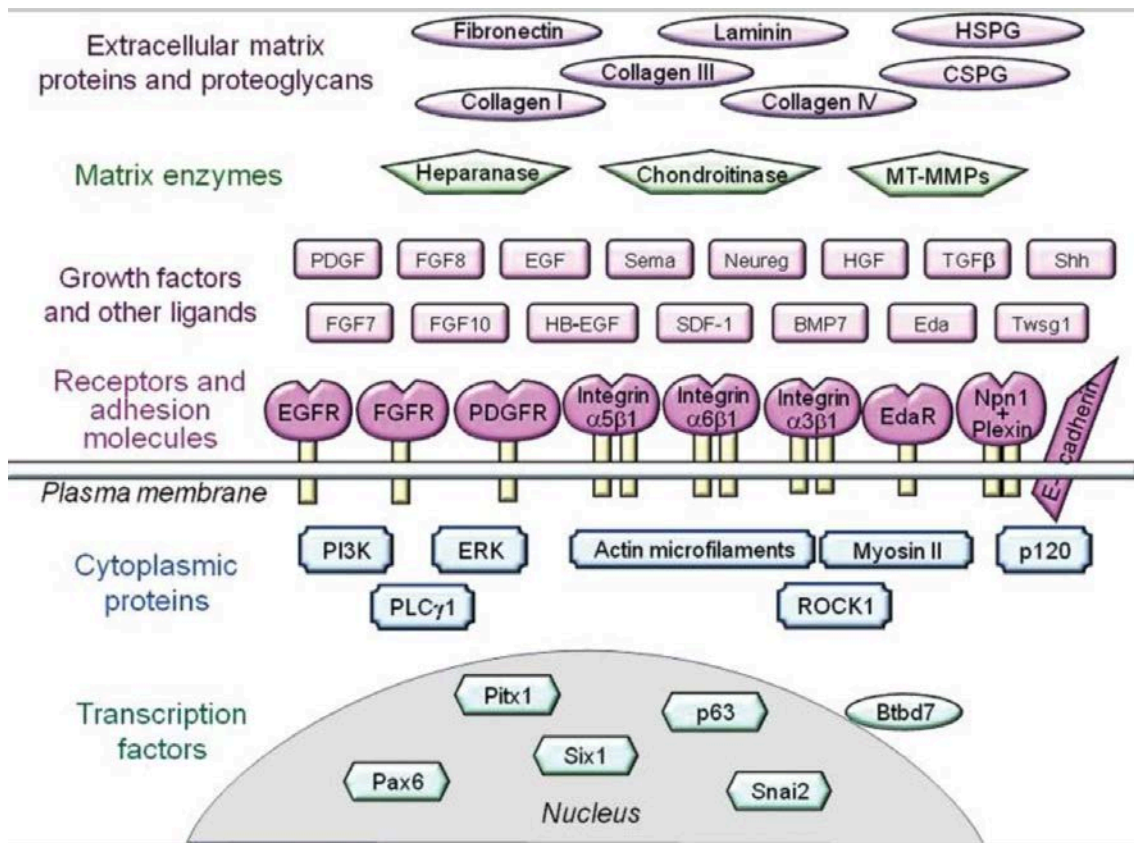
La fibronectina es otra proteína presente en el mesénquima durante el desarrollo de la glándula submandibular. Se considera una proteína esencial en los primeros estadios del desarrollo submandibular y sublingual, 12,5 días, para el desarrollo de las hendiduras epiteliales. La inhibición de la fibronectina con anti  $\alpha 5$  o anti  $\beta 2$  integrina disminuye la formación de las hendiduras y de la ramificación. Los diferentes estudios sobre la fibronectina parecen concluir que ésta puede ser una molécula señalizadora para la matriz extracelular y el colágeno para que se acumulen en el lugar de las hendiduras (Sakai, 2003; Kumagai, 2003)

Las lamininas es otro elemento que pertenece a la lámina basal. La laminina-111 y la laminina-511 juegan un papel importante en los momentos iniciales del desarrollo (Patel, 2006).

La reestructuración y recambio de la matriz extracelular corre a cargo de las metaloproteasas (MMP) mediante la escisión de las proteínas y fibras de la matriz como el colágeno, fibronectina, lamininas, Heparán sulfato, etc. Un incremento del número de hendiduras puede observarse tras usar un inhibidor de las metaloproteasas (Simian, 2001).

Las integrinas y las cadherinas son moléculas de adhesión celular, que participan en el desarrollo glandular. Las cadherinas median la adhesión célula-célula por sus dominios extracelulares entre células, mientras que sus dominios intracelulares interactúan con cateninas, que unen las cadherinas al citoesqueleto. La  $\alpha 6$  integrina está localizada en la superficie basal epitelial y su inhibición deriva en una regresión de la ramificación. Su expresión está regulada por los niveles de EGF, vistos anteriormente (Tucker, 2007).

La importancia de la capacidad contráctil de la actinmiosina es imprescindible para la migración celular y se sabe que los filamentos de actina están implicados en la ramificación salivar (Spooner, 1972). La inhibición de Rho Kinasa (ROCK) y de la contracción actinmiosina interrumpe la morfogénesis glandular y genera unas hendiduras aberrantes. La capacidad contráctil actúa como fuerza mecánica para la formación de estas hendiduras (Harunaga, 2011; Cannon, 2015)



Esquema 6: Revisión esquemática de las proteínas necesarias para el desarrollo en ramificación de las glándulas salivares. Se observan múltiples proteínas de la matriz extracelular, enzimas de la matriz, factores de crecimiento y ligandos, receptores transmembrana y moléculas de adhesión. (Harunaga, 2011).

### Influencia neuronal de la morfogénesis salivar

Como ya se ha mencionado antes, el desarrollo glandular es dependiente de las múltiples interacciones que se establecen entre las células y los diferentes tejidos que comprenden la glándula, y el tejido neuronal es uno más que contribuye a este desarrollo.

Arraez Aybar (1991) describe que el complejo ganglioneural del nervio lingual parece delimitar qué porción del epitelio constituirá el conducto y qué porción la glándula. En esta misma línea, Quirós (2015) concluye que las relaciones del esbozo glandular submandibular con el complejo ganglioneural lingual marcan qué porción epitelial será la glándula y cual será el conducto. Dozin (1963) ya describe que dicho complejo precede a la aparición del esbozo epitelial de la glándula submandibular y sospecha sobre su papel inductor y guía de la formación glandular.

En 1937, Paulov utiliza sus experimentos del reflejo condicionado para describir el papel de sistema nervioso autónomo en la función de las glándulas salivares.

Aún así, no es hasta hace unos pocos años, que el papel del sistema simpático y parasimpático en el desarrollo glandular ha sido esclarecido (Ferreira y Hoffman, 2013; Knox 2010).

El sistema parasimpático libera Acetilcolina (ACh) que activa los receptores epiteliales muscarínicos (M), siendo M1 el mayor receptor muscarínico en el epitelio embriológico glandular submandibular (Cannon, 2015).

Knox en su artículo reciente, separa mecánicamente el ganglio submandibular parasimpático (PSG) del conjunto de la glándula embrionaria de ratón.

Establece una serie de conclusiones (Knox, 2010)

- En ausencia del PSG y al perturbar la unión Ach/M1, el epitelio muestra un número muy deficiente de brotes terminales, lo que demuestra que la morfogénesis está asociada en parte a una influencia neuronal.

- El ganglio parasimpático modula la morfogénesis epitelial mediante la Ach/M1 que actúan sobre los progenitores celulares epiteliales.
- Una posible regeneración salivar sería posible si existe un estímulo muscarínico sobre los progenitores celulares.
- La proliferación y diferenciación de los progenitores K5+ en progenitores K19 (keratina positivos) está mediada por la señalización muscarínica M1 y por el EGFR. Así, la inervación parasimpática mantiene la población de células progenitoras epiteliales en un estado indiferenciado durante la organogénesis salivar.

Nedvestky, en colaboración Knox, demuestran que el sistema parasimpático coordina la formación de los túbulos epiteliales en la glándula en desarrollo, gracias al neurotransmisor VIP y su receptor VIPR1 que median en la proliferación, la elongación ductal, la formación de luces y la expansión de las luces.

La Neurturina (NRTN) es un factor neurotrófico que se une al receptor GFRa2. Los ratones que contienen menos NRTN y GFRa2 tienen ganglios parasimpáticos más pequeños y muestran defectos en las funciones epiteliales glandulares. Se ha demostrado que es necesario para el crecimiento neuronal que se dirige hacia el epitelio en desarrollo. Los anticuerpos que lo bloquean reducen el número de interacciones epitelio-neuronales, inhibiendo así la ramificación (Nedvestky, 2014; Patel y Hoffman, 2014)

Kanno et al evidencian que el peso de la glándula submandibular denervada o parasimpatectomizada disminuye hasta en 70 % comparado con la rata control

(Kanno,1987). Murakami encuentra una reducción del 60 % de la glándula sublingual denervada (Murakami, 1991)

El sistema nervioso simpático activa los mecanismos secretores por la vía de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos. La implicación de este sistema es menor en el desarrollo glandular. Cuando se inhibe el sistema simpático con tirosin hidroxilasa los resultados muestran una incompleta inervación simpática, pero no se observan defectos en el desarrollo, la forma, proliferación, migración y diferenciación. En cambio, se sugiere esta falta de inervación pueda acarrear problemas en la función de la glándula (Patel y Hoffman, 2014; Cannon,2015)

### Influencia endotelial en la morfogénesis

Los estudios más recientes han llegado a dilucidar lo poco que se sabía de la influencia del endotelio en el desarrollo glandular.

Se sabe desde el año 2000 (Matsumoto, 2001) que las células endoteliales contribuyen al desarrollo de órganos como el hígado, páncreas y pulmón. Por ejemplo, en el hígado, la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) es fundamental en la morfogénesis y diferenciación temprana de los hepatocitos.

Mediante cultivos de explante de órganos, Kwon consigue examinar la influencia del endotelio en el patrón de crecimiento epitelial independiente de la

perfusión sanguínea, ya que los explantes no tienen perfusión pero imitan la morfogénesis y diferenciación de las glándulas in vivo.

Obtiene los siguientes resultados (Ryong Kwon, 2017):

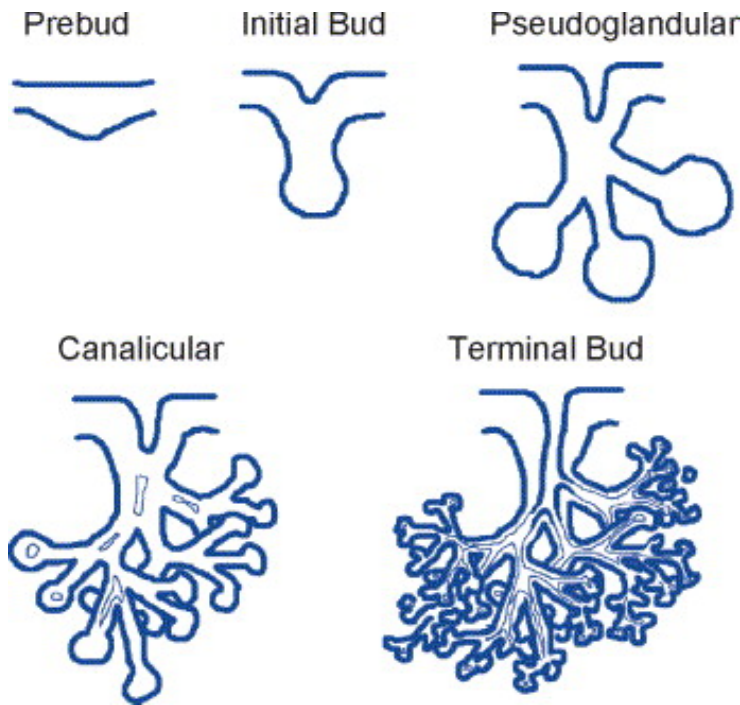
- El desarrollo de la red vascular está coordinada con la ramificación del epitelio salivar.
- Los inhibidores de VEGFR2 provocan una reducción significativa de la ramificación epitelial y alteran el patrón epitelial de los explantes comparadas con el control. Concluye además que la vía de señalización mediada por este receptor promueve la ramificación para favorecer la formación de brotes terminales sobre la formación de conductos.
- Las células endoteliales CD31+ promueven la ramificación epitelial en las glándulas con el mesénquima y el epitelio separados y luego recombinados y añadiendo células endoteliales.
- Las señales de VEGFR y la vascularización regulan la diferenciación de los progenitores epiteliales.
- Las células CD31+ promueven la proliferación epitelial y la diferenciación a través de factores solubles como las IGFBP (proteínas de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina).

El descubrimiento de los mecanismos moleculares por los cuales la vascularización influye en el patrón epitelial y su diferenciación, servirá en el futuro para extrapolar estos resultados a humanos y establecer nuevos tratamientos terapéuticos. Se estudiarán más a fondo las interacciones endotelio-epitelio y endotelio-neuronal.

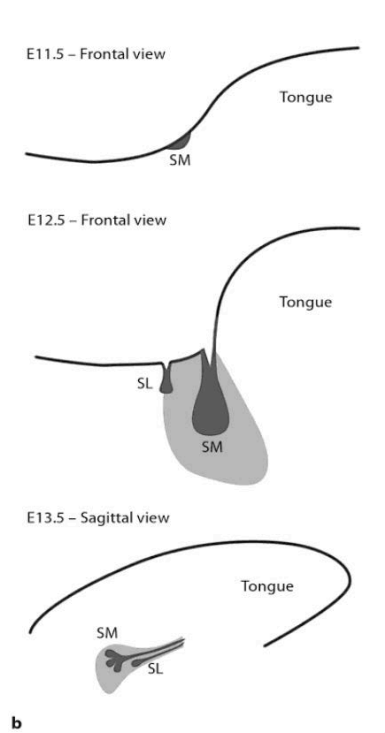
En la actualidad, también se está investigando la implicación de los agentes angiocrinos encargados de la homeostasis producidos por las células endoteliales y de la respuesta al trauma para mejorar las investigaciones sobre la regeneración de órganos (Rafii, 2016). Trasladar estos factores angiocrinos a la regeneración glandular salivar es el objeto de probables estudios futuros.

#### 4. Desarrollo embriológico de la glándula sublingual en rata

La glándula submandibular de rata ha sido clásicamente utilizada como modelo para estudiar el desarrollo de las glándulas salivares mayores en vertebrados ya que muestra un patrón clásico de morfogénesis en ramificación, dividiéndose en estadíos o sucesiones de eventos dinámicos relacionados estrechamente entre sí. Se llevan realizando estudios in vitro con este modelo desde hace más de 60 años (Grobstein, 1953; Ball, 1974; Mérida Velasco, 1993; Tucker, 2007)



Esquema 7: Estadíos del desarrollo de las glándulas salivares de rata. Estadío prebrote, brote inicial, pseudoglandular, canalicular, brote final (Tucker, 2007).



Esquema 8: Representación esquemática de la invaginación epitelial en el mesénquima que se condensa. cortes frontales, corte sagital.

Epitelio: Gris oscuro, mesénquima: gris claro.

(Tucker, 2010)

El primer estadio o fase prebrote, es descrito en el día 11,5, como un engrosamiento del epitelio en la zona lingual. En la fase de brote inicial, este engrosamiento protruye hacia el mesénquima subyacente, en el día 12.5, y al invaginarse, el epitelio forma un brote o yema pediculado a la superficie epitelial mediante un tallo, cordón o conducto. Este conducto continúa creciendo para formar el conducto principal de la glándula salival. Posteriormente, el brote progresa y produce ramificaciones y brotes en racimo y se conoce como fase pseudoglandular. En el día 13, el epitelio ya se ha ramificado en 3-5 extremos glandulares rodeados de una cápsula mesenquimal. En el día 14.5, al continuar las ramificaciones, se puede visualizar una glándula multilobulada. Sobre el día 15, la diferenciación funcional secretora comienza. La mayoría de los conductos desarrollan luces en su interior y pasan a la fase canalicular, sobre el día 15.5. Esta formación de luces se justifica por la presencia de fenómenos de apoptosis celular (muerte celular programada) en el centro de la supuesta luz y fenómenos de proliferación celular en la periferia de la futura luz. La fase de brote terminal se alcanza en el día 17.5 donde las ramificaciones y brotes terminales adquieren una morfología similar a los futuros conductos y acinos glandulares. Aún así, no existe una continuidad bien definida entre luces y conductos. La diferenciación de la glándula en la rata continúa en la fase postnatal. (Aure, 2011; Taga, 1998; Ball, 1974; Amano, 2012; Jaskoll, 1999; Melnick, 2000; Lee, 1990; Tucker, 2007). Según Denny y cols, los acontecimientos descritos en la rata acontecen con dos días de diferencia comparado con el ratón; en ratón entre el día 11.5/12-17 y en la rata entre el día 14-18 (Denny, 1997).

Mientras que la glándula submandibular ha sido bien estudiada, la glándula sublingual ha permanecido más olvidada. En los años 60, Leeson y Booth (Leeson, 1961) aportan una buena descripción del desarrollo postnatal pero las únicas descripciones de la glándula antes del nacimiento en rata son escasas: Szymanska en 1963 y Pospisilova-Zuzakova en 1973. La gran similitud en los diferentes estadios del desarrollo entre la glándula sublingual y la glándula submandibular de rata ha permitido utilizar a ésta última como modelo para las investigaciones sobre su desarrollo.

El patrón de desarrollo es similar al visto anteriormente. La glándula sublingual inicia su desarrollo como un crecimiento del epitelio bucal hacia el día 13 post-implantación. Este epitelio forma un fino cordón unido a éste que contiene en su extremo distal un racimo de células. Las células de este extremo proliferan y dan lugar a ramificaciones y nuevos brotes terminales. Entre el día 15 y 20, las células de los brotes terminales experimentan una diferenciación morfológica a células secretoras. En el día 17, en el caso de la glándula sublingual, las luces están presentes en muchos de los conductos adyacentes a los brotes terminales pero no en los brotes mismos. Es a partir del día 18 cuando los brotes terminales exhiben los primeros signos de actividad secretora (Redman, 1978; Materazzi, 1973; Aure, 2011). El periodo entre el día 18 y 20, está caracterizado por el acúmulo de tres clases diferentes de gránulos secretores en las células: gránulos serosos electrodensos, gránulos mucosos y gránulos mixtos, que son distinguibles gracias al microscopio electrónico. Al nacer, todas las células acinares, conductos estriados y conductos intercalados están diferenciados pero son inmaduros.

Durante las tres semanas de desarrollo postnatal, los acinos y conductos adquieren una maduración que se evidencia por el claro aumento del tamaño de las células (Redman, 1978; Wolff concluye que, al contrario de lo que ocurre en la glándula submandibular y parótida, los fenotipos celulares de la glándula sublingual están muy establecidos al final del periodo fetal o postnatal temprano (Wolff, 2002).

Fases	Días de desarrollo ( SMG y SL)
Prebrote/ brote inicial	11,5-12,5 (SMG) y 12,5-13,5 (SL)
Pseudoglandular	13,5 (SMG) y 14,5 (SL)
Canalicular	15,5 (SMG) y 15,5-16,5 (SL)
Brote terminal	17,5 (SMG) y 16,5-18,5 (SL)

Tabla 2: Desarrollo de la glándula submandibular y sublingual en ratón.

Emergen del epitelio aproximadamente con un día de diferencia: la glándula sublingual empieza con el brote inicial cuando la glándula submandibular ya ha comenzado a ramificarse. SMG: Glándula submandibular, SL: Glándula sublingual. (Jaskoll, 1999; Denny, 1997)

**JUSTIFICACIÓN:**

El modelo empleado para el estudio del desarrollo glandular salivar ha sido tradicionalmente la glándula submandibular. Sobre ella, versan múltiples artículos analizando todas sus etapas del desarrollo, las causas y los factores que influyen en su desarrollo, así como estudios con células madre para las futuras terapias regenerativas. La glándula sublingual ha permanecido siempre en un segundo plano y solo algunos artículos se han referido a ella y siempre en relación a la glándula adyacente submandibular.

Este trabajo se justifica para estudiar más a fondo la glándula sublingual en sus primeros estadios y así conocer ampliamente su origen y desarrollo para promover futuros estudios con esta glándula, tal y como se ha hecho con la glándula submandibular estos años atrás.

**HIPÓTESIS:**

- 1.El modelo de rata es un modelo aplicable para estudiar experimentalmente en la glándula sublingual humana los factores que influyen en su desarrollo embriológico, como han sido validados en los estudios de la glándula submandibular de rata desde hace años.
2. La glándula sublingual, de igual manera que la glándula submandibular, sirve para evaluar el desarrollo embriológico de las glándulas salivares mayores.

**OBJETIVO PRINCIPAL:**

Establecer la validez de la glándula sublingual humana y de rata como modelo de estudio para futuros trabajos de investigación en base a la descripción exhaustiva de su origen y desarrollo.

**OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

1. Determinar el horario morfogénico y área de origen de las glándulas sublinguales.
2. Describir la evolución del desarrollo de las glándulas sublinguales en humanos y ratas en los periodos embrionario y fetal temprano.

3. Evaluar la influencia del ectomesénquima en el desarrollo de la glándula sublingual mediante técnicas inmunohistoquímicas en rata, extrapolables en humanos.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

El material utilizado para la realización de la presente Tesis Doctoral pertenece a la Embrioteca del Instituto de Embriología de la Universidad Complutense de Madrid, y más concretamente a dos colecciones: la colección del Prof. Orts Llorca y la colección del Prof. Jimenez Collado.

### **1. Embriones humanos**

Los embriones y fetos humanos tienen una longitud que abarca desde los 15,5 mm hasta los 43 mm, los del periodo embrionario de 15,5 mm a 28 mm (Estadios de Carnegie EC 18 –EC 23) y los del periodo fetal temprano de 32 mm a 43 mm. Empleamos en total 12 especímenes humanos.

En su día, el departamento de Anatomía siguió las técnicas habituales de laboratorio para obtener las muestras. Se fijaron en formol neutro al 10 % durante 24-72 h y posteriormente se deshidrataron con etanol a concentraciones crecientes, aclarando con benzoato de metilo y butanol. Se realizó la inclusión en parafina con un punto de fusión entorno a los 60°. Los cortes seriados se realizaron con la ayuda de un microtomo para cortar los bloques en grosores de 10 a 15 micras. La tinción de los cortes citados se hizo con diferentes técnicas: Hematoxilina-Eosina, Azan y Bielchowsky.

Los cortes obtenidos con tinción nos sirven de material para realizar un estudio morfodescriptivo con un microscopio óptico Nikon Eclipse DXM 1200, acoplado

a una cámara que transmite las imágenes a un ordenador. Se utiliza para la captura de imágenes el programa: ACT-1 diseñado para la captación, almacenaje y modificación de fotografías. Este programa nos ofrece la posibilidad de mejorar la calidad, el contraste, el brillo y añadir una escala a la imagen. Elegimos de la serie completa de cada espécimen, que habitualmente contiene más de 100 portas, aquellos que consideramos de mayor utilidad para estudiar el área sublingual.

Embrión / feto	Longitud (mm)	Estadio de Carnegie (EC)	Cortes	Procedencia
PERIODO EMBRIONARIO				
CU	15,5	18	FRONTAL	ORTS
GV 1	17,5	19	FRONTAL	ORTS
MAR 2	18	19	FRONTAL	ORTS
PR	19	20	SAGITAL	ORTS
CAS	20	20	FRONTAL	ORTS
NO 2	21	20	FRONTAL	ORTS
GV 7	22	21	SAGITAL	ORTS
GI 4	26,5	22	FRONTAL	ORTS
BR4	28	23	FRONTAL	ORTS
PERIODO FETAL TEMPRANO				
MO	32		FRONTAL	JIMENEZ
OY	38		SAGITAL	ORTS
OC	43		FRONTAL	ORTS

Tabla 3: Embriones y fetos humanos: nominación, longitud, EC, Cortes y procedencia.

De un total de 215 muestras de embriones humanos fotografiados, se han seleccionado 94 para el análisis descriptivo de los resultados.

## 2. Embriones de rata

Se han utilizado embriones de rata Wistar de 15 días a 19 días de edad. Se considera el día de fertilización como el día 0.

Los especímenes son fijados en paraformaldehído al 4% en 0,1 M en suero fosfato salino tamponado (PBS) a pH 7,4 a 4<sup>o</sup>. Con el microtomo, se realizan las secciones a 6-8 micras de grosor y se montan los portas impregnados en poly-D-Lisina.

En la siguiente tabla, se presentan los especímenes de rata estudiados.

Embriones	Días	Corte	Tinción
R15B	15	FRONTAL	HE
R16C	16	FRONTAL	HE
R16D	16	FRONTAL	HE
R17D	17	FRONTAL	HE
R17E	17	FRONTAL	HE
R18A	18	FRONTAL	HE
R19B	19	FRONTAL	HE

Tabla 4: Especímenes de rata utilizados: nominación, días, corte y tinción.

Para la descripción de los resultados, se han evaluado todos los embriones pero seleccionado solamente los especímenes de los estadios 16, 17 y 18 para

las descripciones ya que eran los que se ajustaban al periodo de cambios en la glándula sublingual y, por lo tanto, a nuestros objetivos. Se han empleado 7 especímenes de rata. De un total de 85 muestras de rata fotografiadas, se han seleccionado 24 para el análisis descriptivo de los resultados.

Para el estudio Inmunohistoquímico, se han empleado 2 anticuerpos:

- Anticuerpo monoclonal NHK-1, nombre del catálogo: CBL 519 (Chemicon International)
- Anticuerpo SECUNDARIO contra IgM de ratón conjugado con PAP.
- Anticuerpo CBL 202, Anti-humano vimentina, VIM 3B4 (Chemicon International)

El anticuerpo NHK-1 es un marcador de tejido neuroectodérmico (Mérida Velasco, 2012).

El anticuerpo CBL 202 es un marcador positivo para células derivadas del mesénquima.

Para obtener los análisis Inmunohistoquímicos, se sigue la secuencia siguiente en el laboratorio:

- Desparafinado
- Lavado con Suero salino tamponado PBS
- Bloqueo de la peroxidasa
- Lavado con Suero salino Tamponado PBS

- 
- Eliminación de la señal de fondo incubando en suero normal de cabra ( NGS, Sigma; USA) al 1% y 0,2 % de TX-100 ( Merck, Alemania) diluido en PBS a temperatura ambiente durante 24 horas.
  - Incubación en Anticuerpo primario durante un tiempo variable 24-48 h a 4°C. Diluyente del suero PBS con 1% de NGS y 0,2 % de TX-100. Dilución 1/20.
  - Incubación del Anticuerpo secundario durante 12 horas ( Dilución 1/125, 1/2000, 1/4000, 1/3000)
  - Lavado con PBS
  - Revelado con diaminobencidina
  - Nuevo lavado con PBS
  - Deshidratar y montar en Eukitt ( O. Kindler GmbH & Co).

Se realizan controles negativos de las inmunohistoquímicas para verificar que el anticuerpo secundario se une realmente al correspondiente anticuerpo primario. Se descartan los casos en los que los controles negativos son positivos.

Este estudio se ha realizado siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki 1995 (revisadas en Edimburgo, 2000).

## SIGNATURA DE LAS FIGURAS:

A – Área prospectiva salival sublingual

1. Surco paralingual medial

2. Surco Paralingual lateral

G- Ganglión anexo al nervio lingual

P proceso sublingual de la glándula submandibular

SM Glándula submandibular

SL Glándula sublingual

NL Nervio lingual

CM Cartílago de Meckel

W Conducto de Wharton

B Conducto de Bartholin

WT Conducto de Warther

PSL Área Prospectiva sublingual

HGL Músculo Hiogloso

MH Músculo milohioideo

GH Músculo Geniohioideo

GO Músculo Geniogloso

TL Músculo Transverso lingual

LI Músculo Lingual inferior

SLM Glándula sublingual mayor

SLMe Glándula sublingual menor

NHO Nervio Hipogloso

GSL Ganglio sublingual

## **RESULTADOS:**

### **A) EMBRIONES y FETOS HUMANOS**

#### **ESTADIO 18 DE CARNEGIE**

##### CU 15,5

En este embrión, se observa el surco paralingual medial extendido a lo largo del suelo de la boca primitiva, lateral al esbozo lingual. El surco paralingual lateral presenta un desarrollo menos extenso y queda confinado a la porción posterior del suelo de la boca y, por tanto, solo se sitúa en la zona dorsal del esbozo lingual.

En cortes anteriores (Figura 1), se visualiza lateral al relieve del esbozo lingual, el surco paralingual medial ocupando una posición interna y suprayacente al recorrido de las fibras del nervio lingual en el lado izquierdo de la preparación. Su epitelio está condensado e inicia la profundización en el mesénquima subyacente. En el lado derecho, más anterior por la oblicuidad del corte, el surco apenas representa una suave depresión, continuándose su epitelio con el de la lengua y con el suelo de boca.

En el esbozo lingual, comienzan a identificarse las fibras del músculo geniogloso y lateral a ellas, en ambos lados, los ganglios parasimpáticos submandibulares, anexos al nervio lingual.



Figura 1: Embrión humano CU de 15,5 mm.

Tinción con Hematoxilina-eosina. (4x).

En cortes dorsales (Figura 2), se identifican los surcos paralingual medial y lateral. El primero profundiza en el mesénquima mientras que el segundo constituye una depresión suave orientada caudo-lateralmente. En el lado derecho, se observa el nervio lingual y el ganglio anexo rodeando al extremo inferior del esbozo de la glándula submandibular. Subyacente a estas estructuras, se sitúa el cartílago de Meckel.



Figura 2: Embrión humano de 15,5mm.

Tinción con Hematoxilina-eosina

Corte frontal (4x).

En cortes aún más dorsales (Figura 3), en el lado derecho, se visualizan el surco paralingual medial y lateral muy próximos entre sí. El paralingual medial, tal y como sucede en el lado izquierdo, profundiza constituyendo un cordón macizo, medial al esbozo del cartílago de Meckel.



Figura 3: Embrión humano de 15,5mm.

Tinción con Hematoxilina-eosina

Corte frontal (4x).

## **ESTADIO 19 DE CARNEGIE**

### **GV1 17.5**

En embriones de este estadio, comienza a vislumbrarse (Figura 4) en la zona más anterior del suelo de la boca, la primera insinuación del área prospectiva sublingual. El epitelio del suelo, suprayacente al extremo anterior de los cartílagos de Meckel, presenta una condensación que sugiere la presencia del área prospectiva sublingual. A este nivel, puede apreciarse el surco de la osificación en el extremo anterior de la mandíbula y las ramificaciones de los nervios incisivos.

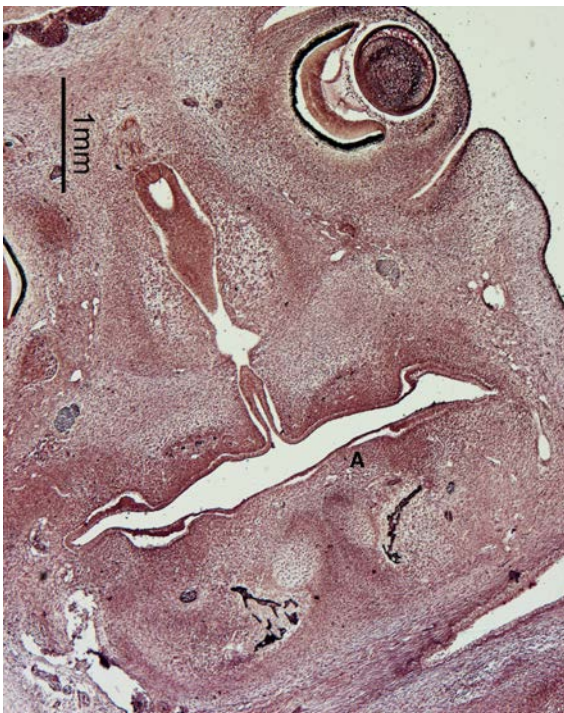


Figura 4: Embrión humano de 17,5 mm, GV1.

Tinción con hematoxilina-eosina

Corte Frontal

4x

### **MAR2 18**

En el embrión MAR2 de 18 mm (Figura 5), a nivel de la región anterior del suelo de la boca, se observa el extremo ventral del surco paralingual medial y, lateral a él, el área prospectiva sublingual. Ésta tiene un epitelio engrosado y

subyacente a él, un ectomesénquima condensado situado craneal y medial al esbozo del cartílago de Meckel. El área prospectiva se sitúa por delante del surco paralingual lateral. La asimetría en la sección justifica el distinto aspecto que ofrece el lado derecho, ya que este ocupa un nivel anterior, ventral al área prospectiva sublingual.

A este nivel, se contempla el profundo surco transversal de la boca del que emerge el esbozo de la glándula parótida, profundo al esbozo del músculo buccinador.

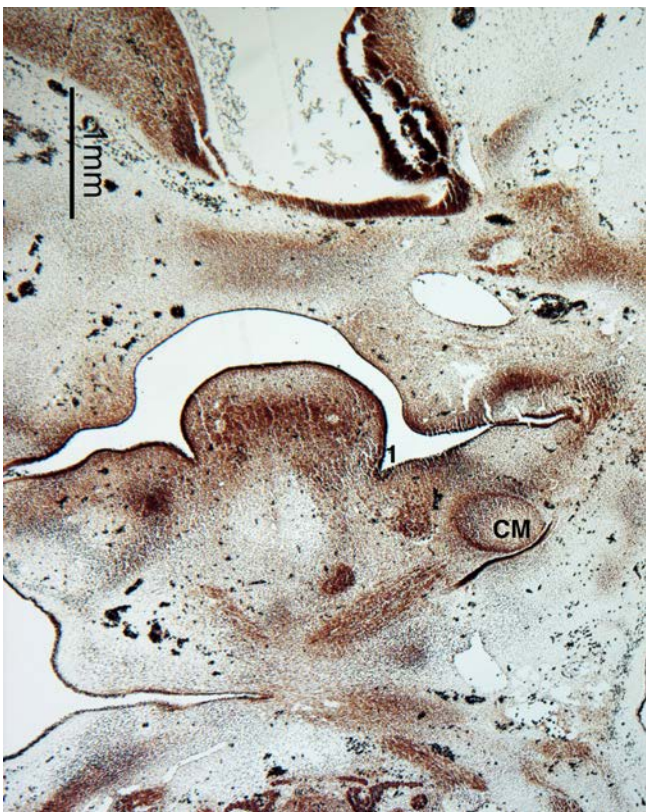


Figura 5: Embrión de 18 mm,  
MAR2.

Tinción: Bielchowsky

Corte: Frontal

4x

En cortes dorsales (Figura 6), se aprecia en el lado derecho, el nervio lingual y el ganglio anexo y suprayacente a él, la invaginación del surco paralingual medial. En el lado izquierdo, se observan los dos surcos paralinguales. Este corte es posterior al derecho ya que hay oblicuidad en las secciones. Se puede contemplar la condensación blastemática, esbozo del hueso hioides y el nervio hipogloso derecho introduciéndose en el ectomesénquima del esbozo lingual.



Figura 6: Embrión de 18 mm, MAR2.

Tinción: Bielchowsky

Corte: Frontal.4x

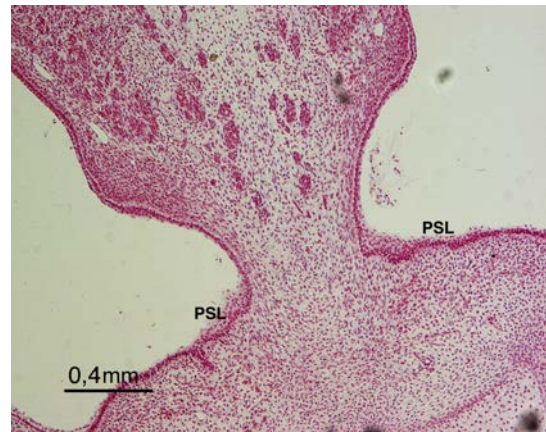
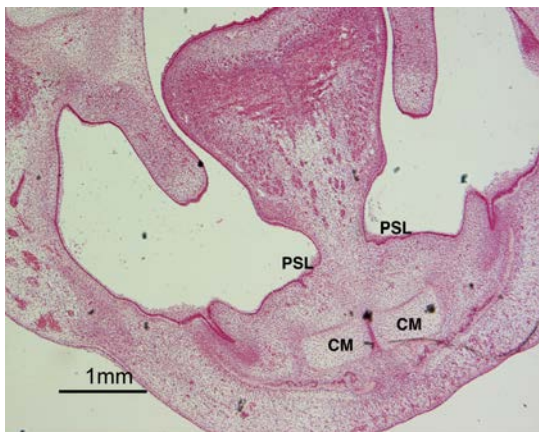
Hacia atrás (Figura 7), del surco paralingual medial se desprende el esbozo de la glándula submandibular; adopta una forma piriforme con un cordón macizo que la conecta al surco y un extremo inferior ensanchado y rodeado por ectomesénquima. Lateralmente, se sitúa el surco paralingual lateral que no sobrepasa hacia delante la posición ocupada por la hamaca formada por el nervio lingual y su ganglio anexo.



Figura 7: Embrión  
de 18 mm, MAR2.  
Tinción: Bielchowsky  
Corte: Frontal  
4x

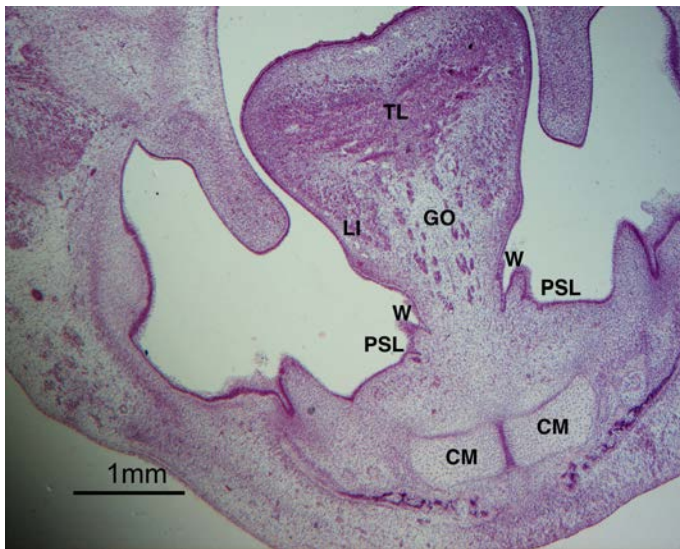
**ESTADIO 20 DE CARNEGIE****CAS 20**

En el embrión CAS 20 (Figura 8 y 9), a nivel del futuro frenillo lingual, y por delante del surco paralingual medial, se observa el área prospectiva sublingual. En esta zona, se producen invaginaciones en el ectomesénquima subyacente, repartidas en un área reducida que de medial a lateral constituyen los primordios de las glándulas sublinguales mayor y menor respectivamente. En el esbozo lingual, se identifican el músculo transverso lingual y el lingual inferior y , en porción lateral, las valvas palatinas que ocupan una posición vertical, relacionada con las caras laterales del esbozo lingual. Subyacente a los esbozos de las glándulas sublinguales, se identifican los extremos anteriores de los cartílagos de Meckel cuyos pericondrios contactan en la línea media. Subyacente a ellos, puede apreciarse la osificación directa del esbozo mandibular.



Figuras 8 y 9: Embrión de 20 mm, CAS. Tinción: H-E. Corte frontal. 4x y 10x.

Por detrás del área prospectiva sublingual (Figuras 10 y 11), el futuro conducto de Wharton desemboca en el suelo de la boca y lateral a él, se distinguen las invaginaciones que constituyen los esbozos de las glándulas sublinguales mayor y menor.



Figuras 10: Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 4x

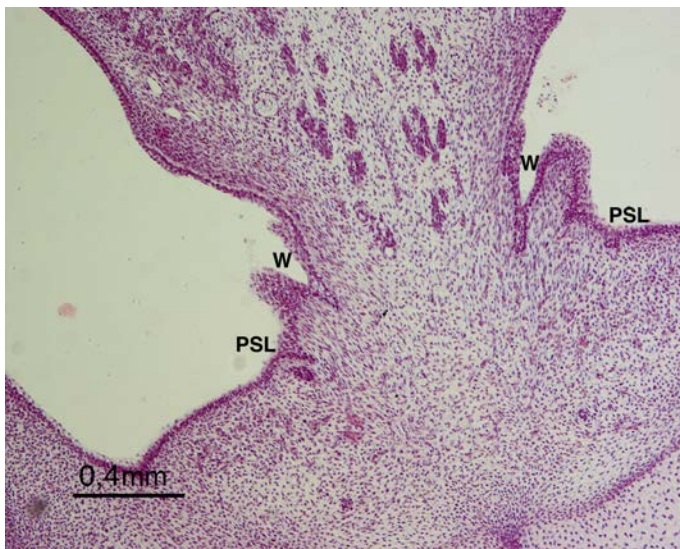
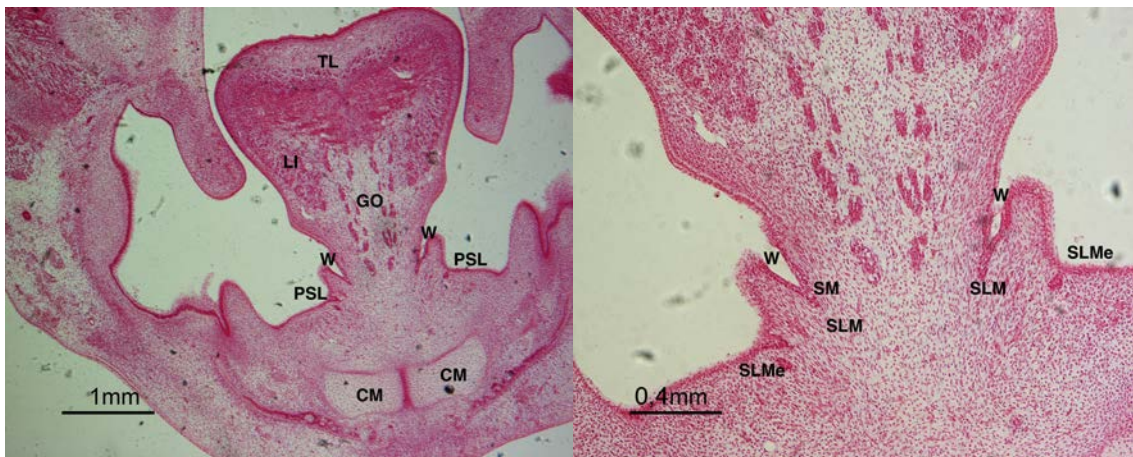


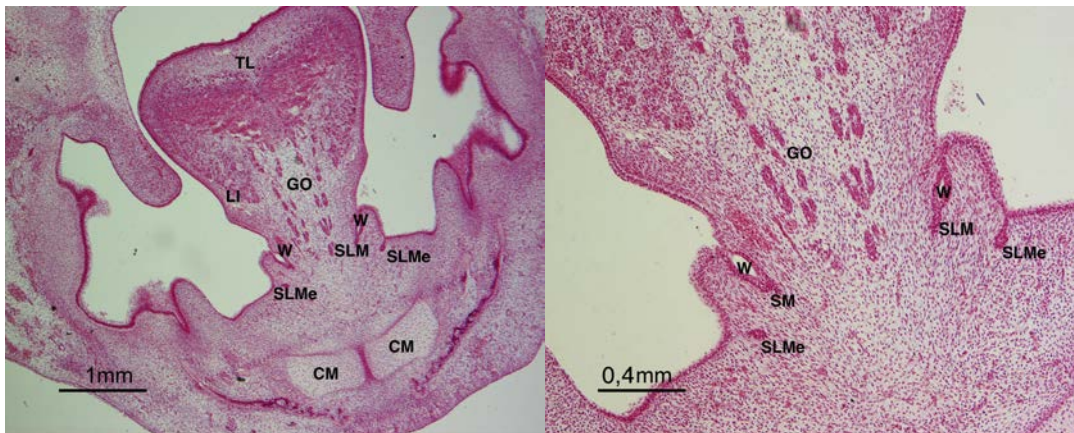
Figura 11: Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-Eosina. Corte frontal. 10x.

Del propio orificio de desembocadura del conducto de Wharton se desprende un cordón epitelial sólido, dirigido caudo medialmente y que interpretamos como el esbozo de la glándula salival sublingual mayor, circunstancia que se reproduce también en el lado derecho (Figuras 12 y 13).



Figuras 12 y 13: Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. Figura 12: 4x; Figura 13: 10 x.

Dorsal a la desembocadura, se aprecia el conducto de Wharton (Figura 14 y 15), de morfología ovalada y rodeada por epitelio pluriestratificado. De igual forma, se observan los esbozos de las glándulas sublinguales que profundizan en el ectomesénquima por la proliferación de su epitelio. Del conducto de Wharton, se desprenden unos cordones epiteliales que, dirigidos hacia medial y caudal, forman el esbozo de la glándula sublingual mayor. Se hacen patentes a este nivel y dentro del extremo anterior del esbozo lingual, las fibras de los músculos genioglosos cuya diferenciación es apreciable ya.



Figuras 14 y 15: Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. Figura 14: 4x; Figura 15: 10 x

En las figuras 16 a 20, correspondientes a una secuencia de cortes ordenada ventro dorsalmente, se aprecia como de la región anterior del suelo de la boca se desprenden, a distintos niveles, unas invaginaciones epiteliales que formarán el conglomerado glandular sublingual. Estas estructuras están en íntima relación con el extremo anterior del conducto de Wharton. Ocupan una posición claramente ventral a la hamaca neuroganglionar que realiza el nervio lingual y su ganglio anexo al citado conducto.

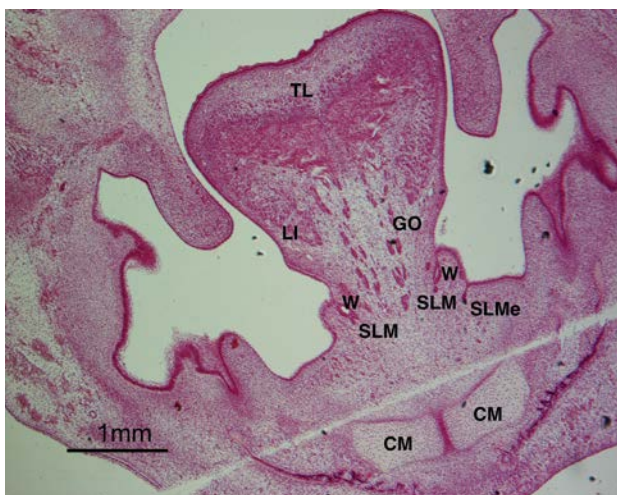


Figura 16

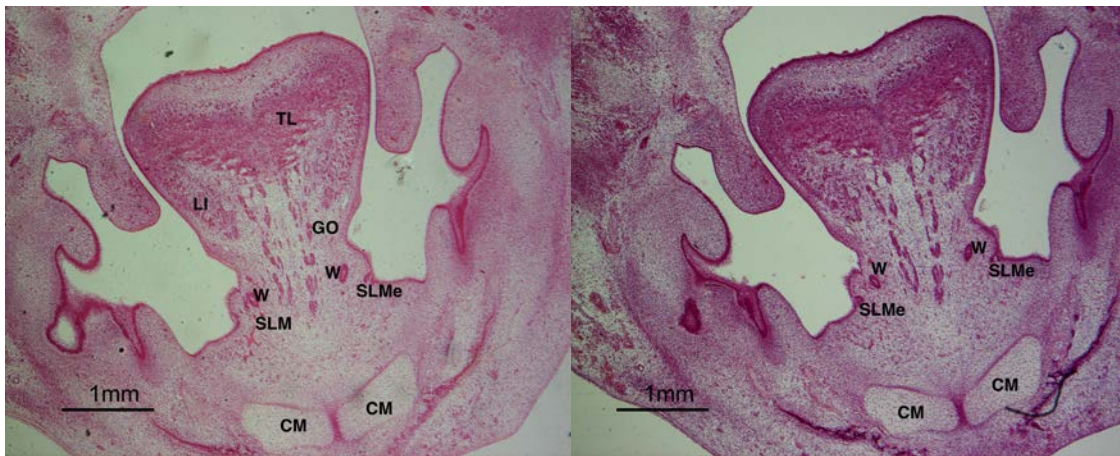


Figura 17 y 18

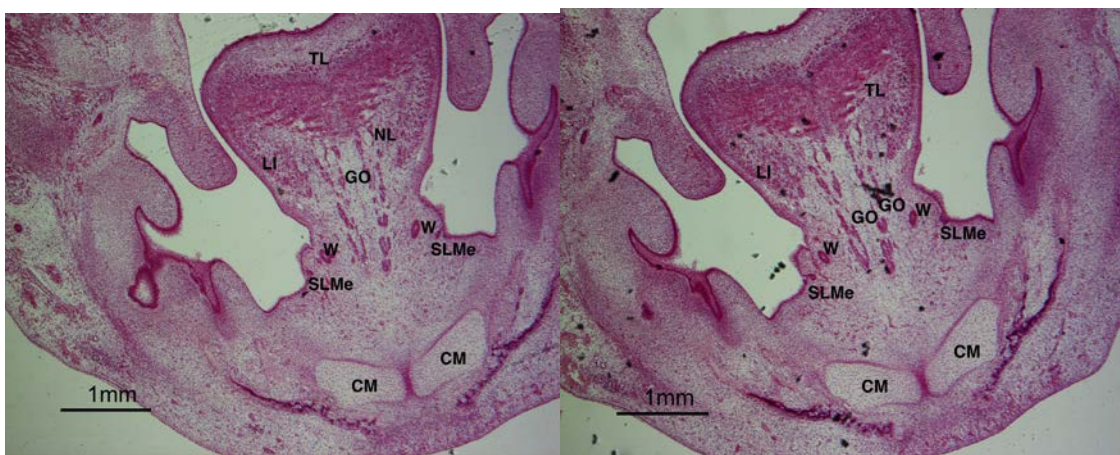
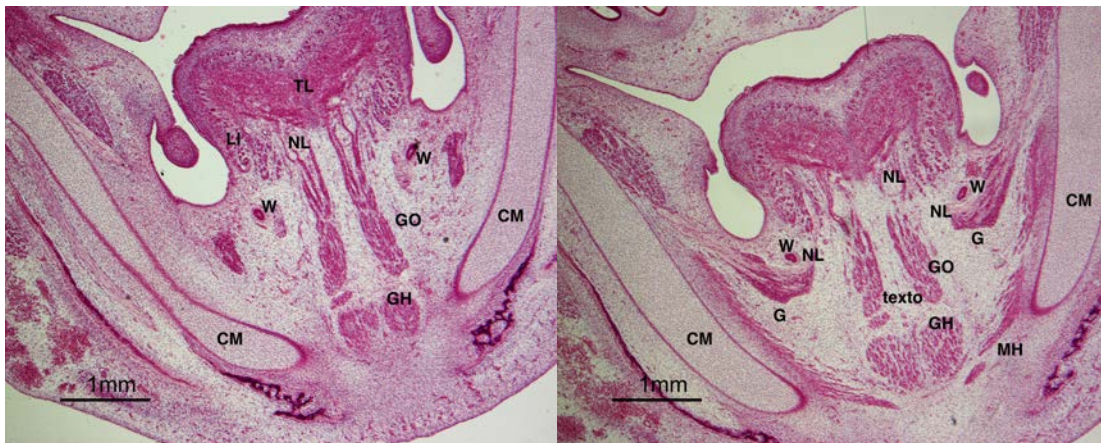


Figura 19 y 20

Figuras 16,17,18,19,20: secuencia de cortes ordenada ventro dorsalmente.  
Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal.  
Figura 16: 4x; Figura 17: 4 x; Figura 18: 4 x; Figura 19: 4 x; Figura 20: 4 x.

A nivel del nervio lingual y del ganglio submandibular (Figuras 21 y 22), dejan de observarse los esbozos de las glándulas sublinguales. El conducto de Wharton situado subyacente al epitelio del suelo de la boca es cruzado por el nervio lingual que lo rodea por su cara inferior. En estas secciones, se aprecia el avanzado estado de diferenciación de la musculatura lingual, tanto intrínseca como extrínseca. Se identifican a los músculos geniogloso, lingual inferior, lingual superior, transverso lingual. También destacan los músculos masticadores como el pterigoideo interno situado medial al cartílago de Meckel y el músculo milohioideo extendido entre ambos cartílagos. Suprayacente al milohioideo y subyacente al geniogloso, se ubica el músculo genihoideo.



Figs 21 y 22: Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 4 x.

En dirección dorsal (Figuras 23,24,25), la glándula submandibular muestra un grado mayor de evolución, con fragmentación y división de su esbozo, rodeado por ectomesénquima condensado que formará el estroma glandular.

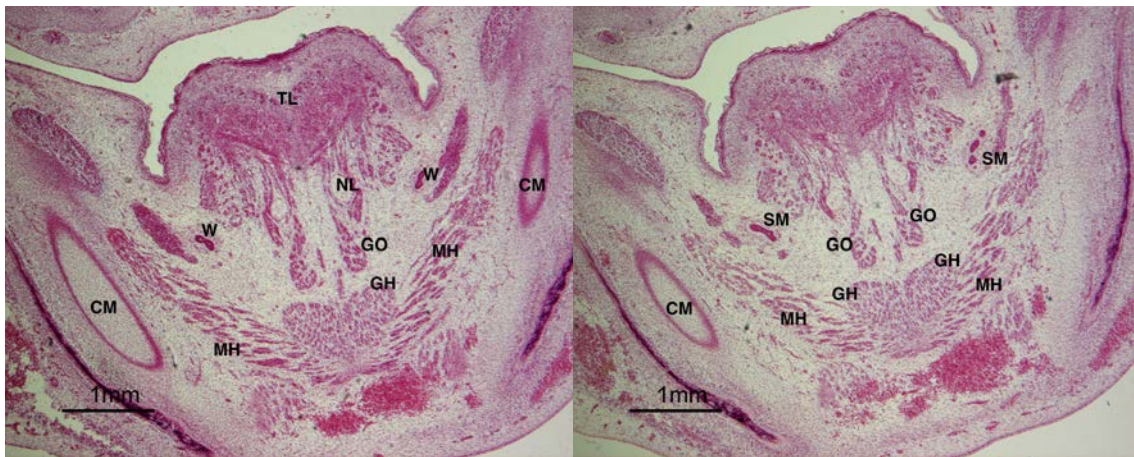


Figura 23

Figura 24

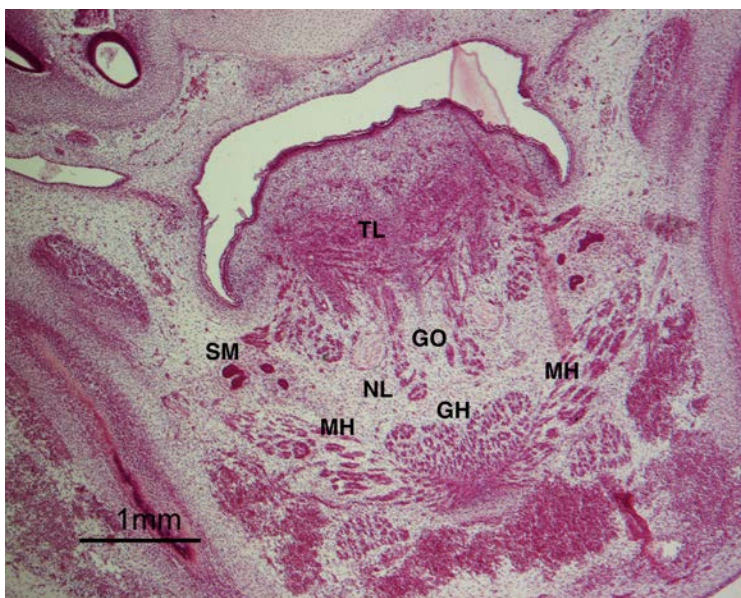


Figura 25

Figs 23,24,25: Embrión humano de 20 mm, CAS. Tinción: Hematoxilina-eosina. Corte frontal. 4 x.

NO2 21

En los embriones NO2 de 21 mm y GV 7 de 22 mm queda patente que el área prospectiva de las glándulas sublinguales se sitúa alrededor y ventral a la desembocadura del conducto de Wharton en el suelo de la boca. Está formada por un epitelio engrosado y poliestratificado que, a distintos niveles, se invagina en el ectomesénquima para formar unos conglomerados epiteliales inmersos en el mesénquima.

En la figura 26, correspondiente a un corte muy anterior del suelo de la boca, se observa el área prospectiva sublingual formada por un epitelio engrosado y poliestratificado, de grosor no uniforme y del que se desprenden hacia abajo, unas proliferaciones epiteliales que constituyen el esbozo de las glándulas salivares sublinguales, mayores las mediales y menores las laterales. El área está localizada a ambos lados del frenillo lingual y por delante de la desembocadura del conducto de Wharton.

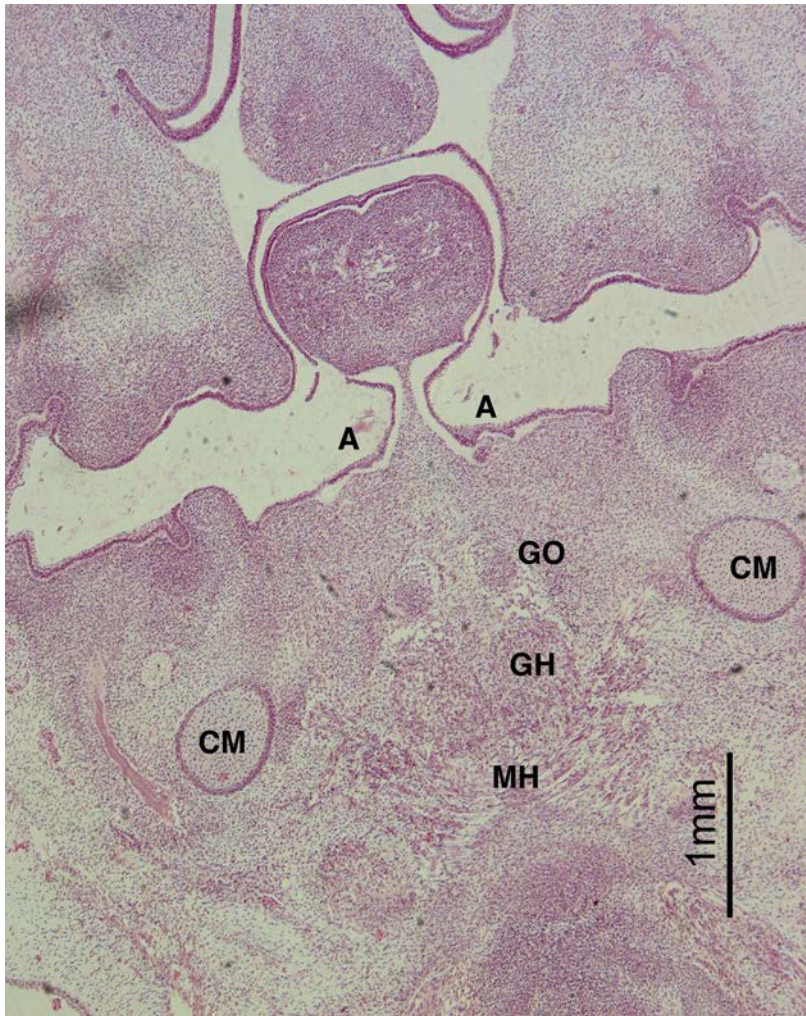
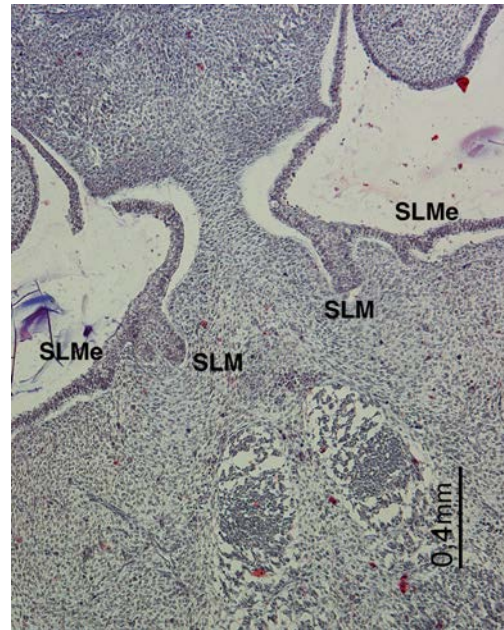
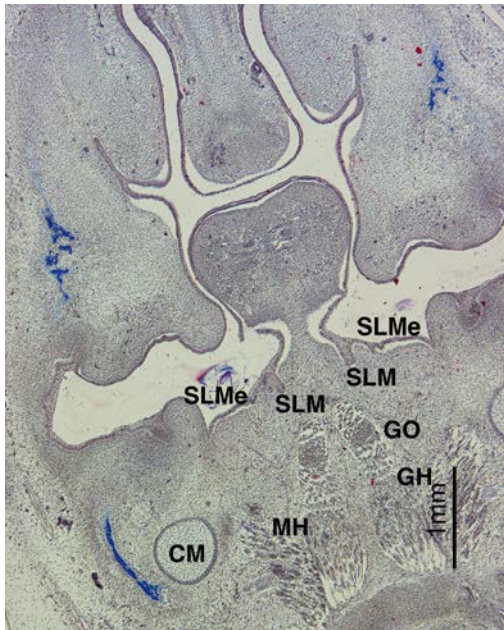


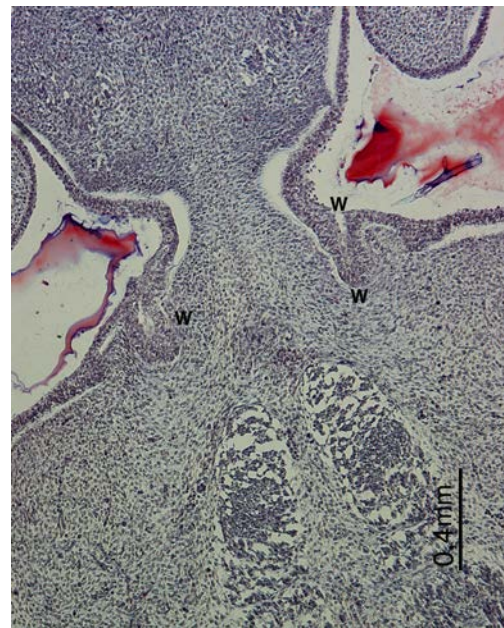
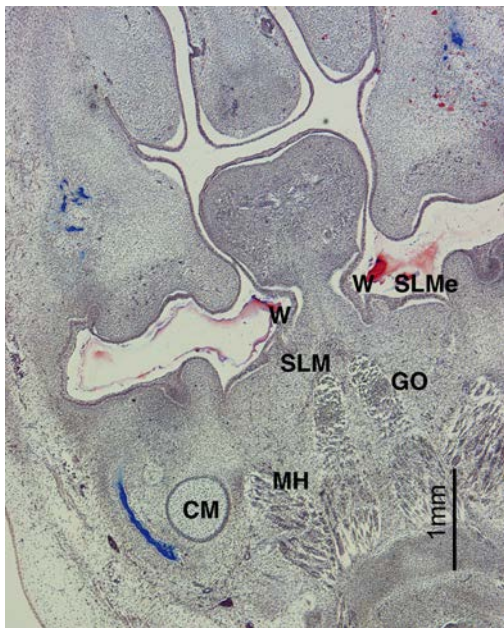
Figura 26: Embrión humano NO2 de 21 mm. 4x. Tinción: Hematoxilina-eosina.

Hacia atrás, en las figuras 27, 28, 29, 30, comienza a observarse el conducto de Wharton.



Figs 27 y 28: Embrión humano NO2 de 21 mm. Tinción: Hematoxilina-eosina.

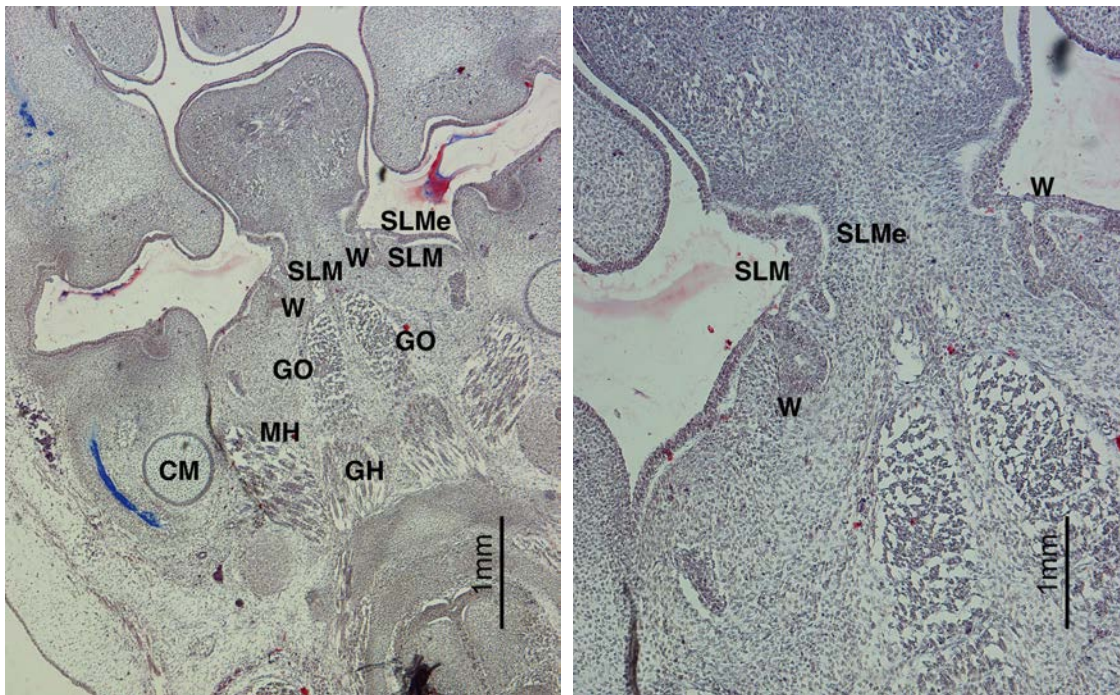
Figura 27: 4x. Figura 28: 10 x.



Figs 29 y 30: Embrión humano NO2 de 21 mm. Figura 29: 4x. Figura 30: 10 x

Tinción Hematoxilina-eosina. Corte frontal.

De su extremo anterior y dirigido hacia caudal y lateral (Figura 31 y 32), emerge una proliferación epitelial que representa el esbozo de una glándula sublingual mayor. Siguen observándose en situación lateral esbozos de glándulas salivares sublinguales mayores y menores. Es llamativo en el lado derecho que, por dentro del conducto de Wharton, se aprecia un cordón epitelial que interpretamos como esbozo de la glándula sublingual mayor.



Figs 31 y 32: Embrión humano NO2 de 21 mm. Figura 31: 4x. Figura 32: 10 x  
Tinción Hematoxilina-eosina. Corte Frontal.

El estado evolutivo de las glándulas sublinguales contrasta con el de la submandibular. Como se aprecia en este mismo embrión en cortes posteriores ( Figura 33), la glándula submandibular adquiere un tamaño y un grado evolutivo muy marcado, con múltiples brotes epiteliales rodeados por un ectomesénquima condensado que perfila su estroma y cápsula. Se pueden observar las relaciones anatómicas que mantiene la glándula con los nervios lingual e hipogloso, con los músculos geniogloso e hiogloso, con el esbozo del hioides y laringe, y con el esbozo mandibular y el cartílago de Meckel. Estas relaciones remedan la situación de la glándula en su ubicación anatómica definitiva.

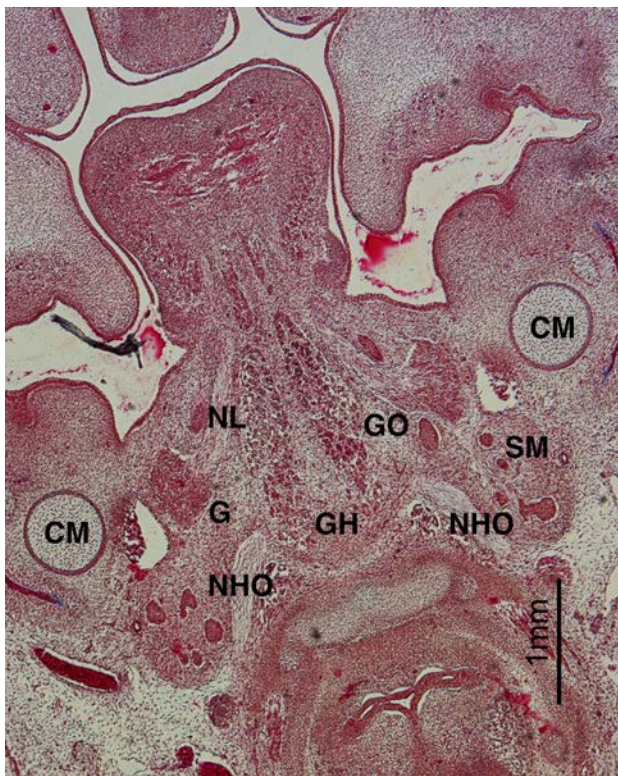


Figura 33: Embrión humano NO2 de 21 mm. 4x. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte Frontal.

**ESTADIO 21 DE CARNEGIE****GV7 22**

El embrión Gv7 de 22 mm está seccionado sagitalmente (Figuras 34,35,36,37), y muestra la extensión y el desarrollo de la glándula submandibular.

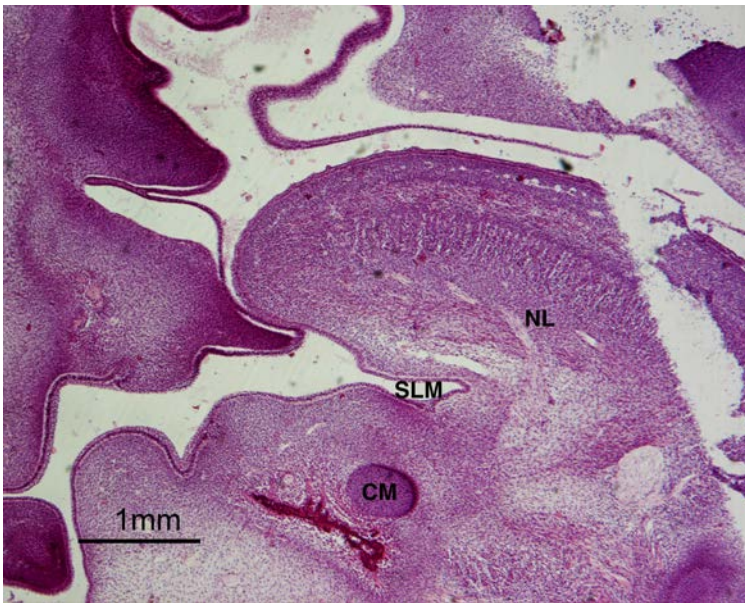


Figura 34: Embrión  
GV7 de 22 mm.  
Tinción con  
Hematoxilina-eosina.  
Corte sagital. 4 x



Figura 35: Embrión  
GV7 de 22 mm. Tinción  
con Hematoxilina-  
eosina.  
Corte sagital. 4 x

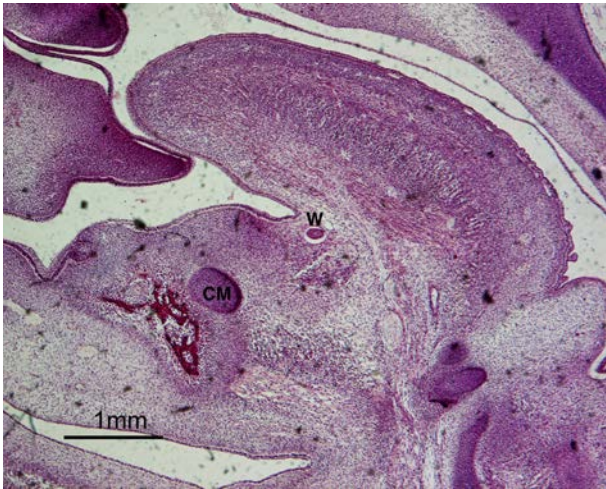


Figura 36: Embrión  
GV7 de 22 mm.  
Tinción con  
Hematoxilina-eosina.  
Corte sagital. 4 x



Figura 37: Embrión  
GV7 de 22 mm.  
Tinción con  
Hematoxilina-eosina.  
Corte sagital. 4 x

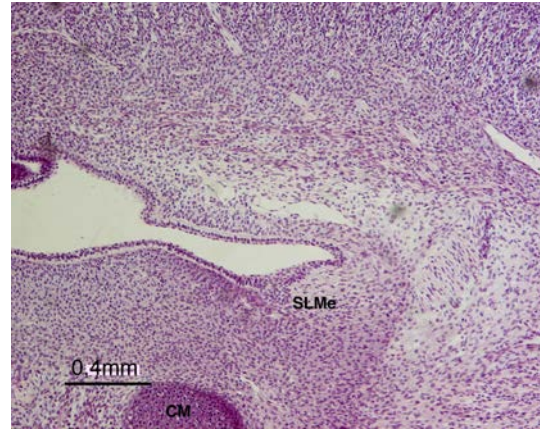
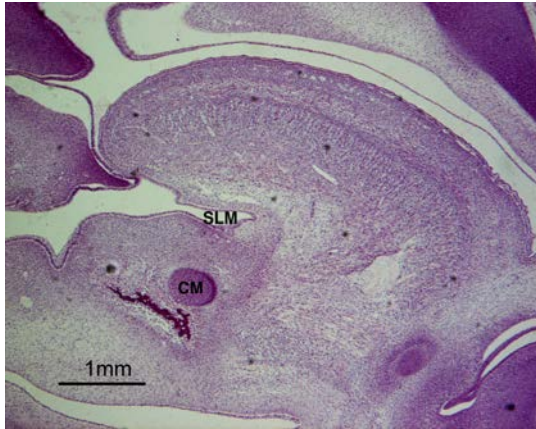


Figura 38: Embrión  
GV7 de 22 mm.  
Tinción con  
Hematoxilina-  
eosina.  
Corte sagital. 4 x

---

En secciones laterales (Figura 34), se aprecia la división en cordones sólidos del cuerpo glandular, rodeado de un halo blanquecino y por un mesénquima condensado. Más adelante (Figura 35), se observa el conducto de Wharton que contiene una luz. Se dirige ventro medialmente (Figura 36) para aproximarse al epitelio del suelo de la boca donde vemos su desembocadura (Figura 37). Ventral a ésta, el epitelio se engrosa y emite yemas que profundizan en el ectomesénquima (Figura 38). En esta sección, se aprecia una condensación del ectomesénquima por debajo y ventral al epitelio engrosado y pluriestratificado del que surge la glándula sublingual mayor. Caudal al área sublingual se sitúa el cartílago de Meckel y bajo él las trabéculas de osificación de la mandíbula. En el esbozo lingual, penetran las fibras del nervio lingual cuyas ramificaciones se distribuyen en su mesénquima.

En las figuras 39,40,41 y 42 se observan invaginaciones del área prospectiva sublingual que esbozan a la glándula sublingual mayor. Es llamativa la condensación del mesénquima situado subyacente al epitelio del suelo de la boca y ventral a la zona de invaginación.



Figuras 39 y 40: Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina.  
Corte sagital. Figura 39: 4x. Figura 40: 10x.

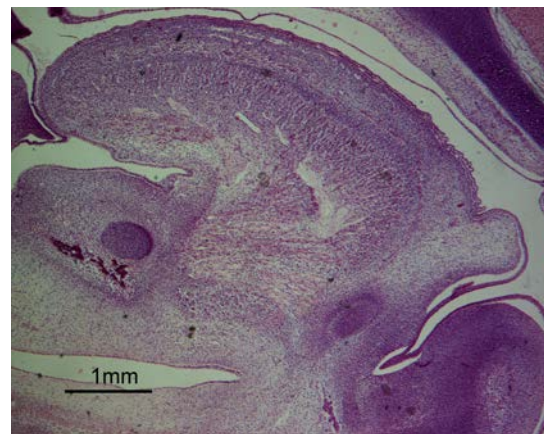


Figura 41 y 42: Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina.  
Corte sagital. 4x.

Lateral a este área (Figura 43), se sitúa la desembocadura del conducto de Wharton izquierdo en el suelo de la boca y lateral a ésta, nuevamente el

epitelio se engrosa, poliestratifica y se invagina para formar el esbozo de la glándula sublingual menor.

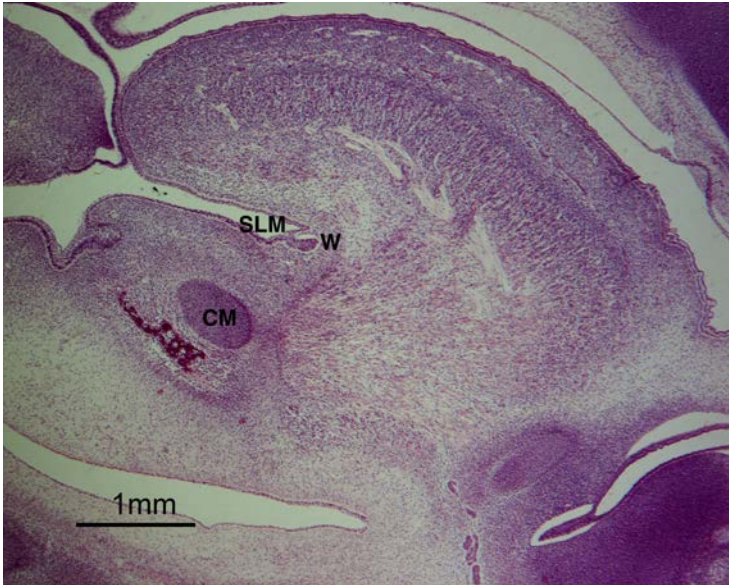


Figura 43: Embrión  
GV7 de 22 mm.  
Tinción con  
Hematoxilina-eosina.  
Corte sagital. 4x.

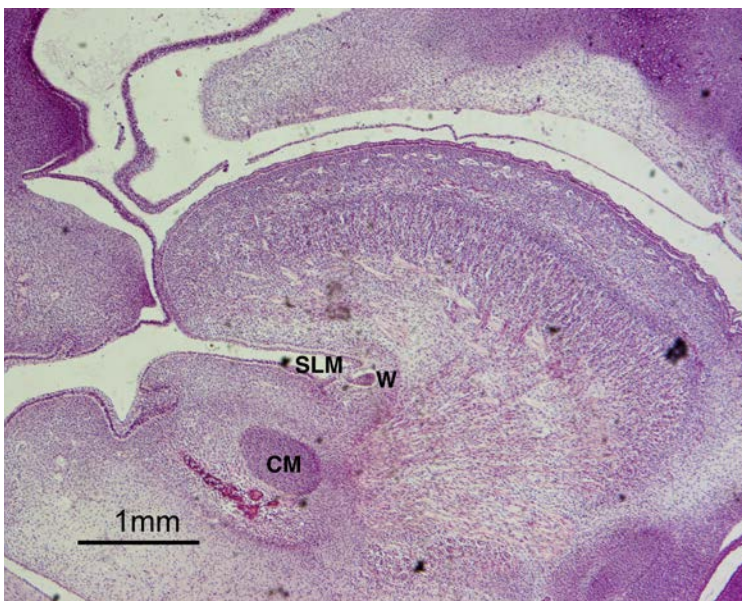


Figura 44: Embrión  
GV7 de 22 mm. Tinción  
con Hematoxilina-  
eosina.  
Corte sagital. 4x.

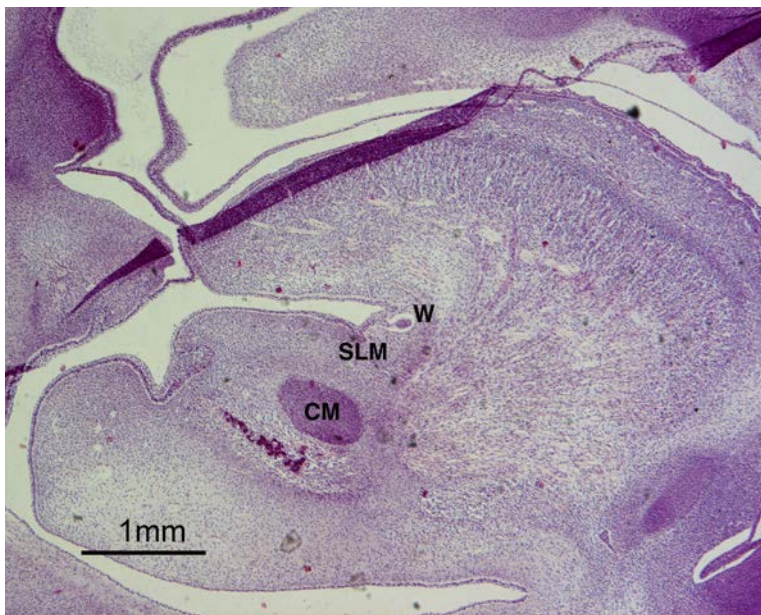


Figura 45: Embrión  
GV7 de 22  
mm. Tinción con  
Hematoxilina-  
eosina.  
Corte sagital. 4x.

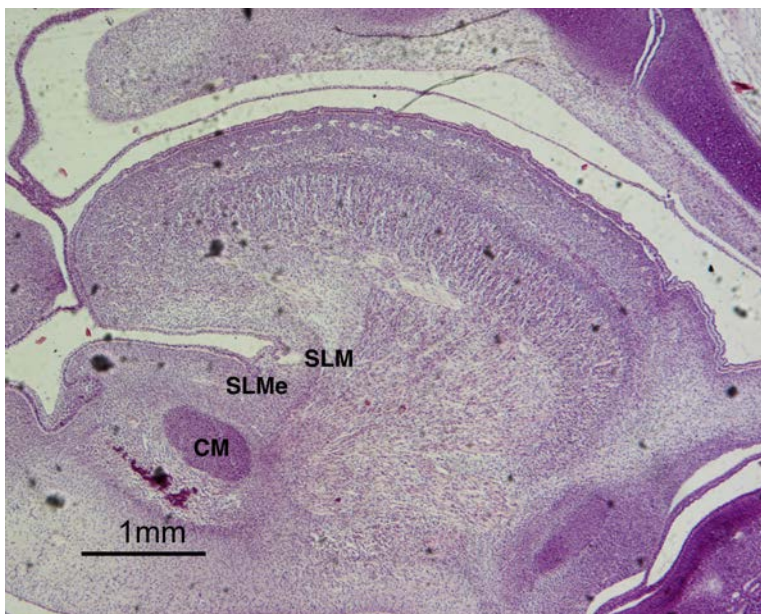


Figura 46: Embrión GV7  
de 22 mm. Tinción con  
Hematoxilina-eosina.  
Corte sagital. 4x

En la Figura 47, los brotes de la glándula sublingual menor quedan próximos a las ramificaciones del nervio lingual en el esbozo de la lengua.

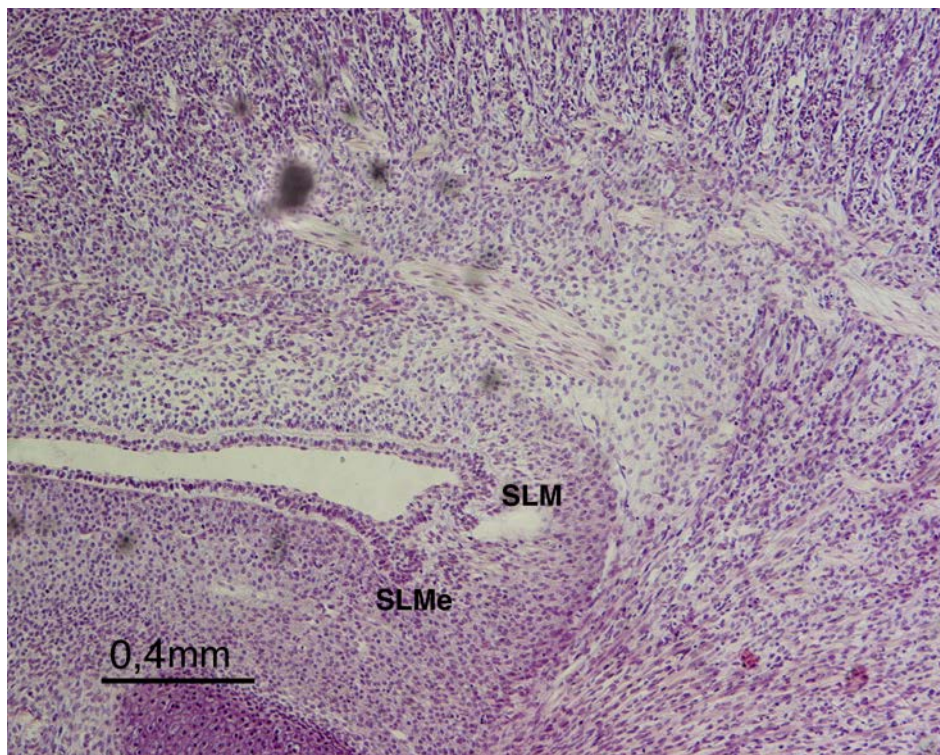
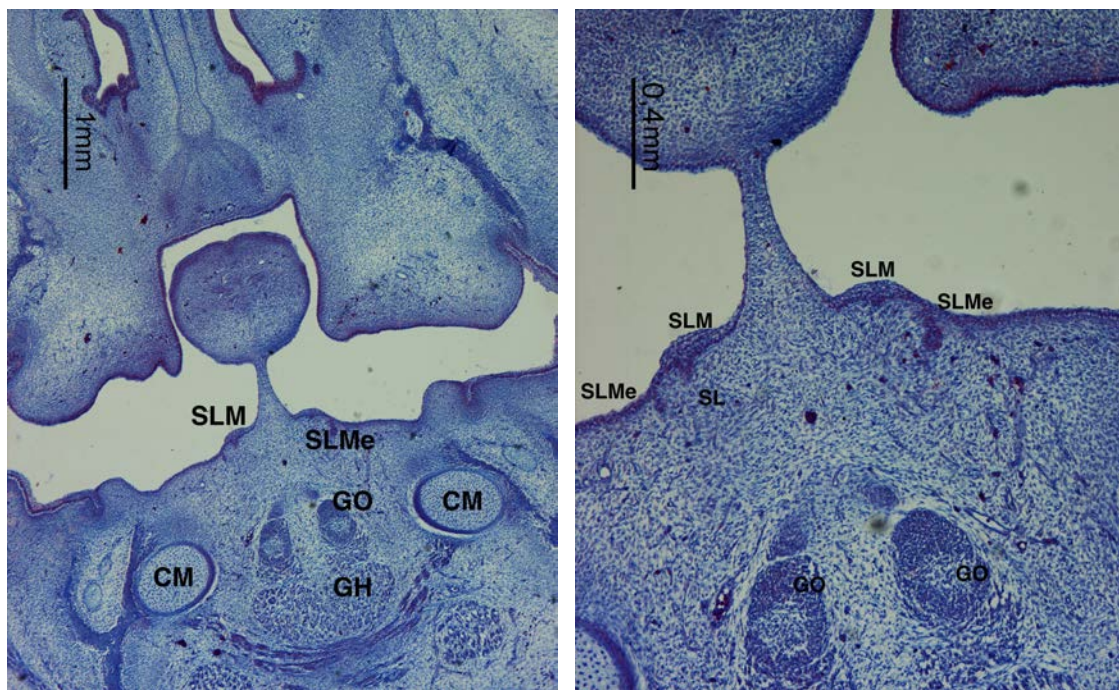


Figura 47: Aumento Figura 46 (10x). Embrión GV7 de 22 mm. Tinción con Hematoxilina-eosina. Corte sagital.

**ESTADIO 22 DE CARNEGIE****Gi4 26,5**

Este embrión de 26,5 mm muestra en los cortes más anteriores, tal y como se recoge en una secuencia de cortes correspondiente a las figuras 48,49,50 y 51, a nivel del frenillo lingual, el área prospectiva sublingual.



Figuras 48 y 49: Embrión GI4 de 26,5 mm. Corte Frontal , Tinción Azán. Figura 48: 4x ; Figura 49: 10x

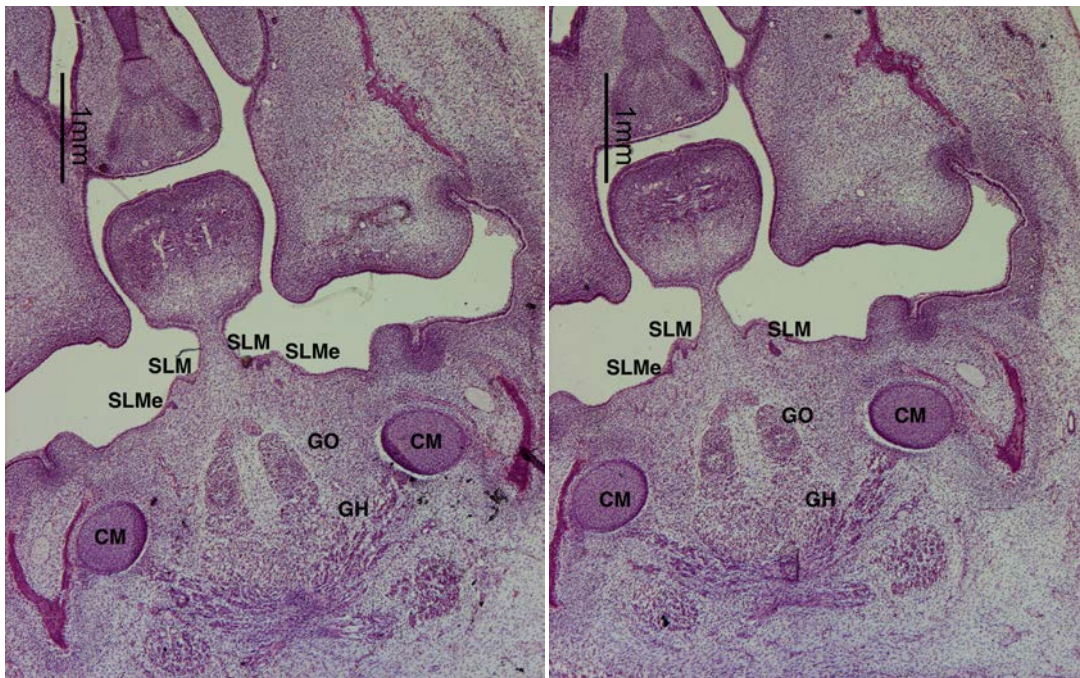


Figura 50 y 51: Embrión GI4 de 26,5 mm. 4x. Corte Frontal, Tinción Hematoxilina-Eosina

En ella, se evidencia de manera clara la poliestratificación de su epitelio y la invaginación de los brotes que constituyen los esbozos de las glándulas sublinguales. El área queda suprayacente a las fibras de los músculos geniogloso y geniioideo. Se observan los cartílagos de Meckel unidos por fibras transversales del músculo miolohioideo y caudal a él se localizan los vientres anteriores de los músculos digástricos.

Más dorsal, se observa la desembocadura del conducto de Wharton (Figura 52 y 53). Lateral al conducto, en el lado izquierdo, se identifican brotes que profundizan en el mesénquima subyacente y que identificamos como glándulas salivares menores.

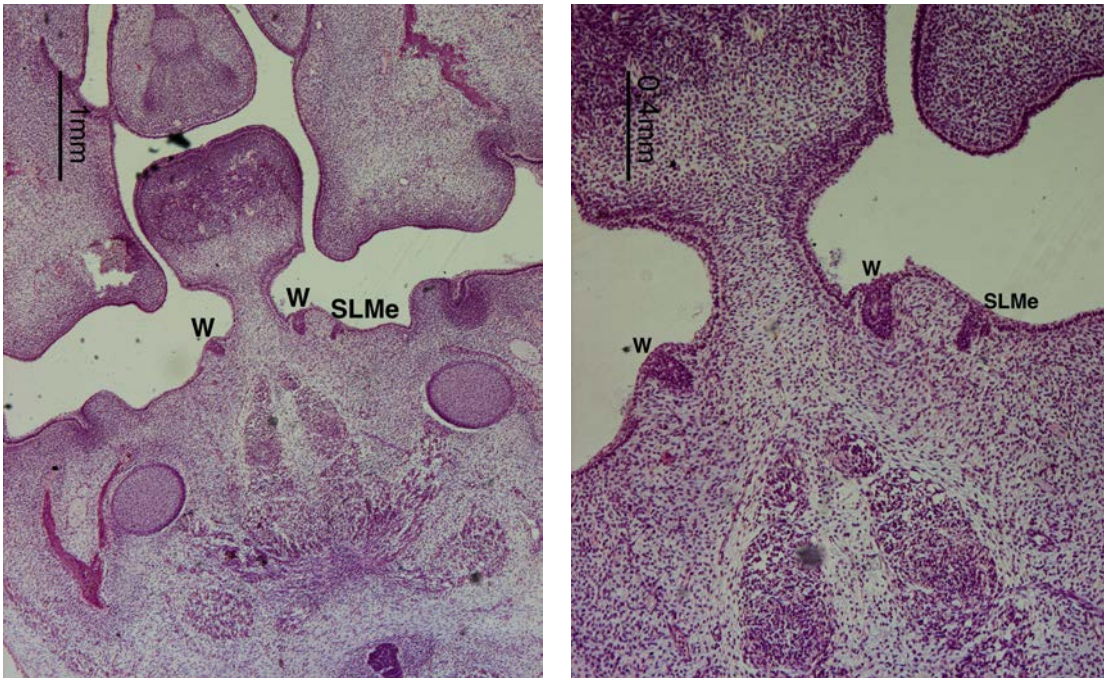


Figura 52 y 53: Embrión GI4 de 26,5 mm. 4x y 10x. Corte Frontal, Tinción Hematoxilina-eosina.

En el lado derecho, medial al conducto de Wharton (Figura 54), se distingue un brote conectado al epitelio muy próximo al conducto, dirigido hacia abajo y adentro que interpretamos como esbozo de la glándula sublingual mayor.

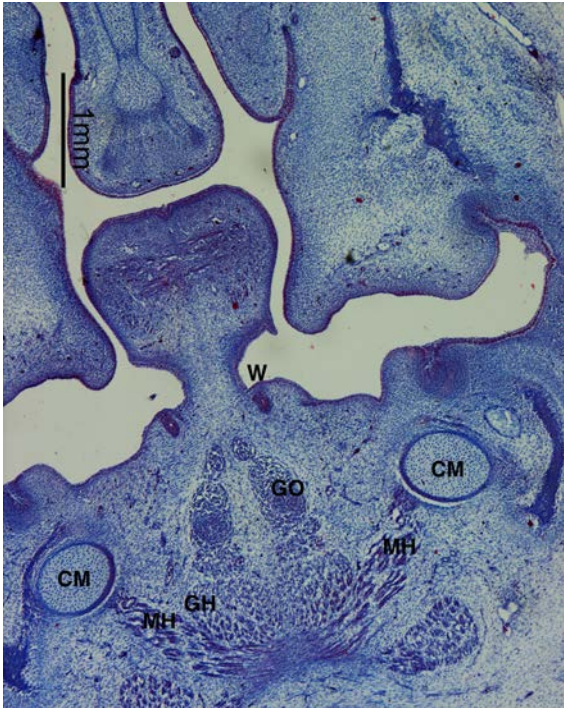


Figura 54: Embrión GI4 de 26,5 mm. 4x. Corte frontal, Tinción Azán.

En el trayecto dorsal del conducto de Wharton siguen observándose brotes de las glándulas salivares sublinguales menores como en la Figura 55 y 56.

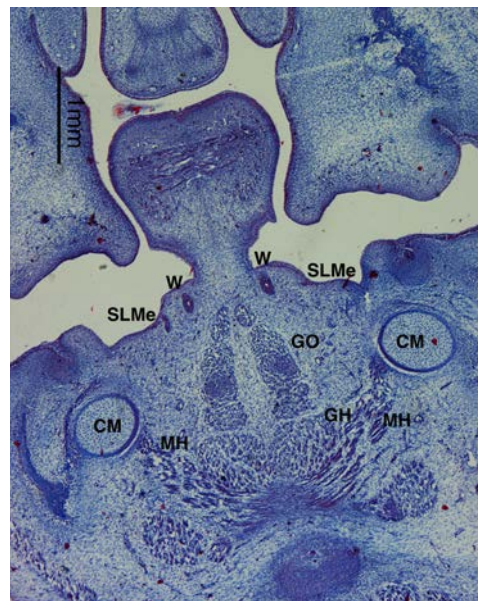
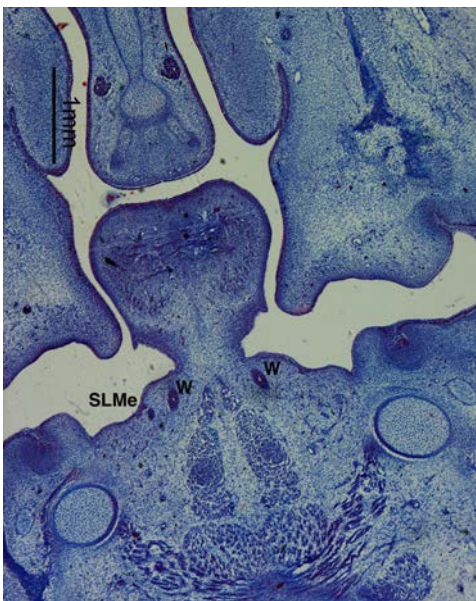


Figura 55 y 56: Embrión GI4 de 26,5 mm. 4x. Cortes frontales, Tinción Azán.

En cortes dorsales (Figura 57), se observa el avanzado desarrollo que presenta la glándula submandibular, contrastando de forma muy evidente con la fase evolutiva de las glándulas sublinguales. La glándula submandibular muestra un avanzado desarrollo del parénquima, estroma y cápsula. En esta sección, se sitúa subyacente al cartílago de Meckel y esbozo mandibular, caudal a las fibras del músculo milohioideo. Se relaciona lateralmente con la vena facial y medialmente con el nervio hipogloso que descansa entre ella y el músculo hiogloso. El conducto de Wharton se puede observar en situación craneal relacionado con el nervio lingual y su ganglio anexo. El conjunto se sitúa lateral al músculo geniogloso y subyacente al epitelio del suelo de la boca.

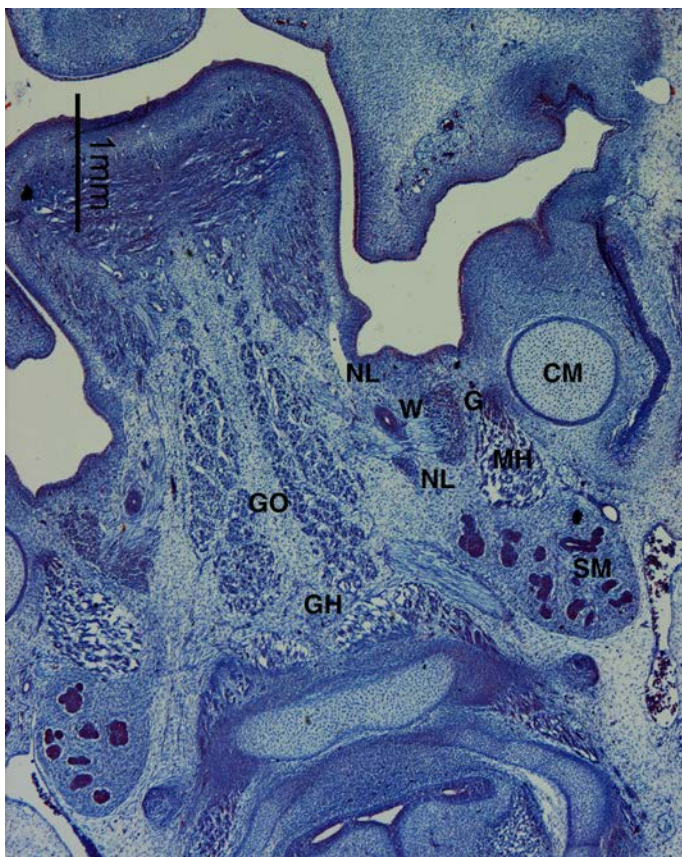


Figura 57: Embrión G14 de 26,5 mm. 4x. Corte frontal, Tinción Azán.

**ESTADIO 23 DE CARNEGIE****BR4 28**

En el embrión BR4 de 28 mm (Figura 58 y 59), se aprecia en la desembocadura del conducto de Wharton la organización de los esbozos de las glándulas salivares sublinguales. Medial al conducto de Wharton, se observa el esbozo de un glándula sublingual mayor, con luz y rodeada de epitelio, desembocando lateral al frenillo lingual en el suelo de la boca. Lateral y más alejada del conducto de Wharton se sitúa el esbozo de una de las glándulas salivares menores aún conectadas al epitelio bucal y carente de luz.

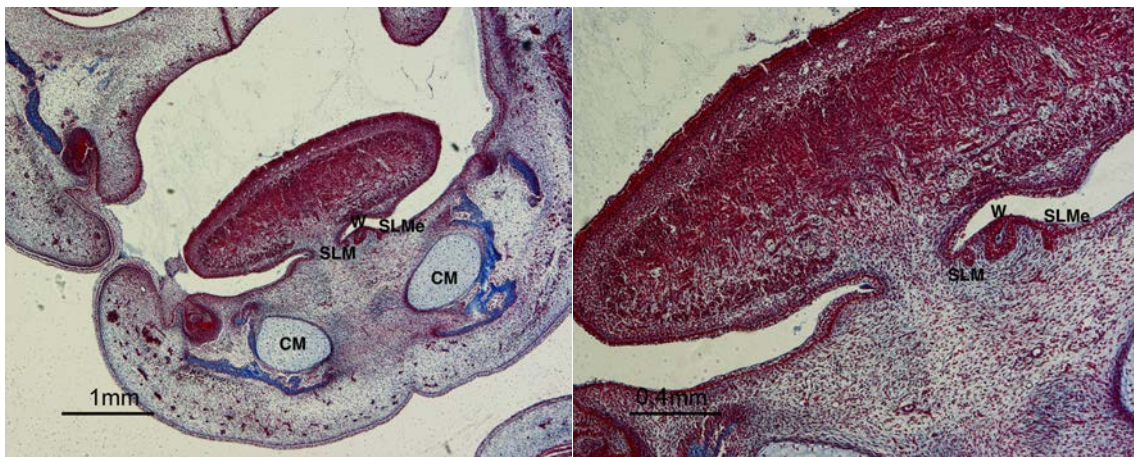


Figura 58 y 59: Embrión BR4 de 28 mm. Corte frontal, tinción Azán. Figura 58 4x. Figura 59: 10 x.

En cortes posteriores (Figura 60), se desprende de la pared lateral del conducto de Wharton el esbozo de otra glándula sublingual mayor. Ese esbozo posee luz y se sitúa medial al esbozo de otra glándula sublingual menor.



Figura 60: Embrión  
BR4 de 28 mm.  
Corte frontal, tinción  
Hematoxilina-  
Eosina.  
4x.

Hacia atrás (Figura 61), la glándula sublingual mayor se aleja del conducto de Wharton y se aproxima a la sublingual menor, ésta última ya aislada del epitelio. Se sitúa suprayacente al extremo anterior del cartílago de Meckel.

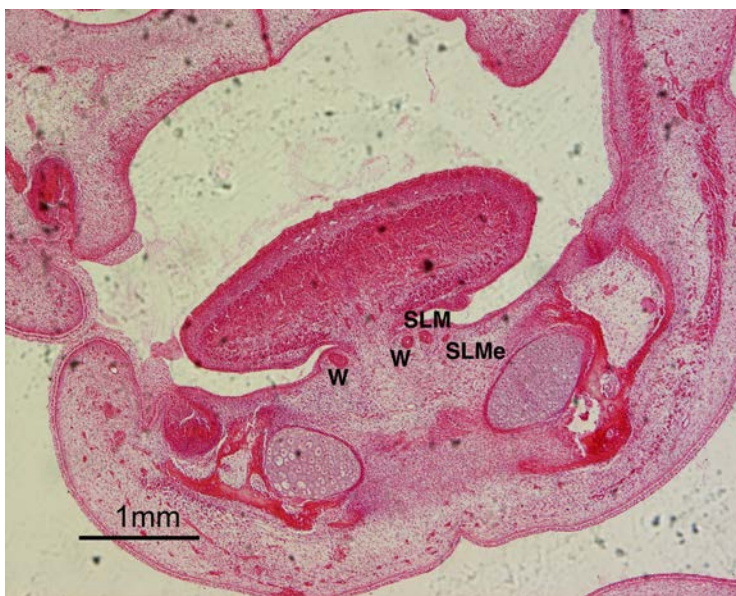


Figura 61: Embrión BR4  
de 28 mm. Corte frontal,  
tinción Hematoxilina-  
Eosina.  
4x.

En dirección dorsal (Figura 62), se observa subyacente y lateral al conducto de Wharton, el esbozo de la glándula sublingual mayor. Suprayacente a ella y conectada con el epitelio del suelo de la boca, se visualiza otra glándula sublingual menor que, al igual que las anteriores, aún está en fase sólida.

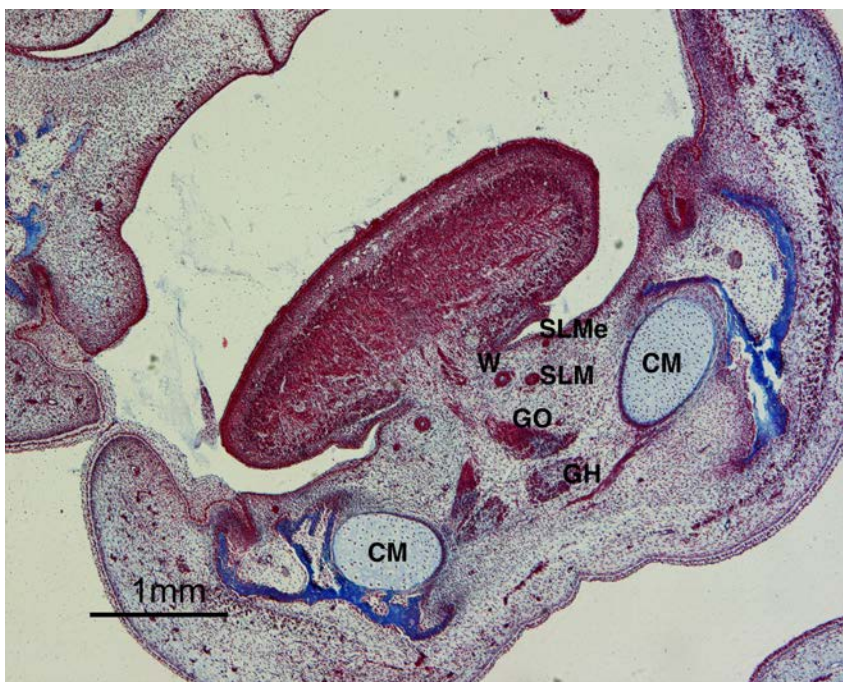


Figura 62:  
Embrión BR4 de  
28 mm. Corte  
frontal, tinción  
Azán 4x.

Hacia atrás (Figura 63), alcanzamos el extremo dorsal de la glándula sublingual mayor, a este nivel sólida y con morfología bilobulada. Se sitúa lateral y subyacente al conducto de Wharton, superficial al músculo genihiogloso, suprayacente al músculo milohioideo y medial al cartílago de Meckel. A su alrededor comienza de forma sutil a organizarse el ectomesénquima y se aprecia la llegada de fibras nerviosas procedentes del nervio lingual. En un plano suprayacente y en la región alveololingual, se visualizan unos brotes del

epitelio en el suelo de la boca pertenecientes a las glándulas salivares sublinguales menores.

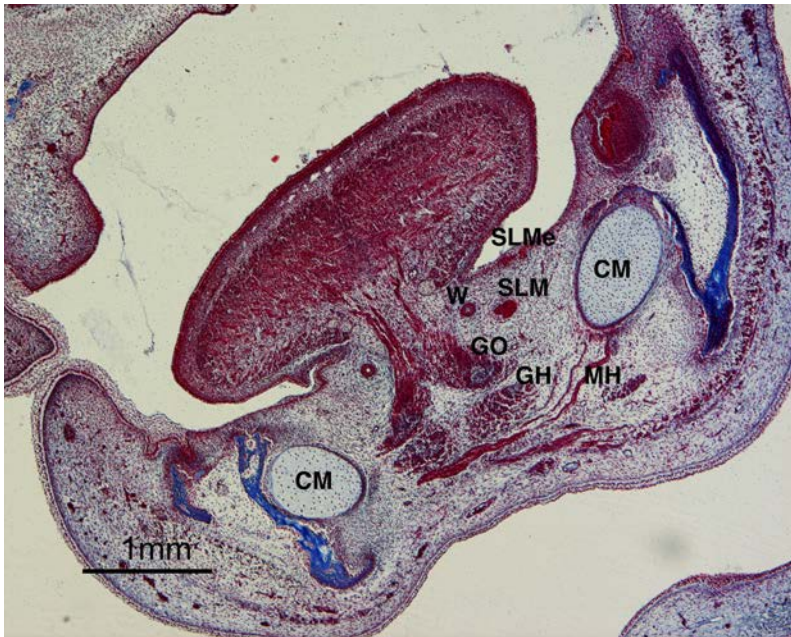


Figura 63: Embrión  
BR4 de 28 mm.  
Corte frontal, tinción  
Azán. 4x.

En cortes dorsales (Figura 64), observamos el trayecto del conducto de Wharton que discurre muy próximo a la región alveolo lingual. A este nivel, el nervio lingual y su ganglio anexo lo rodea latero caudo medialmente y se sitúa medial al músculo geniogloso, caudal a las fibras de músculo lingual inferior y craneal al músculo milohioideo.

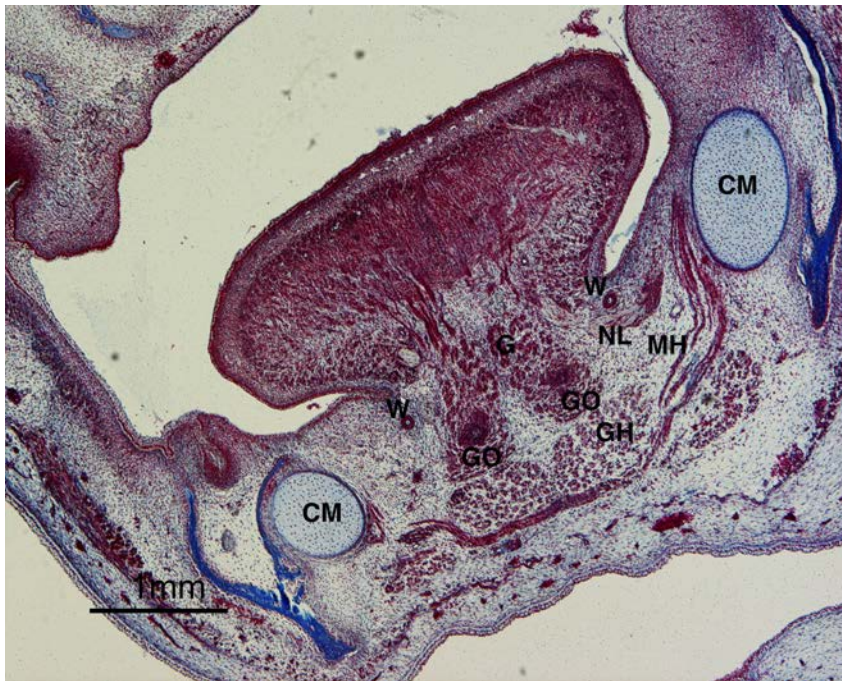


Figura 64:  
Embrión BR4 de  
28 mm. Corte  
frontal, tinción  
Azán. 4x.

Finalmente, en cortes dorsales (Figura 65), observamos que la glándula submandibular tiene un avanzado desarrollo tanto a nivel de su parénquima como del estroma y su cápsula.



Figura 65:  
Embrión BR4 de  
28 mm. Corte  
frontal, tinción  
Hematoxilina-  
eosina. 4x

**PERIODO FETAL TEMPRANO****MO 32**

En el feto MO de 32 mm, se observa (Figura 66) a cada lado del frenillo lingual, la porción ampular del conducto de Wharton en la papila salivar. Del borde externo del conducto izquierdo, se organiza un cordón epitelial que representa a la glándula salivar sublingual mayor.

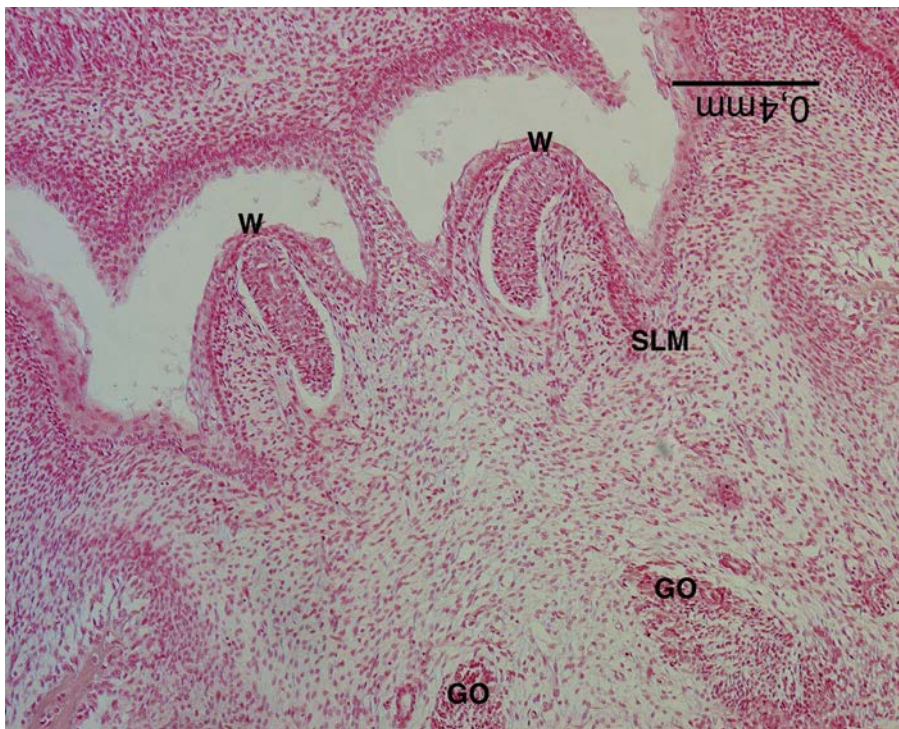


Figura 66: Feto MO de 32 mm. Corte frontal, tinción Hematoxilina Eosina.

10x

La citada glándula profundiza en el mesénquima pudiendo observarse en la sección correspondiente a la figura (Figura 67) próxima a las fibras del músculo geniogloso y medial al cartílago de Meckel. A este nivel es maciza, y a su alrededor el mesénquima comienza a organizarse.

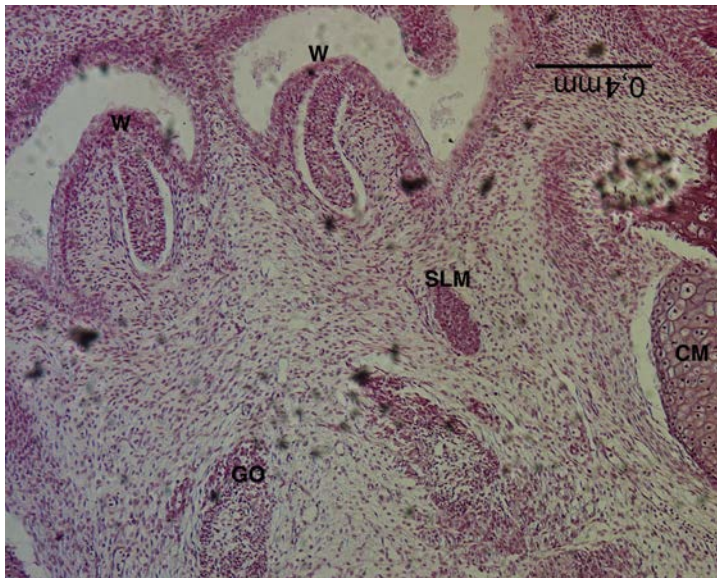


Figura 67: Feto MO de 32 mm. Corte frontal, tinción Hematoxilina Eosina. 10x

En el lado derecho (Figura 68), el esbozo de la glándula sublingual mayor emerge del epitelio de la papila salivar, dorsal a la apertura del conducto de Wharton de este lado (Figura 69); profundiza caudo dorsalmente, pudiendo observarse en cortes posteriores (Figura 70) en una posición lateral al músculo genihiogloso, craneal y lateral a la arterial lingual, y craneal y medial al cartílago de Meckel. En esta sección, también puede contemplarse el extremo caudo dorsal de la glándula sublingual mayor izquierda que comparte topografía.

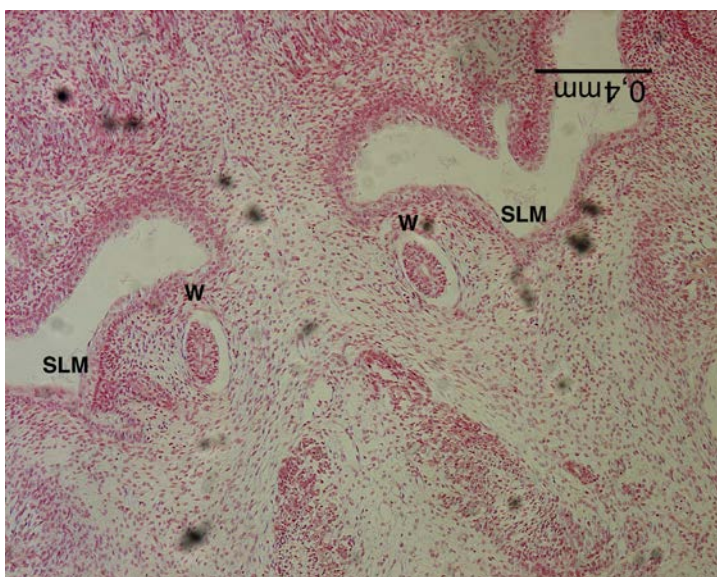


Figura 68: Feto MO de 32 mm. Corte frontal, tinción Hematoxilina Eosina. 10x

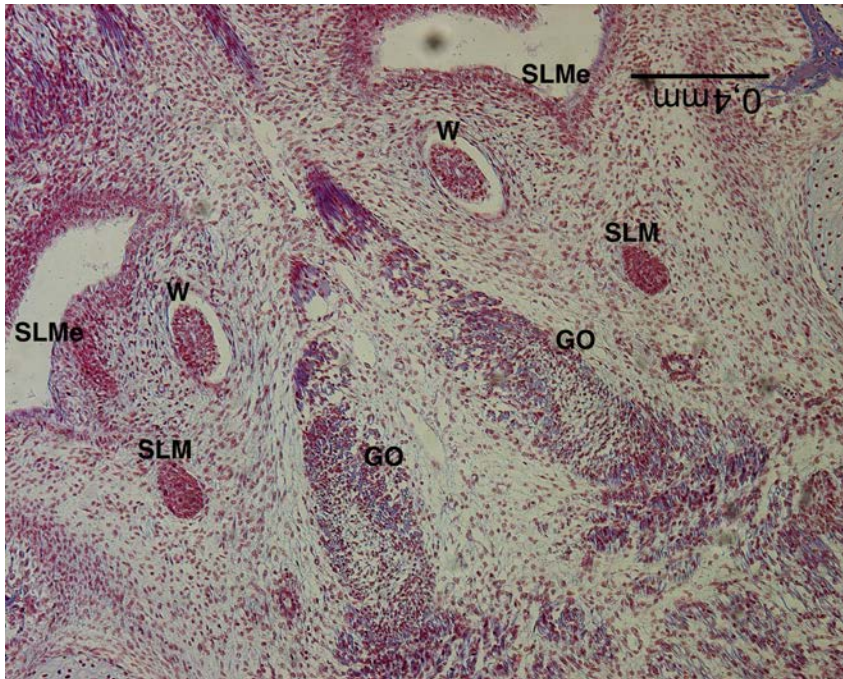


Figura 69: Feto  
MO de 32 mm.  
Corte frontal,  
tinción Azán  
. 10x

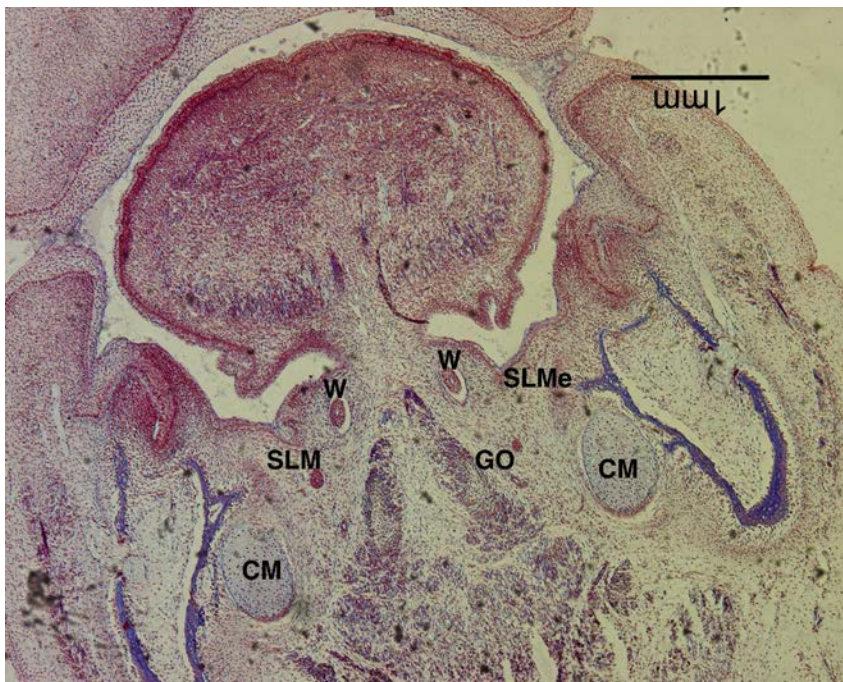


Figura 70: Feto  
MO de 32 mm.  
Corte frontal,  
tinción Azán.  
4x

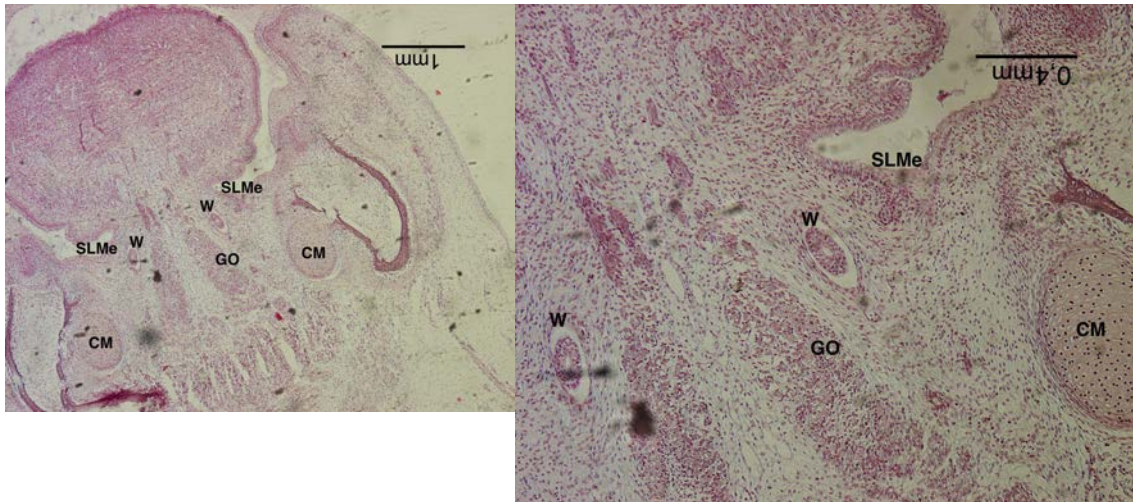


Figura 71: Feto MO de 32 mm. Corte frontal, tinción Hematoxilina Eosina 4x y 10x.

En cortes dorsales a la papila salivaris (Figura 71, 72, 73, 74), observamos, originadas del epitelio bucal, los esbozos de las glándulas sublinguales menores, situadas craneal y lateral al conducto de Wharton, y distribuidas ventro dorsalmente a lo largo del suelo de la boca

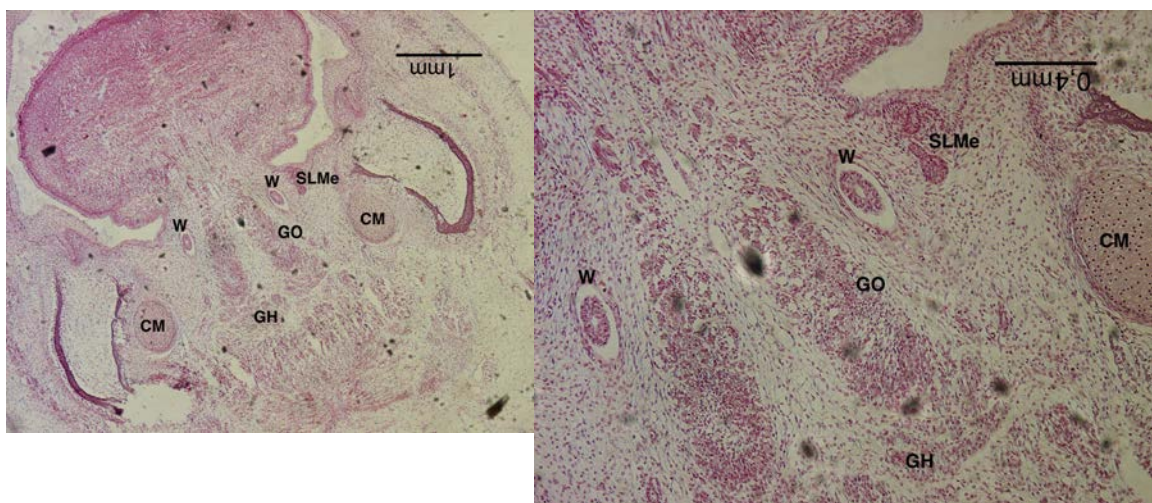


Figura 72: Feto MO de 32 mm.  
Corte frontal, tinción Hematoxilina Eosina. 4x y 10x

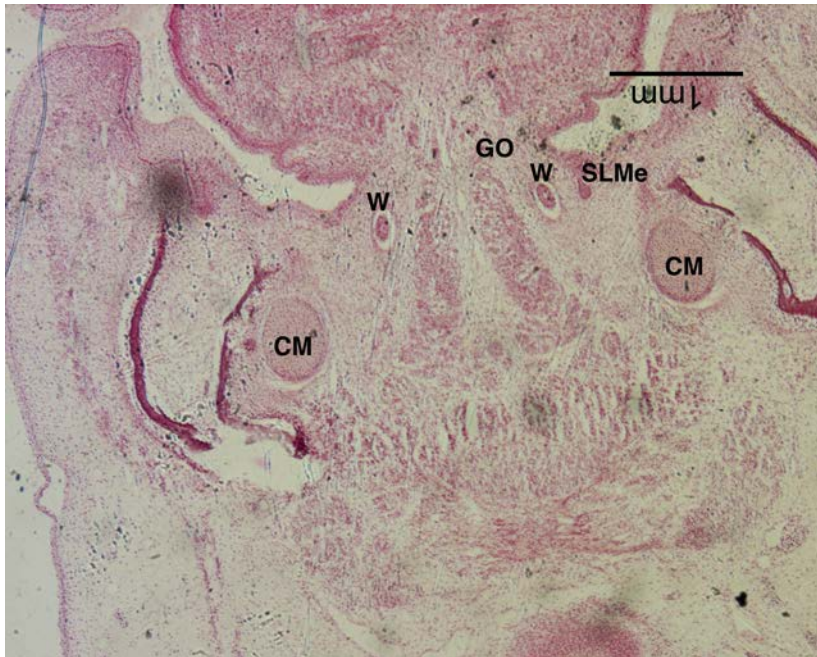


Figura 73: Feto MO de 32 mm. Corte frontal, tinción Hematoxilina Eosina. 4x

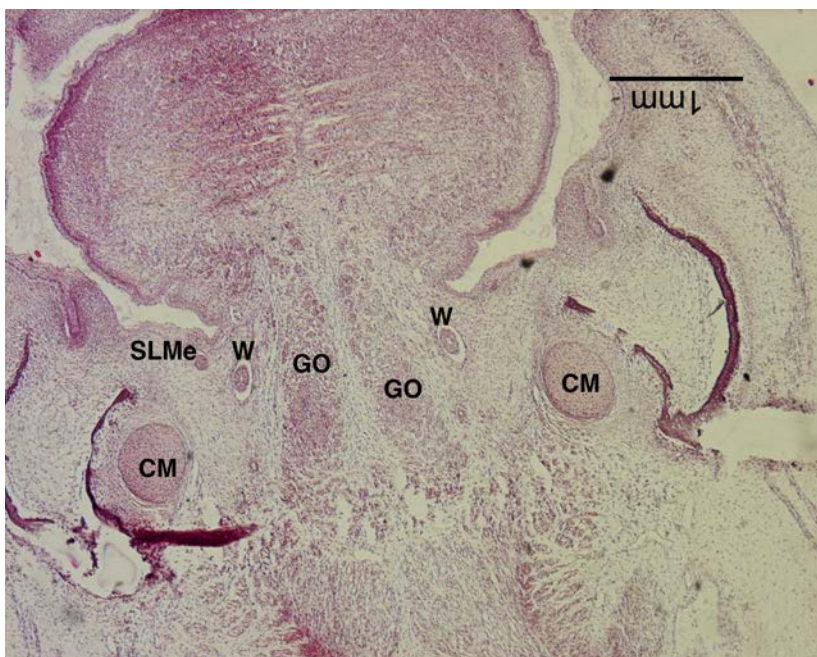


Figura 74: Feto MO de 32 mm. Corte frontal, tinción Hematoxilina Eosina. 4x.

En dirección dorsal (Figura 75), dejan de observarse las glándulas sublinguales por delante del cruce del nervio lingual bajo el conducto de Wharton. En esta figura, se observa dicho conducto cruzado por el nervio lingual y lateral a las fibras del músculo genihiogloso. Caudal al músculo milohiideo, se contempla el gran desarrollo adquirido por la glándula submandibular, con múltiples conductos glandulares rodeados por un mesénquima condensado que se diferencia a estroma y perfilados por la cápsula glandular.

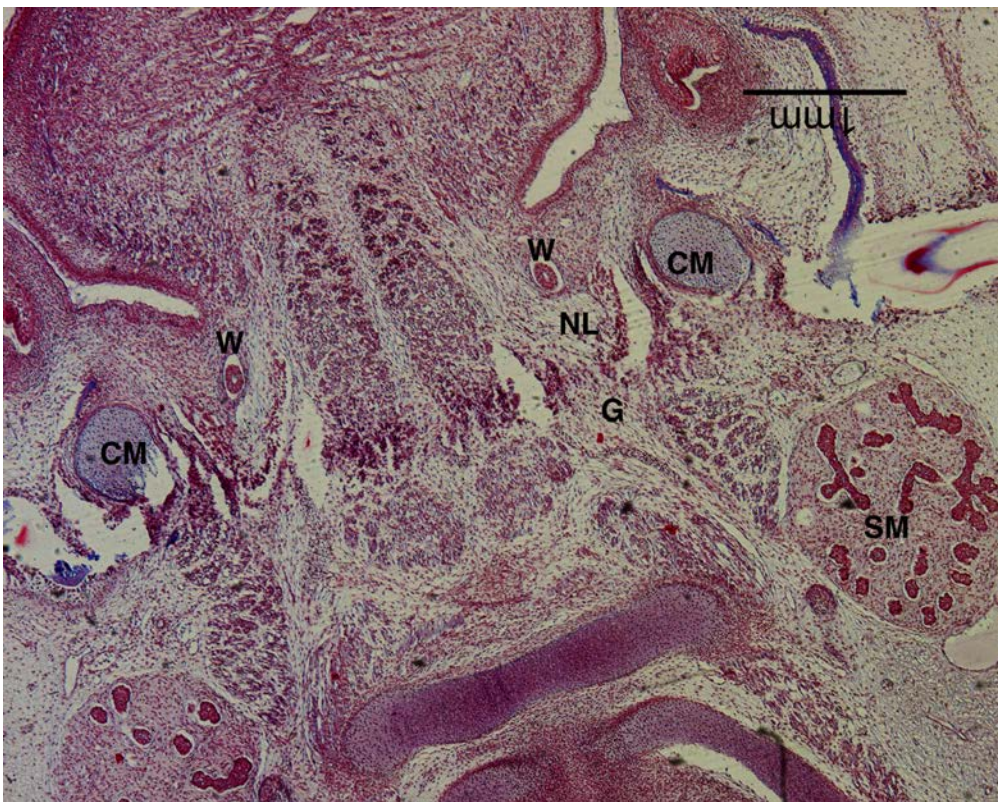


Figura 75: Feto MO de 32 mm. Corte frontal, tinción Azán. 4x.

OY 38

El feto OY de 38 mm, cortado sagitalmente, muestra la organización y desarrollo que al inicio del periodo fetal presentan las glándulas salivares sublinguales. En los cortes próximos a la línea media (Figura 76), se secciona la papila sublingualis con la desembocadura del conducto de Wharton. Subyacente a él, se aprecia la glándula salivar sublingual mayor que esboza su conducto excretor y que desemboca próximo al de la glándula submandibular.



Figura 76: Feto OY de 38mm.  
Corte sagital. Tinción:  
Hematoxilina-Eosina. 4x.

En cortes más laterales, se aprecia (Figura 77) el avanzado desarrollo de la glándula sublingual mayor. Se extiende en el piso de la boca con un crecimiento caudo dorso lateral, pudiendo identificarse en esta sección su conducto y la ramificación de los cordones formando la propia estructura

glandular. El mesénquima inicia su condensación alrededor de los cordones para esbozar el estroma glandular.

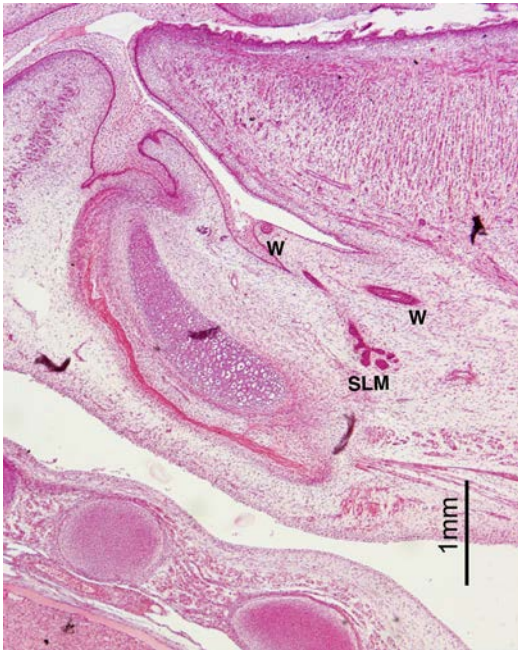


Figura 77: Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 4x.

Puede apreciarse que en dirección dorsal, la glándula sublingual mayor queda subyacente al conducto de Wharton en su recorrido más dorsal y suprayacente al cartílago de Meckel y las fibras del músculo milohiideo (Figura 78).

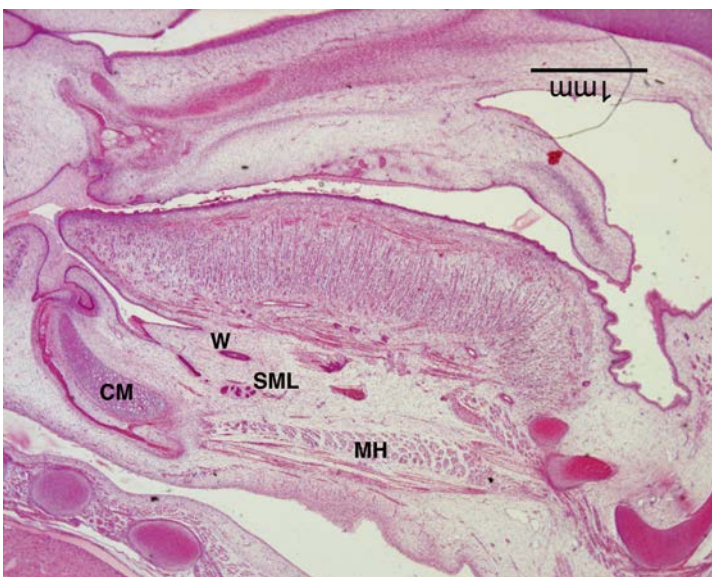


Figura 78: Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.

En otros cortes más laterales (Figura 79,80 y 81), se observan las proliferaciones epiteliales que originan las glándulas salivares menores formadas por unos cordones sólidos situados caudo dorsalmente en el mesénquima de la porción anterior del suelo de la boca. Su organización muestra menor diferenciación que las glándulas sublinguales mayores.



Figura 79: Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.

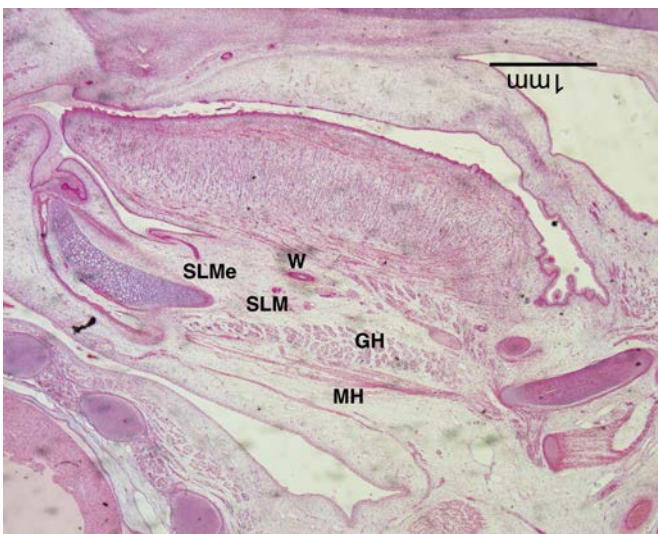


Figura 80: Feto OY de 38mm.  
Corte sagital. Tinción:  
Hematoxilina-Eosina. 2,5x.

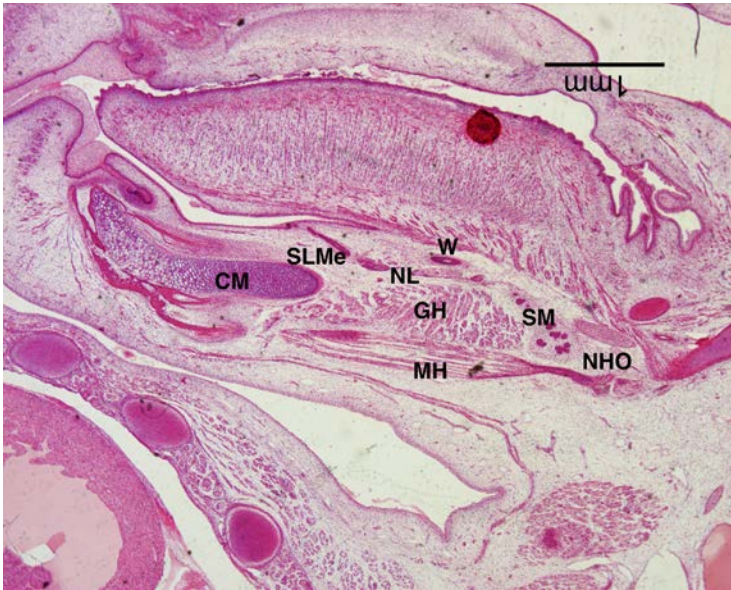


Figura 81: Feto OY de 38mm. Corte sagital.

Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.

En la Figura 82, se observa el extremo posterior de la glándula submandibular introducida a través del pasadizo delimitado entre los músculos milohioideo e hiogloso, relacionada con el extremo posterior del vientre mandibular del músculo digástrico. Estas relaciones y su estructura demuestran el avanzado estado de su desarrollo.

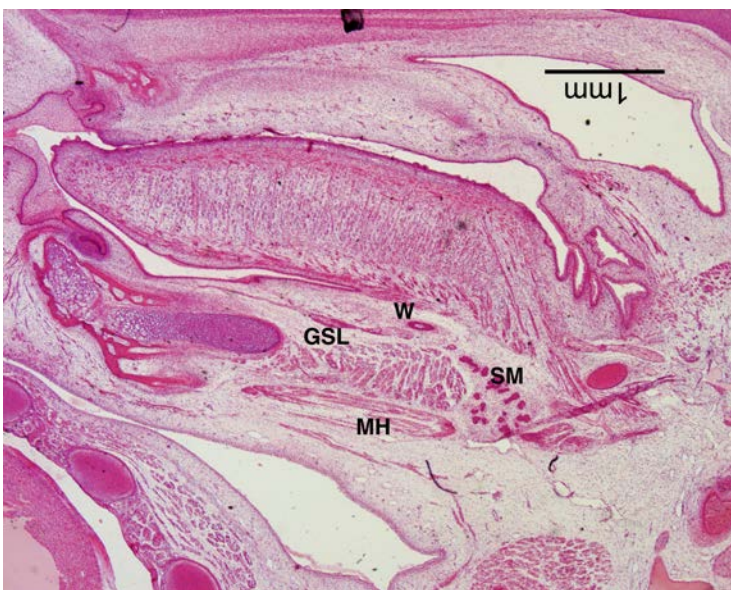


Figura 82: Feto OY de 38mm. Corte sagital.

Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.

Así mismo, se pone de manifiesto la relación del conducto de Wharton con el nervio lingual, que emite en este corte el nervio sublingual. Este se dirige ventralmente, asociado al ganglio sublingual, ya separado del ganglio submandibular. Las ramificaciones del nervio sublingual se extienden ventralmente, quedando próximas y subyacentes a los brotes de las glándulas sublinguales menores.

Continuando con cortes aún más laterales (Figura 83), sigue observándose el esbozo de glándulas sublinguales menores desprendidas del epitelio del suelo de la boca por delante de la posición que ocupa el ganglio submandibular. Se muestran como unos cordones sólidos conectados con el epitelio del suelo de la boca, dirigidos caudo dorsalmente. Ocupan una posición craneal al nervio sublingual.

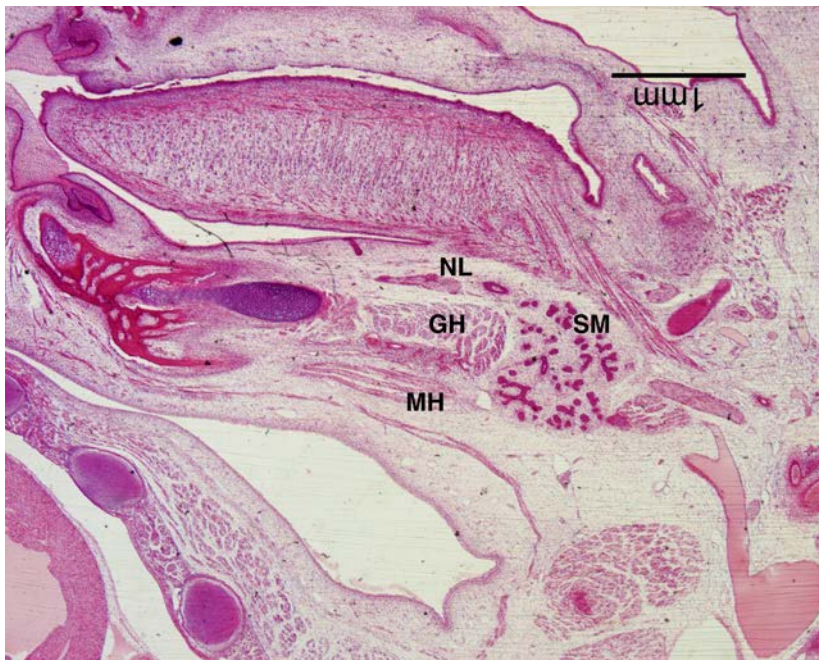


Figura 83: Feto OY de 38mm. Corte sagital. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 2,5x.

OC 43

En el feto OC de 43 mm, los cortes frontales muestran a nivel de la papila sublingual (Figuras 84 y 85), la porción ampular del conducto de Wharton y en el lado derecho, la porción ductal de la glándula sublingual que hacía atrás (Figura 86 y 87) se continúa como una estructura cordonal piriforme rodeada del ectomesénquima. En este corte, se observan también la porción ductal e inicio de la porción glandular de la glándula sublingual mayor izquierda.

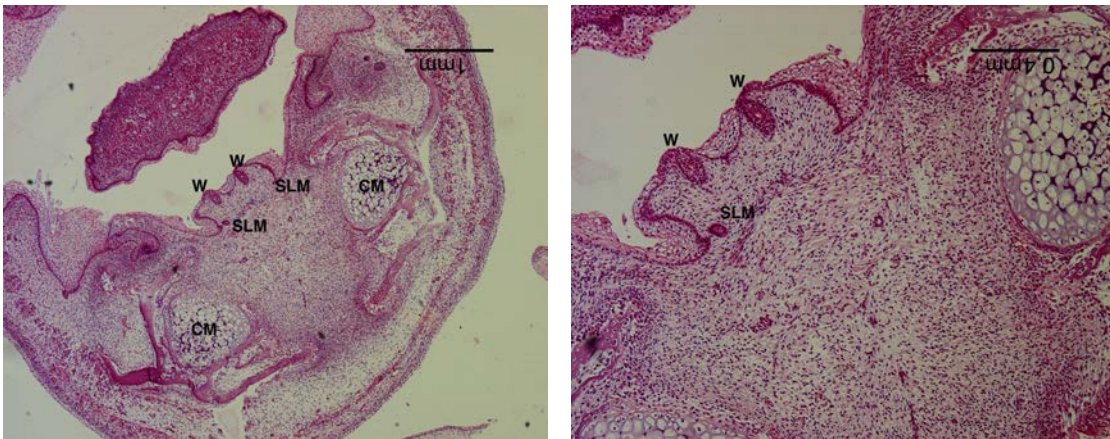


Figura 84 y 85: Feto OC de 43mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-Eosina.

4x y 10x

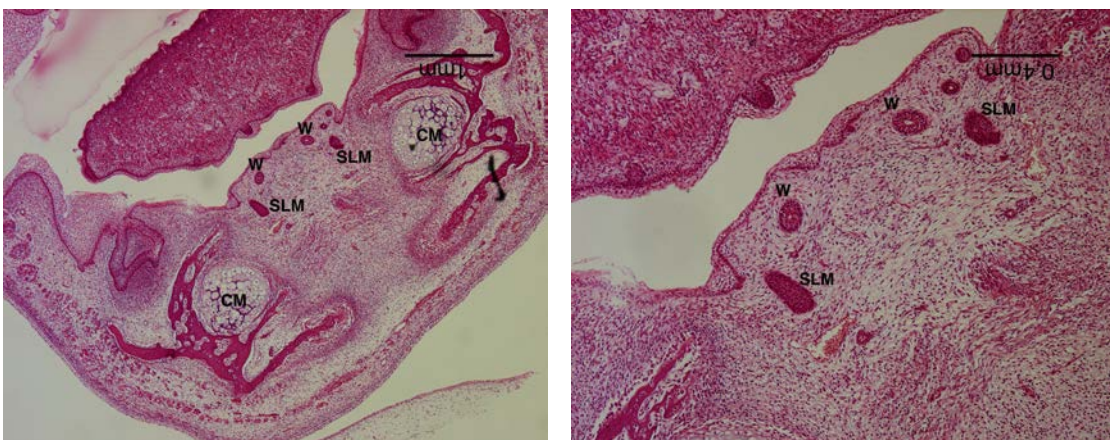
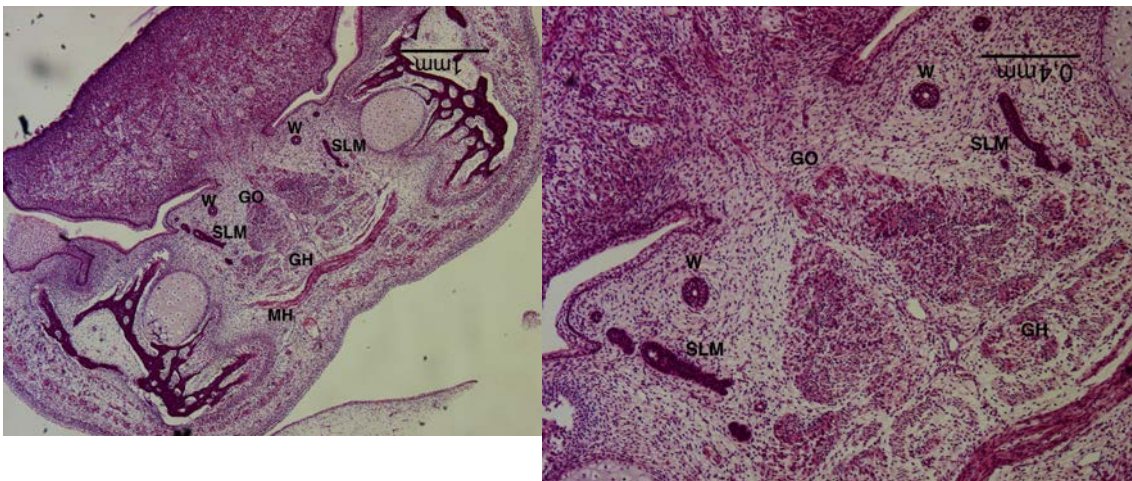


Figura 86 y 87: Feto OC de 43mm. Corte frontal. 4x y 10x.

En dirección dorsal (Figuras 88 y 89), las glándulas sublinguales mayores muestran un avanzado estado de desarrollo. Ocupan una posición lateral y subyacente al conducto de Wharton, apoyadas en la cara externa del músculo geniohiogloso y mediales al cartílago de Meckel. Este cartílago está rodeado cráneo latero cuadralmente por las trabéculas de osificación directa del cuerpo mandibular. El ectomesénquima se condensa discretamente alrededor de los cordones epiteliales que proliferan y se dividen para organizar el parénquima glandular.



Figuras 88 y 89: Feto OC de 43mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 4x y 10x.

En secciones posteriores (Figuras 90, 91 y 92), observamos a distintos niveles los cordones epiteliales que originan las glándulas salivares menores. Estos cordones profundizan en el ectomesénquima subyacente, alargando su

pedículo de conexión, futuro conducto excretor, y ensanchándose a nivel de su extremo caudal. Las glándulas salivares menores se localizan laterales al conducto de Wharton, suprayacentes al músculo milohioideo y mediales al cartílago de Meckel.

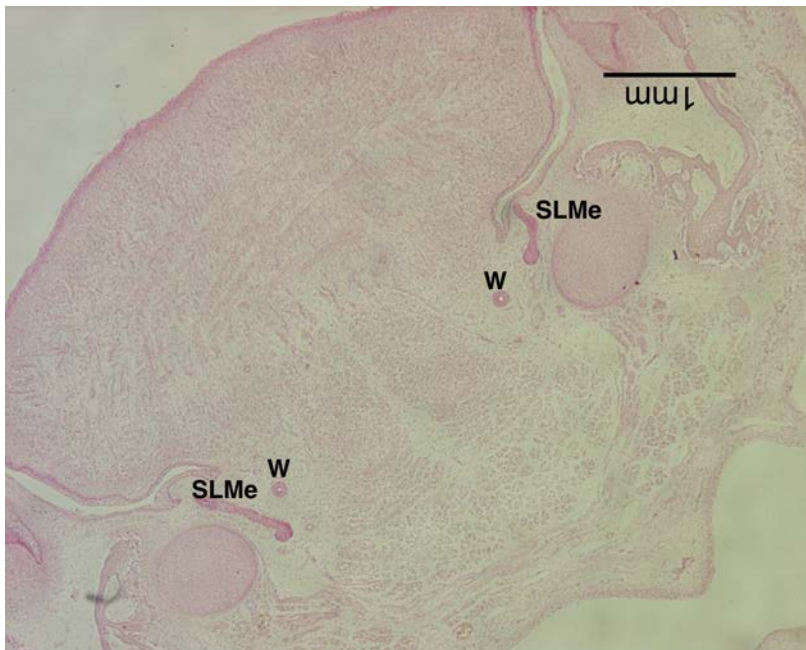


Figura 90: Feto OC de 43mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 4x

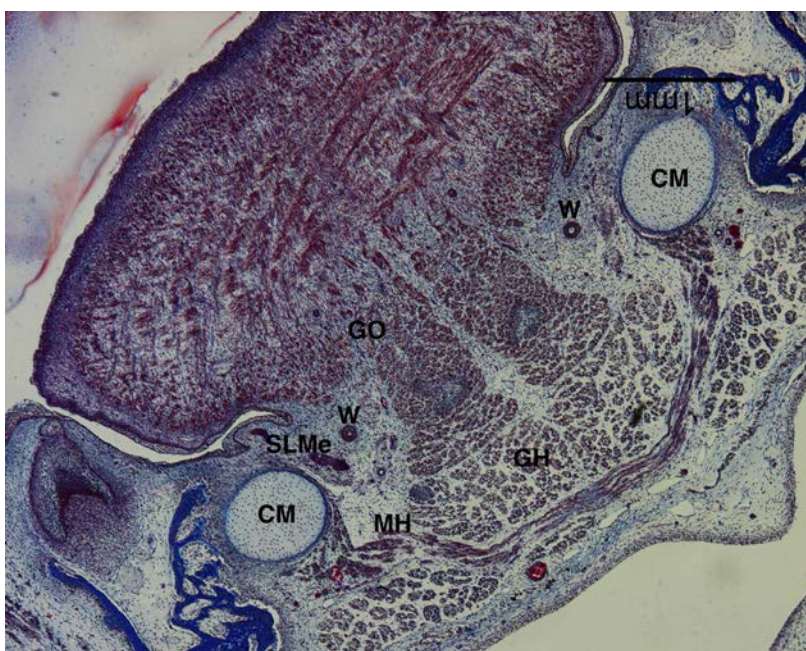


Figura 91: Feto OC de 43mm. Corte frontal. Tinción Azán. 4x



Figura 92: Feto OC de 43 mm, Corte frontal, Tinción Azán. 4x

En sentido ventro dorsal, se definen a nivel del asa que el nervio lingual forma sobre el conducto de Wharton (Figura 93). En cortes dorsales (Figura 94), se localiza sólo el conducto de Wharton acompañado por la arteria y vena lingual junto a la prolongación sublingual de la glándula submandibular y el nervio hipogloso, introducida por el hiato limitado entre los músculos hiogloso y milohioideo.

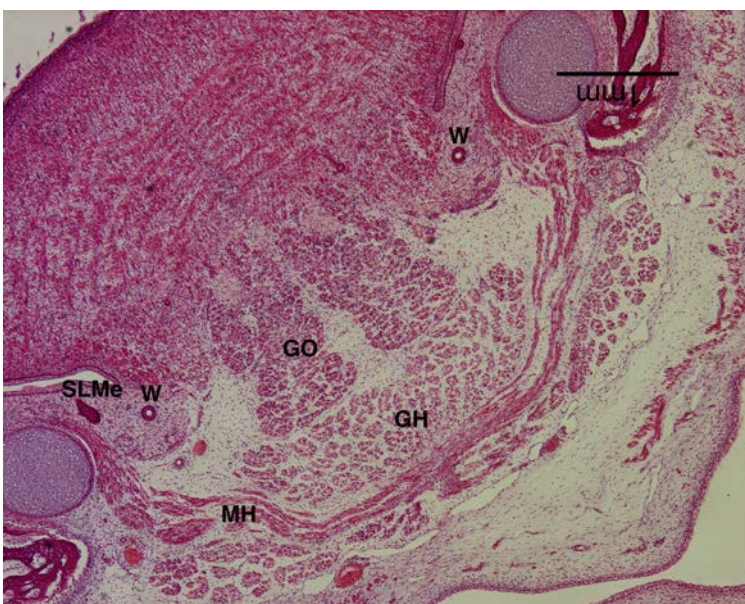


Figura 93: Feto OC de 43 mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4x.

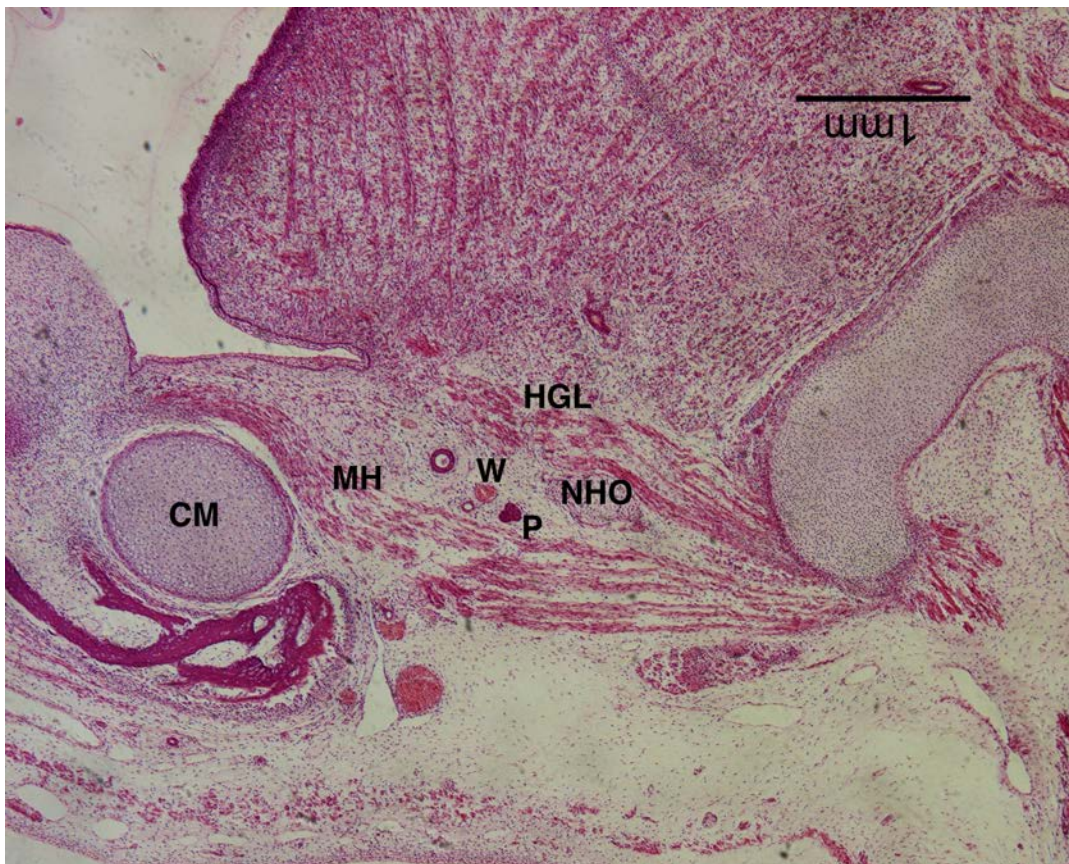


Figura 94: Feto OC de 43 mm. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4x.

## **B ) EMBRIONES DE RATA**

En el embrión de rata de 16 días, R16 C (Figuras 95, 96, 97), se observa, en el lado izquierdo, el esbozo de la glándula submandibular como invaginación del surco paralingual medial. Este surco tiene un epitelio engrosado y poliestratificado, rodeado por un ectomesénquima que comienza a organizarse a su alrededor. En el lado derecho, el esbozo de la glándula submandibular ha profundizado ya en el ectomesénquima. Adopta una forma esférica con una pequeña luz en su centro. El ectomesénquima se organiza concéntricamente a su alrededor.

En este mismo corte, se observa el surco paralingual lateral. Su epitelio está engrosado y poliestratificado, y de su extremo inferior se produce una invaginación hacia el mesénquima subyacente.

Puede apreciarse el estado evolutivo de la musculatura lingual en la que se identifican los músculos transverso lingual, hiogloso y lingual superior. También se puede observar el cartílago de Meckel, las trabéculas que inician la osificación del cuerpo mandibular y las fibras del músculo milohioideo.

En la Figura 95, la positividad para NHK-1 es evidente en la vertiente externa de la invaginación de la glándula submandibular, lo mismo que en la vertiente media del área de invaginación del surco paralingual lateral del lado derecho para formar la glándula sublingual mayor.

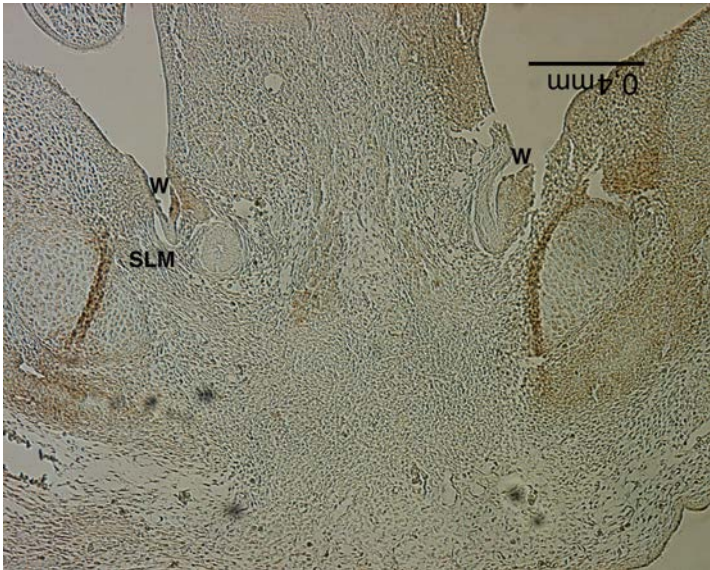


Figura 95: Espécimen de rata de 16 días. Corte frontal. Marcaje de NHK1 (1/35) 10x



Figura 96: Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: Hematoxilia-Eosina. 4x

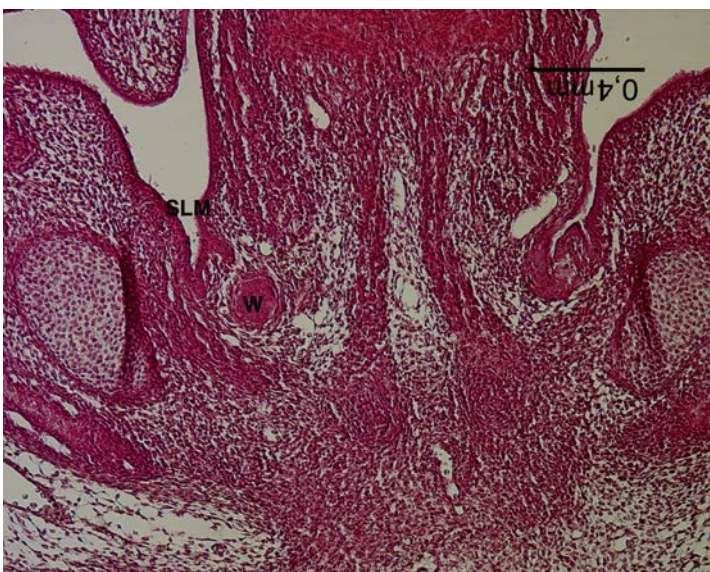


Figura 97: Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: Hematoxilia-Eosina. 10x

Estos mismos hallazgos se mantienen en cortes más dorsales (Figura 98). Se aprecia en el lado derecho la evolución del esbozo de la glándula submandibular y la invaginación del surco paralingual lateral. En el lado izquierdo, se aprecia la proximidad entre el surco paralingual lateral y el cordón epitelial que une el esbozo de la glándula submandibular con el epitelio del suelo de la boca.

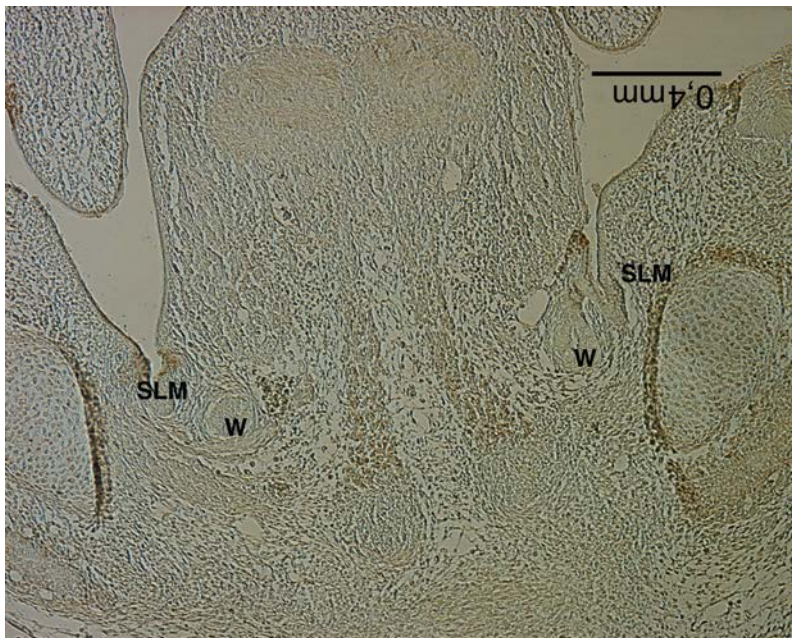


Figura 98:  
Espécimen de rata  
de 16 días. Corte  
frontal. Marcaje  
NHK1 ( 1/20)  
10x

En cortes más dorsales (Figura 99) se visualiza el extremo posterior de la glándula submandibular conformada por múltiples cordones epiteliales y rodeada del ectomesénquima.



Figura 99: Espécimen de rata de 16 días. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4x.

En el embrión de rata R16 D (Figuras 100 y 101), se identifican, en la porción anterior del suelo de boca, los esbozos de la glándula submandibular y sublingual como invaginaciones del epitelio oral. Se sitúan craneales y mediales al cartílago de Meckel, suprayacente al músculo milohioideo y laterales al músculo geniohiogloso.



Figura 100: Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4x



Figura 101: Espécimen de rata de 16 días.  
Corte Frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina.  
10x

Hacia atrás (Figura 102), el esbozo de la glándula submandibular derecha, queda sumergida en el ectomesénquima adoptando una forma anular con luz en su interior, correspondiendo esta parte a la porción ductal de la glándula. El ectomesénquima se organiza a su alrededor disponiéndose en capas concéntricas. Suprayacente a él, se visualiza el surco paralingual medial y lateral muy próximos. El epitelio del surco paralingual lateral está engrosado y poliestratificado.



Figura 102: Espécimen de rata de 16 días.  
Corte Frontal. Tinción H-E. 10x. Lado  
derecho

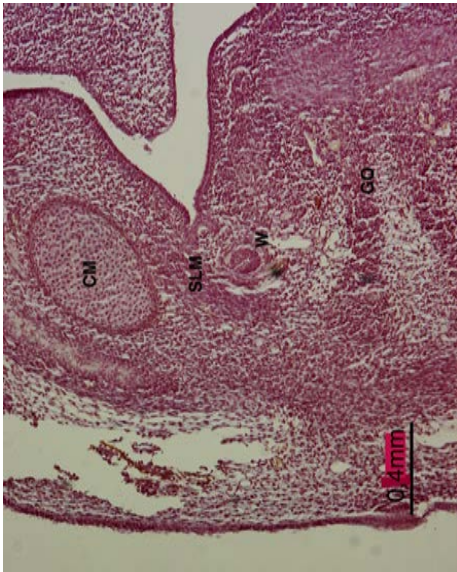


Figura 103: Espécimen de rata de 16 días.  
Corte Frontal. Tinción H-E. 10x. Lado izquierdo.

En el lado izquierdo (Figura 103), la imagen que ofrecen estas estructuras es muy similar. Destaca la llegada de fibras del nervio lingual al ectomesénquima agrupado alrededor del conducto de Wharton. Tanto en este lado como en el contralateral (estos dos últimos cortes), se aprecia que, subyacente al conducto de Wharton, el ectomesénquima está muy condensado formando el incipiente esbozo del músculo milohioideo que, hacia fuera, se fija en el pericondrio del cartilago de Meckel.

Dorsal a la llegada de las fibras que aporta el nervio lingual (Figura 104), el esbozo de la glándula submandibular se divide en unos túbulos epiteliales donde la mayoría no tienen luz, rodeados por un ectomesénquima condensado. Se establece el esbozo del parénquima, el estroma y la cápsula de la citada glándula.



Figura 104: Espécimen de rata de 16 días. Corte Frontal. Tinción Hematoxilina-eosina. 4x

En el embrión de 17 días, R17 D (Figura 105), del epitelio del suelo de la boca se desprende, en una secuencia medio lateral, el esbozo de la glándula submandibular a nivel de su porción ductal, y el esbozo de las glándulas sublinguales mayor y menor. Debajo de ellas, el ectomesénquima se condensa, quedando craneal y medial al cartílago de Meckel y al esbozo del músculo milohioideo. El área de invaginación queda próxima al nervio lingual y lateral a las fibras del músculo geniogloso.

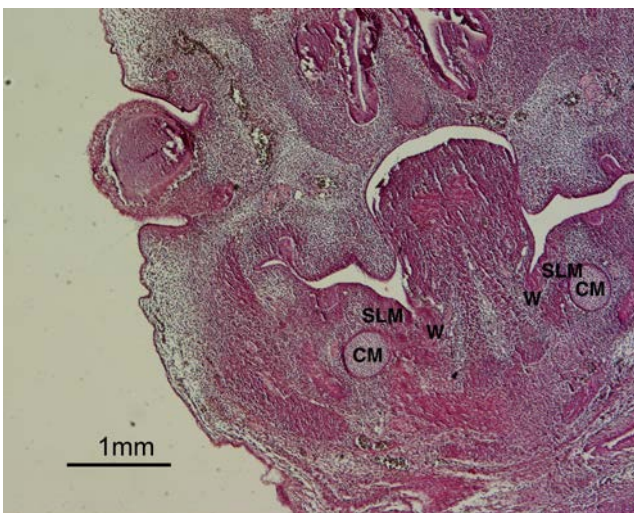


Figura 105: Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. Tinción Hematoxilina-eosina. 4x

Hacia atrás (Figura 106 y 107), se observa, en el lado izquierdo, el conducto de Wharton rodeado en su cara inferior por el nervio lingual que emite algunos ramas al ectomesénquima. Craneal y lateral, del epitelio del suelo de la boca emergen los cordones epiteliales que esbozan las glándulas sublinguales mayores y menores.

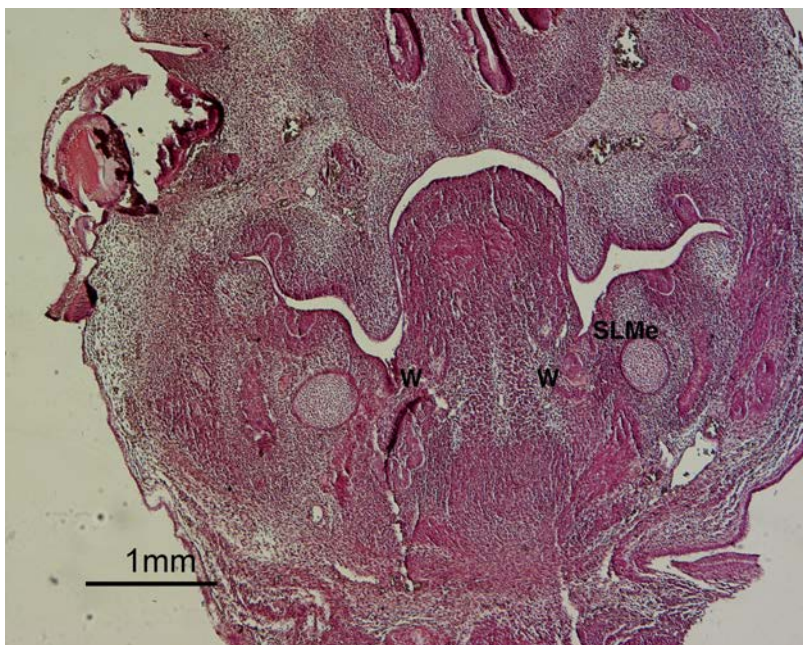


Figura 106:  
Especimen de rata  
de 17 días. Corte  
Frontal. Tinción  
Hematoxilina-  
eosina. 4x

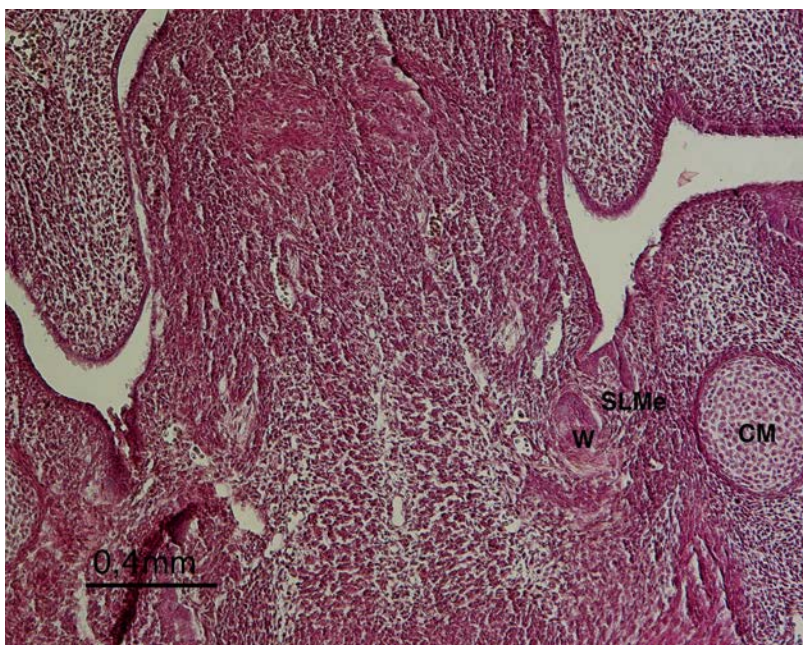


Figura 107:  
Especimen de rata  
de 17 días. Corte  
Frontal. Tinción  
Hematoxilina-  
eosina. 10x

En dirección dorsal (Figura 108), el esbozo de la glándula submandibular pierde su luz y adquiere una forma esférica y maciza. En el suelo de la boca, se distinguen los surcos paralingual medial y lateral, este último profundizando más en el ectomesénquima y dirigiéndose hacia abajo y afuera.

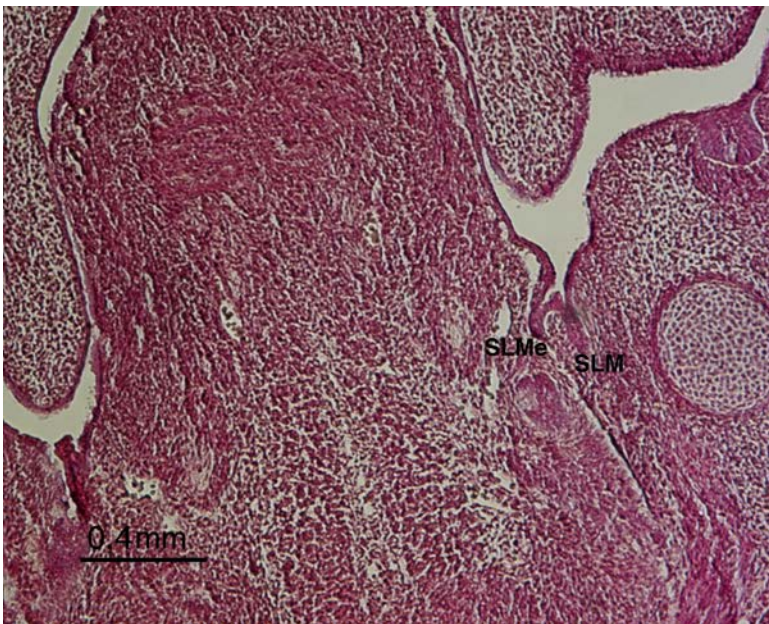


Figura 108:  
Especimen de rata de  
17 días. Corte Frontal.  
Tinción Hematoxilina-  
eosina. 10x

Hacia atrás, (Figura 109) el esbozo submandibular adquiere mayor tamaño y ramificación, mientras que el surco paralingual lateral profundiza más, deslizándose medial al cartílago de Meckel y quedando suprayacente al esbozo de la glándula submandibular.

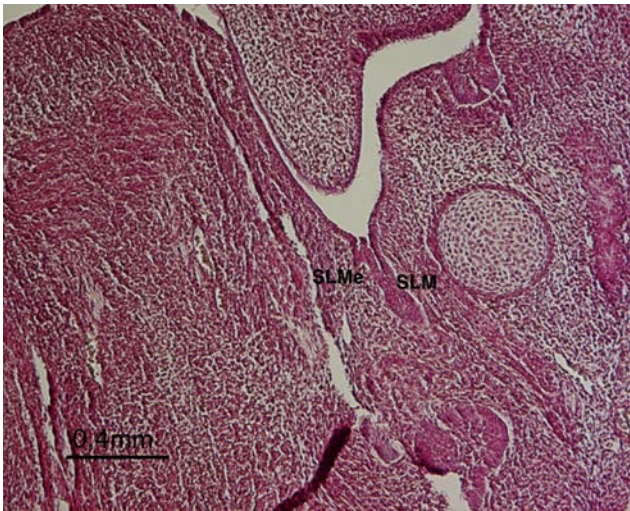
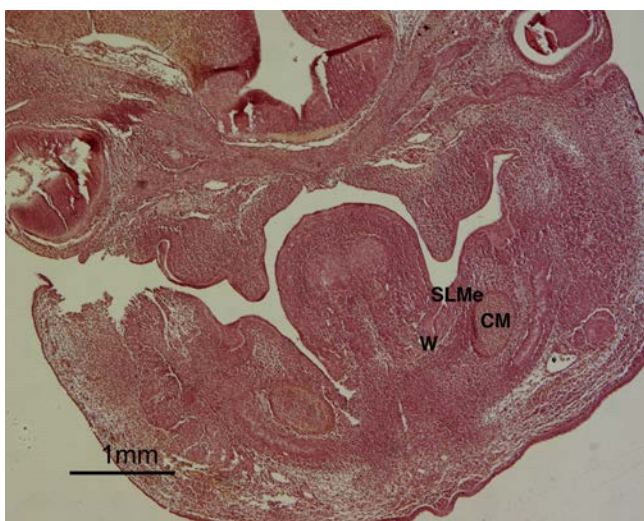


Figura 109: Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. Tinción Hematoxilina-eosina. 10x

En el embrión R17 E (Figuras 110 y 111), se contempla como el epitelio del suelo de la boca se invagina para originar el conducto de Wharton a nivel de su desembocadura. Igualmente se pueden observar los esbozos de las glándulas salivares mayor y menor. Es muy llamativa la tinción adquirida por estas células epiteliales ya que captan el marcador, al igual que las células del cartílago de Meckel, las fibras del nervio lingual y los gérmenes dentarios, lo que indican un claro origen ectodérmico.



Figuras 110: Espécimen de rata de 17 días. Corte frontal. Tinción Hematoxilina-eosina, HNK1 1/15 con IgM 1/2000

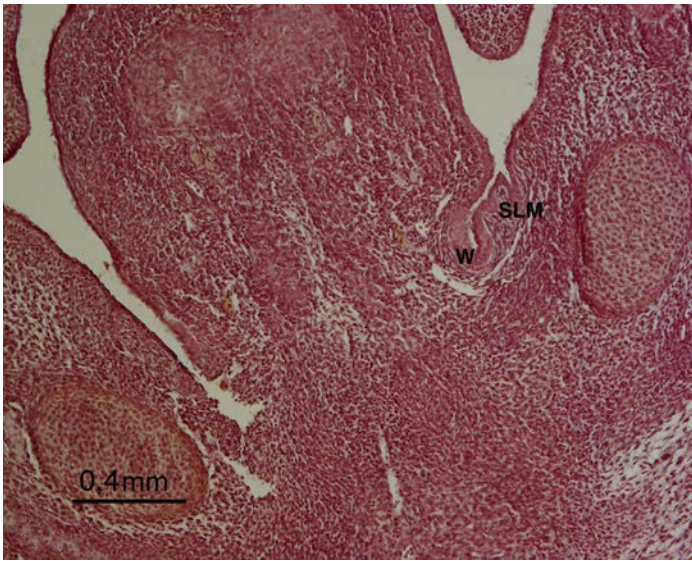


Figura 111: Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. Tinción Hematoxilina-eosina. 10x NHK1 1/15 con IgM 1/2000

En cortes dorsales, ya sin el anticuerpo (Figura 112) el conducto de Wharton pierde su luz y el ectomesénquima se condensa a su alrededor. El surco paralingual lateral continúa invaginándose originando nuevos brotes salivares sublinguales.

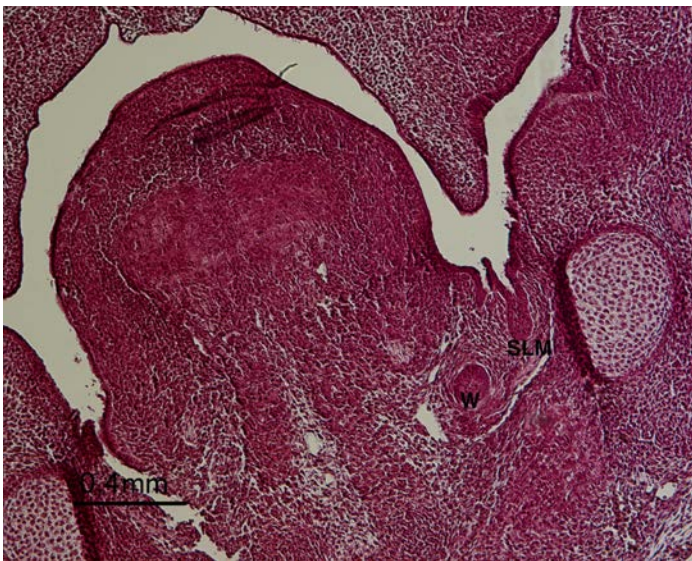
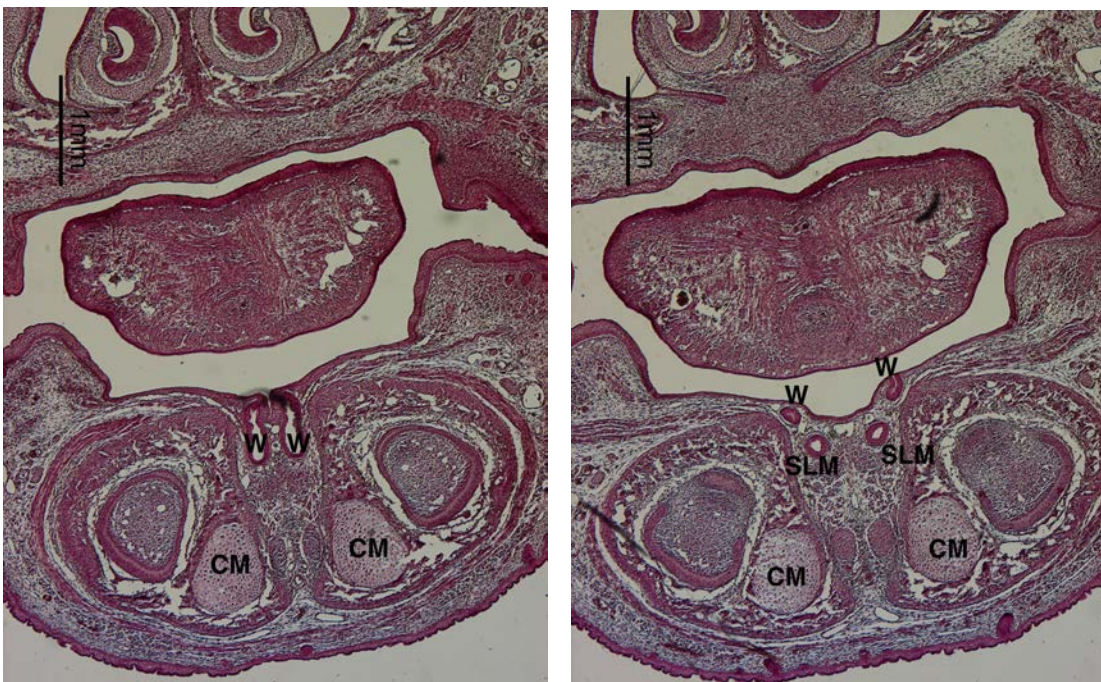


Figura 112: Espécimen de rata de 17 días. Corte Frontal. Tinción Hematoxilina-eosina. 10x

En el embrión de 18 días, R18 A, se observa el mayor grado de desarrollo de las glándulas sublinguales y submandibular. En cortes anteriores ( Figura 113), la sección afecta a la desembocadura del conducto de Wharton en la cavidad oral, circunstancia que sucede por delante del frenillo lingual.



Figuras 113 y 114: Especimen de rata de 18 días. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4 x.

En dirección dorsal (Figura 114), craneal y lateral al conducto de Wharton, se localiza la glándula sublingual mayor, que en el lado izquierdo es seccionada en el momento de su desembocadura en el suelo de la cavidad oral.

Hacia atrás, ( Figura 115), acompaña al conducto de Wharton, ocupa una posición lateral y ambos quedan muy próximos a la mucosa del suelo de la boca.

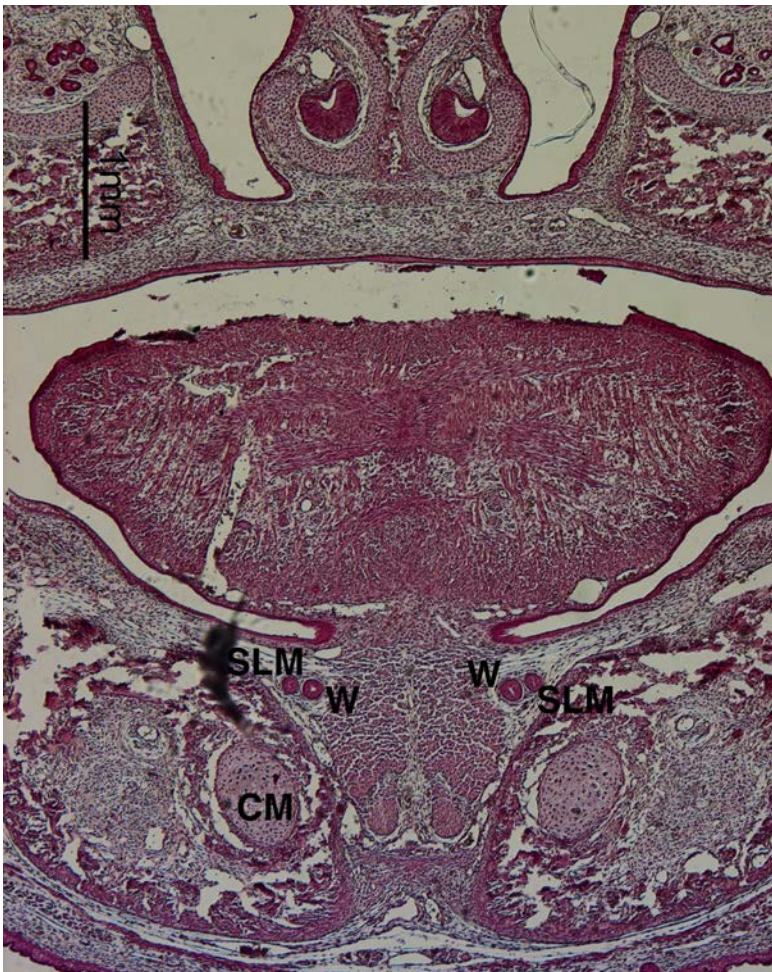


Figura 115: Especimen de rata de 18 días. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4 x

En cortes muy posteriores del suelo de la boca ( Figuras 116 y 117), se pueden observar los esbozos de las glándulas sublinguales menores ocupando una posición profunda a la mucosa del suelo de la boca y medial al cartílago de Meckel.



Figuras 116: Espécimen de rata de 18 días. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4 x

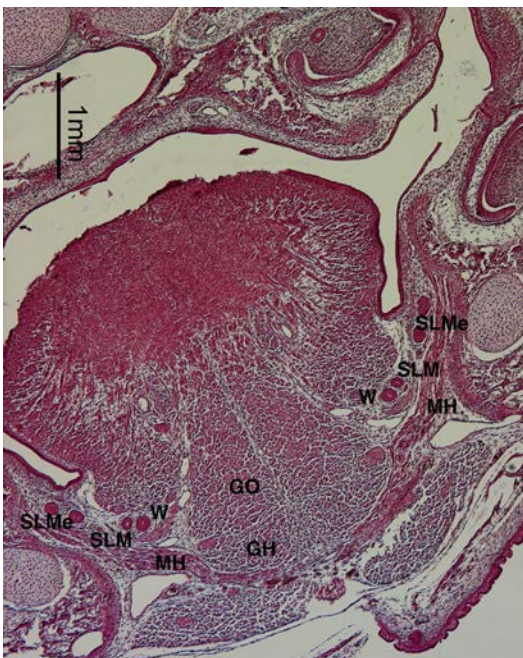


Figura 117: Espécimen de rata de 18 días. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina. 4 x

Atendiendo a los portos tratados con la técnicas de Inmunohistoquímica, en la Figura 118, alrededor de la glándula sublingual se organiza el mesénquima, que es positivo para CBL 202, formando un halo o una condensación elíptica.

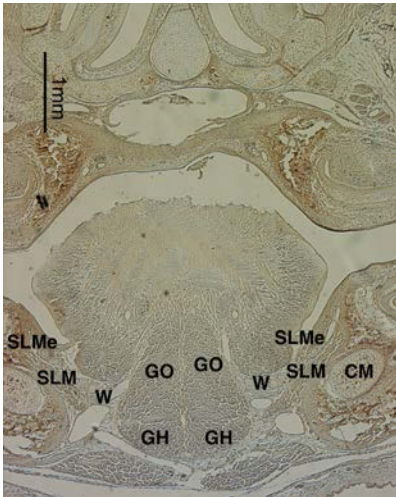


Figura 118: Espécimen de rata de 18 días. Corte frontal. Tinción: Ac CBL 202 1/20, con IgG 1/300.

4 x

Apreciamos los brotes de las glándulas salivares menores inmersos dentro del mesénquima por encima del músculo milohioideo. Continúan apareciendo unas yemas conectadas con el epitelio de las glándulas sublinguales menores.

Es llamativa la aparición de algunos brotes de las glándulas sublinguales, tan posteriores, a la altura de la la base de la lengua. (Figura 119).

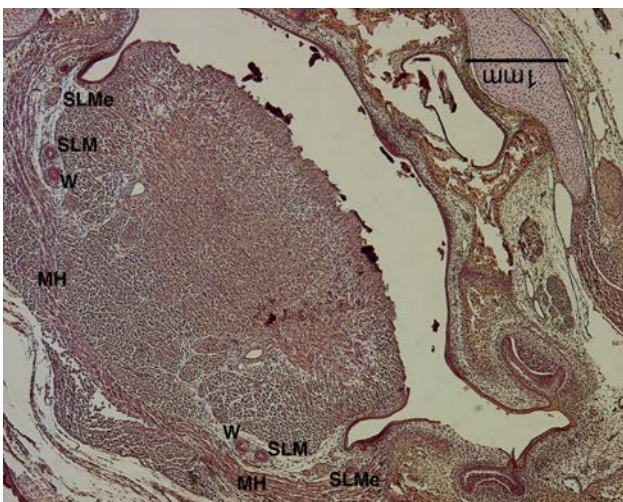


Figura 119: Espécimen de rata de 18 días. Corte frontal. Tinción: Hematoxilina-eosina con Ac NHK1 1/15 con IgM 1/2000. 4 x

## DISCUSIÓN:

Las glándulas sublinguales son glándulas salivares mayores situadas en el suelo de la boca, alojadas en la celda sublingual y relacionadas medialmente con los músculos geniogloso y genihioideo, cranealmente con la mucosa del suelo de la boca, lateralmente con la cara interna del cuerpo mandibular donde se adaptan a la fosa sublingual y caudalmente con el músculo milohioideo. Por su extremo anterior, pueden llegar a contactar entre sí en la línea media, a cada lado del frenillo lingual. Por su extremo dorsal, se relacionan con la glándula submandibular, en concreto con el proceso sublingual de la citada glándula.

Están rodeadas por un tejido celular laxo a través del cual se relacionan con el conducto de Wharton, con la arteria sublingual y las venas raninas. Son las glándulas salivares mayores más cercanas a la mucosa de la cavidad oral y las que tienen los conductos secretores más cortos.

Orts Llorca (1972) considera a la glándula sublingual como “ un conglomerado formado por el contacto íntimo de dos porciones distintas genéticamente. Para él, la porción interna procede de la estría media del suelo de la boca y surge como una evaginación en fetos de 32 mm. Constituye la glándula sublingual mayor cuyo conducto excretar es el conducto de Bartholin. La porción externa se origina de la estría lateral y forma un conglomerado que en conjunto

denomina glándula sublingual menor. Sus conductos excretores son los denominados conductos de Walther.

Mientras que el conducto de Bartholin desemboca en la boca junto al conducto de Wharton, los de Walther lo hacen más externos a la papila salivaris sublingualis, considerándose como múltiples conductos cortos que desembocan escalonadamente en el suelo de la boca.

El desarrollo de las glándulas salivares ha sido objeto de estudio por multitud de autores. La mayoría de los trabajos se centran en la organogénesis de las glándulas submandibulares y parótidas, siendo escasos los estudios y análisis específicos sobre la organogénesis de la glándula sublingual y de manera especial, sobre su origen y evolución en embriones humanos.

La aparición del esbozo de la glándula sublingual ha generado cierta controversia, pues existen opiniones diversas referentes al cómo y cuándo de esta génesis.

Patten (1953) afirma que surge en la séptima semana del desarrollo y Chievitz (1885) indica que está presente en la octava semana. Un amplio grupo de autores como Fischel (1935), Andersen (1942), Celestino Da Costa (1942), Solere y Haegel (1969), Poirier, Cohen, Baudet (1974) y Genis (1969), sugieren que es al final del segundo mes cuando hace su aparición el esbozo glandular sublingual. Churchill (1914) indica que la aparición de este esbozo ocurre en embriones de 24 mm; Rodríguez Vazquez MC (1987) afirma que el momento de aparición del esbozo sublingual se localiza en el estadio 21 de O'Rahilly correspondiente a embriones de 22 a 24 mm de longitud y 52 días.

Según nuestras observaciones, en embriones de 17,5 mm se visualiza por primera vez el área prospectiva sublingual como condensación epiblastica localizada en la región anterior del suelo de la boca. En el embrión de 18 mm, este área se sitúa lateral al extremo ventral del surco paralingual medial. El mesénquima subyacente está condensado a este nivel ocupando una región suprayacente al cartílago de Meckel.

Velazquez (1952) y Orts (1972) consideran que en el suelo de la boca se forman tres estrías o surcos, denominados medial, intermedio y lateral. En su opinión, estos surcos representan las áreas prospectivas de las que se originan las glándulas submandibulares, sublingual mayor y sublingual menor. Cuneo y Beall (1902) atribuyen al surco paralingual lateral el origen de las glándulas salivares sublinguales mayor y menor. Testut y Jacob (1914) consideran dos surcos paralinguales externo e interno a ambos lados de la lengua. Para ellos, las glándulas salivares sublinguales mayor y accesoria se forman a partir del surco paralingual externo o lateral. Hamilton y Mossman (1975) afirman que los esbozos de las glándulas sublinguales menores, de cinco a catorce, se originan en el surco gingivolabial.

Dozin (1965) y Serrano Cuenca (1983) indican que los surcos paralingual medial y lateral son las áreas prospectivas de las glándulas submandibular y sublingual respectivamente.

Rodriguez Vazquez MC (1987) concluye que el área prospectiva salivar sublingual se localiza en la parte más rostral de la región alveolo-lingual, en la zona comprendida entre los extremos anteriores de las estrías o surcos paralinguales medial y lateral.

En nuestras observaciones de los embriones, coincidimos con esta última autora ya que, si bien observamos los surcos paralingual medial y lateral, estos se sitúan dorsales al área prospectiva sublingual, especialmente el surco paralingual lateral que durante este periodo es más corto y posterior que el surco medial.

Creemos que el área prospectiva sublingual no tiene relación con el surco paralingual lateral por lo que estamos en desacuerdo con Velazquez (1952), Orts (1972), Cuneo y Beall (1902), Testut y Jacob (1914), Dozin (1965) y Serrano Cuenca (1983), quienes asocian el surco paralingual lateral al área prospectiva sublingual.

La primera manifestación de los esbozos de las glándulas sublinguales es observada en el embrión de 20 mm ( Estadío 20 de Carnegie) . Surgen como unas proliferaciones epiteliales a partir del área presuntiva sublingual, localizándose en la región anterior del suelo de la boca, alrededor del futuro frenillo lingual. Forman yemas o brotes que profundizan en el ectomesénquima subyacente.

El esbozo de la glándula sublingual mayor emerge como brote epitelial del extremo anterior del conducto de Wharton. En una posición más lateral, se forman las yemas epiteliales que representan los esbozos de las glándulas salivares menores. Éstas profundizan en el ectomesénquima subyacente y se extienden en dirección dorsal, manteniendo su conexión con el epitelio oral.

Rodriguez Vazquez MC (1987) fija la aparición de las glándulas sublinguales en etapas posteriores, concretamente, en los embriones del estadio 22 de O'Rahilly, embriones humanos de 22,5 a 24 mm de longitud. Igualmente establece el origen de las glándulas sublinguales menores un poco más tarde que la glándula sublingual mayor. Nosotros sin embargo hemos observado que ambas glándulas surgen en el mismo estadio.

Coincidimos con Vignoli (1926), Dubrevil (1929), Fischel (1935), Narbaitz (1973) y Hamilton y Mossman (1975) en la ausencia de luz en los esbozos de las glándulas sublinguales, ya que son brotes sólidos en todo momento de este periodo.

El esbozo de la glándula sublingual mayor mantiene una estrecha relación con el conducto de Wharton, tan íntima que emerge en algunos embriones de las paredes del conducto. Esta relación justifica la desembocadura de su conducto en el inicio y la porción ampular del conducto de Wharton.

Esta característica, que es observada en embriones de 20 mm, justifica la interpretación realizada por Michaelis (1929). Para él, las glándula sublingual y submandibular se originan del surco paralingual medial. De igual manera, Bornet (1963) considera que ambas glándulas se forman a partir del surco pelvi-lingual.

Serrano (1983) interpreta que el área prospectiva sublingual se sitúa en el surco paralingual lateral y que posteriormente su epiblasto es incorporado al suco paralingual medial. De esta forma justifica la desembocadura del conducto principal de la glándula en el inicio del conducto de Wharton.

Este mismo autor afirma que, en embriones del estadio 17 de O'Rahilly, la invaginación del surco paralingual medial en el mesénquima subyacente arrastra, por crecimiento alométrico negativo, el epiblasto del surco paralingual lateral, considerándolo el área prospectiva sublingual. Nosotros no estamos de acuerdo con este último autor, porque según nuestras observaciones, el área prospectiva sublingual es independiente del surco paralingual lateral, localizándose en la región anterior del suelo de la boca primitiva.

Rodriguez Vazquez MC (1987) ofrece una interpretación mecanicista sobre la formación de los surcos paralingual medial y lateral. El surco paralingual medial surge de forma pasiva como consecuencia del intenso crecimiento del esbozo lingual en la cavidad oral y el menor ritmo de crecimiento del suelo de la boca. Se constituye así un surco orientado parasagitalmente al relieve de la lengua cuyo epitelio forma el esbozo de la glándula submandibular.

Esta autora considera que el surco paralingual lateral se forma por un proceso similar y lo asocia al crecimiento del proceso alveolar de la mandíbula. Al crecer de atrás hacia delante, se origina el surco paralingual lateral, medial al proceso alveolar de la mandíbula. Esto justificaría, en su opinión, la situación más dorsal de este surco, y es ratificada por nuestras observaciones en estas fases del desarrollo.

En los embriones de rata de 16 días observamos como, lateral al esbozo de la glándula submandibular, el epitelio del suelo de la boca se engrosa y poliestratifica, invaginándose en el mesénquima subyacente. Este mesénquima

está condensado y se marca positivamente con el Anticuerpo NHK 1, lo que determina su origen crestoneural. En este aspecto coincidimos con Melnick y Jaskoll (2000), que afirma que el mesénquima localizado alrededor de las glándulas salivares es de origen neurocrestal. (Chai, 2006)

Grobstein (1953) concede una gran importancia al mesénquima alrededor del cual se organiza y evoluciona el epitelio glandular. Los estudios de recombinación tisular heterotópica realizados por Lawson (1972), Sakakura (1976), Tyler y Koch (1977), Cutler (1980) y Wells (2013) ratifican que la presencia de mesénquima es necesaria para un completo desarrollo morfológico y funcional de la glándula, estableciéndose contactos directos entre el mesénquima y las células epiteliales (Tucker, 2007).

En los estados iniciales de la formación glandular, no se conocen las señales responsables de la migración de las células de la cresta neural para formar la condensación de mesénquima observada en este periodo (Bullard,2008). Sin embargo, se sabe que el mesénquima aporta factores que permiten el inicio del desarrollo glandular.

Los resultados obtenidos en este periodo de desarrollo de la rata son muy similares a los observados en embriones humanos. Se constata la proximidad entre la invaginación origen del esbozo de la glándula submandibular y la invaginación origen del esbozo de la glándula sublingual mayor. Los esbozos de las glándulas sublinguales menores aparecen como unas invaginaciones epiteliales situadas en posiciones más externas.

En nuestra opinión, el ectomesénquima condensado y subyacente al epitelio es fundamental para guiar la invaginación del epitelio y orientar el crecimiento del esbozo glandular sublingual.

Durante los estadios 21 y 22 de Carnegie, la morfología de las glándulas sublinguales adopta un aspecto muy similar, siendo unos brotes epiteliales sólidos circunscritos a la región anterior del suelo de la boca y relacionados con el ectomesénquima condensado subyacente.

Es en el estadio 23 de Carnegie, cuando la glándula sublingual mayor crece dorso-caudalmente y aparece una luz en la porción proximal de su conducto. Su extremo dorsal está formado por un epitelio sólido con aspecto bilobulado. El ectomesénquima situado a su alrededor continúa condensado.

Las glándulas sublinguales menores forman unos brotes epiteliales sólidos y conectados con el epitelio del suelo de la boca. Su posición continúa siendo lateral y posterior a la glándula sublingual mayor, tal y como se observa en fases anteriores.

En nuestra opinión, y de acuerdo con Quirós (2015), el mesénquima que es de origen crestoneural, de forma análoga a lo que sucede con la glándula submandibular, determina por su alta capacidad migratoria la dirección de crecimiento e invaginación del epitelio responsable del parénquima glandular. Coincidimos con Morrys-Kay (1993), Ericsson y Perris (1993) que atribuyen la dirección del crecimiento del epitelio a la influencia ejercida por el ectomesénquima subyacente.

Knox (2010) en sus estudios en ratones afirma que el ganglio parasimpático submandibular ejerce un efecto inductor sobre la formación de la glándula

submandibular, como se refleja igualmente en experimentos de recombinación de epitelio y mesénquima con y sin este ganglio, y concluyen que en ausencia de ganglio existe una disminución de la población epitelial.

Arráez Aybar (1991) afirma que la porción del epiblasto invaginado y localizado dorsal al complejo ganglio neural lingual corresponde a la futura glándula, y la porción ventral a dicho complejo forma el futuro conducto submandibular.

Quirós (2015) profundiza en esta línea y concede una gran importancia a la influencia del complejo ganglio neural sobre el desarrollo de la glándula submandibular, de tal forma que determina la parte glandular que va a formar conducto de la que va a constituir el parénquima.

Nosotros, en las observaciones de embriones humanos y de ratas, no hemos observado influencia del complejo ganglio neural en la evolución del esbozo glandular sublingual mayor y menor. Coincidimos con Quirós (2015) en la observación del marcaje positivo del mesénquima con AC NHK 1 y del complejo ganglio neural, pero en esta glándula no parece tener influencia la inervación procedente de este ganglio con la evolución tanto topográfica como estructural de la glándula sublingual mayor y todavía menos aún de las menores.

Nuestras observaciones no nos han permitido establecer la posible influencia de la membrana basal ni de los factores endoteliales en el desarrollo glandular sublingual.

Al inicio del periodo fetal temprano, se organiza la papila sublingual que representa según Rodríguez Vazquez MC (1987) la carúncula sublingual.

La evolución de las glándulas sublinguales es muy parecida a la observada en el final del periodo embrionario.

En fetos de 38 y 43 mm, la glándula sublingual mayor presenta un marcado desarrollo y un crecimiento importante en sentido caudo dorso lateral. Se identifica su conducto que presenta luz solamente en su zona más proximal y presenta un cuerpo glandular con unas ramificaciones abundantes, rodeadas por un ectomesénquima condensado que esbozan el estroma y cápsula glandular. Coincidimos con Rodríguez Vazquez MC (1987) en que este estroma es independiente del ectomesénquima que forma la cápsula y el estroma de la glándula submandibular.

En contraste con la evolución de la glándula sublingual mayor, las glándulas menores son cordones epiteliales sólidos, múltiples y conectados con el epitelio del suelo de la boca.

En nuestras observaciones, queda perfectamente reflejado que la evolución de la glándula sublingual mayor tiene una diferenciación mayor que las sublinguales menores. Se diferencia ya el conducto glandular de Bartholin y las ramificaciones del epitelio para formar los cordones de los que surgirán los acinos glandulares, así como el inicio de la formación del estroma glandular y la formación de la cápsula correspondiente. Sin embargo, los brotes de las glándulas sublinguales menores están conectados por cordones sólidos con el suelo de la boca y aún no se han tunelizado para formar los múltiples conductores de Walther que de manera independiente van a desembocar en el suelo de la boca.

Esta configuración observada con nitidez durante el periodo fetal temprano justifica la desembocadura diferente del conducto de Bartholin de los conductos de Walther, ya que la glándula sublingual mayor está muy relacionada y próxima a la desembocadura del conducto de Wharton, mientras que las sublinguales menores lo hacen por conductos independientes situados a distancia y laterales al citado conducto. Estamos de acuerdo con Orts Llorca (1972) cuando afirma que existe una doble identidad de la glándula sublingual. En su origen se encuentran distanciadas y con conductos de drenaje separados e independientes, lo que se visualiza igualmente en la topografía adulta.

Hemos observado al final del periodo embrionario y sobre todo en el periodo fetal como la parte periférica del estroma inicia la diferenciación de la cápsula en la glándula sublingual mayor. Por lo tanto, estamos en desacuerdo con todos los autores que aseguran no observar el anlage capsular en la glándula sublingual mayor. Rodriguez Vazquez MC (1987) afirma que, en el Estadío 22 de O'Rahilly, el ectomesénquima no ofrece signos de condensación que vislumbre la cápsula correspondiente, pero que al inicio del periodo fetal temprano ya existen signos de una formación capsular independiente para la glándula sublingual mayor.

Serrano (1983) acepta mediante su teoría del origen de la glándula sublingual en el surco paralingual lateral, que la glándula sublingual mayor tenga una misma cápsula que la glándula submandibular. Esta afirmación está claramente en contra de nuestras observaciones.

En el caso de las glándulas sublinguales menores, no hemos observado dicha condensación en este periodo estudiado, por lo que sospechamos que no existe una formación capsular para este conglomerado glandular menor.

Estas investigaciones en embriones humanos y de rata sirven para determinar con exactitud el origen de cada componente de la glándula sublingual y así poder investigar sobre las terapias de regeneración tisular glandular, cuando la glándula esté afectada por un tumor o una malformación. Es importante conocer los factores que favorecen, guían o potencian el desarrollo glandular en un estadio precoz para poder introducirlos en los estudios que se realizan con intención de regenerar algún componente glandular (Chai, 2006; Ono, 2015).

**CONCLUSIONES:**

1. En embriones humanos, el área prospectiva sublingual aparece por primera vez en el estadio 19 de Carnegie, como un engrosamiento epitelial en la región anterior del suelo de la boca, independiente y anterior al surco paralingual lateral.

2. En embriones humanos, el esbozo de la glándula sublingual mayor surge en el estadio 20 de Carnegie por la invaginación del epitelio del suelo de la boca lateral al surco paralingual medial, pudiendo aparecer como unos brotes epiteliales del extremo anterior del conducto de Wharton. El mesénquima subyacente aparece siempre condensado.

3. En embriones humanos, las glándulas sublinguales menores se originan en el estadio 20 de Carnegie, del epitelio del suelo de la boca como unos brotes independientes, siempre laterales al área de origen de la glándula sublingual mayor.

4. En embriones de rata, las glándulas sublinguales mayores emergen del epitelio del suelo de la boca en íntima relación con el extremo anterior del conducto de Wharton.

5. El mesénquima condensado alrededor de la glándula sublingual mayor se marca positivamente con el Anticuerpo NHK 1, lo que indica su origen neuroectodérmico.
  
6. En el periodo fetal temprano, la glándula sublingual mayor tiene un crecimiento intenso caudo, dorso, lateral diferenciándose su conducto, el estroma y la cápsula.
  
7. En el periodo fetal temprano, las glándulas sublinguales menores están formadas por brotes sólidos conectados con el epitelio oral sin una formación capsular clara.
  
8. Las glándulas sublinguales de los embriones de rata presentan una evolución, en estas fases iniciales del desarrollo, similar al de los embriones humanos, por lo que pueden ser consideradas un buen modelo de estudio. En el futuro, esta similitud embriológica será útil para realizar estudios de regeneración tisular, entender el crecimiento anormal glandular y profundizar en la etiopatogenia y tratamiento de los tumores glandulares.

**BIBLIOGRAFÍA:**

1. ALCALA-SANTAELLA R. Manual de Embriología general y especial. Ediciones Morata. Madrid. 1929.
2. AMANO O, MIZOBE K, BANDO Y, SAKIYAMA K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: -overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop-. Acta Histochem Cytochem. 2012 Oct 31;45(5):241-50.
3. ANDERSEN C. Manual de Histología y Embriología. Librería y Editorial “el Ateneo”. Barcelona 1942.
4. ARRAEZ AYBAR LA. Análisis morfo-diferenciativo del complejo epitelial submandibular. Tesis Doctoral. Madrid. 1991.
5. AURE MH, LARSEN HS, RUUS AK, GALTUNG HK. Aquaporin 5 distribution pattern during development of the mouse sublingual salivary gland. J Mol Histol. 2011 Oct; 42(5):401-8.
6. BALL WD. Development of the rat salivary glands. 3. Mesenchymal specificity in the morphogenesis of the embryonic submaxillary and sublingual glands of the rat. J Exp Zool. 1974 Jun; 188(3):277-88.

- 
7. BANERJEE SD, COHN RH, BERNFIELD MR. Basal lamina of embryonic salivary epithelia. Production by the epithelium and role in maintaining lobular morphology. *J Cell Biol.* 1977; 73: 445-463.
  8. BARTHOLIN C (1685).Citado por SAPPEY. *Traité d'Anatomie descriptive.* 2<sup>a</sup> ed. Tomo IV. Paris. 1874
  9. BORCHESE E. The development in vitro of the submandibular and sublingual glands of *Mus musculus*. *J Anat.* 1950 Jul; 84(3):287-302.
  10. BORNET C. Sublingualite chronique. Etude anatomo-clinique, a propos de 12 cas. Thèse doctorale. R. Foulon, editeur. 1963.
  11. BRACHET A. *Traité d' Embryologie des vertébrés.* 2<sup>a</sup> ed Masson. Edit. Paris. 1935.
  12. CANNON K. Inducing epithelial morphogenesis in human salivary acinar-like cells cultured in 3D Hyaluronic acid, laminin-modified hydrogels. Spring. 2015.
  13. CECCHINI MP, PARNIGOTTO M, MERIGO F, MARZOLA P, DADUCCI A, TAMBALO S, BOSCHI F, COLOMBO L, SBARBTI A. 3D printing of rat salivary glands: The submandibular-sublingual complex. *Anat Histol Embryol.* 2014 Jun;43(3):239-44.

- 
14. CELESTINO DA COSTA, A. Elementos de Embriología. Librería Hachette. Buenos Aires. 1942.
  15. CHAI Y, MAXSÓN RE. Recent Advances in Craniofacial Morphogenesis. *Dev Dyn.* 2006; 235: 2353-2375.
  16. CHI JG. Prenatal development of human major salivary glands. Histological and immunohistochemical characteristics with reference to adult and neoplastic salivary glands. *J Korean Med Sci.* 1996 Jun; 11(3): 203-16.
  17. CHIARUGI G. Tratado de Embriología. Parte cuarta. Societa Editrice-libraria. Milán. 1940.
  18. CHURCHILL JA. Morris's treatise on Anatomy. 5ª ed. CM Jackson. ed. London. 1914.
  19. CUNEO B., BEAU V. Pathogénie de la grenouillette sublinguale commune. 1902. *Presse Med.* 11 (1-23).
  20. CUTLER LS. Intercellular contacts at the epithelial-mesenchymal interface of the developing rat submandibular gland in vitro. *J Embryol Exp Morphol.* 1977; Jun 39: 71-77.

- 
21. CUTLER LS. The dependent and independent relationships between cytodifferentiation and morphogenesis in developing salivary gland secretory cells. *Anat Rec.* 1980; Mar 196 (3): 341-347.
22. CUTLER LS, CHAUNDRY AP. Cytodifferentiation of the acinar cells of the rat submandibular gland. *Dev Biol.* 1974; 41: 31-41.
23. CUTLER LS, CHAUNDRY AP. Intercellular contact at the epithelial-mesenchymal interface during the prenatal development of the rat submandibular gland. *Dev Biol* 1973; 33: 229-240.
24. CUTLER LS, GERMSKI W. Epithelial-mesenchymal interactions in the development of salivary glands. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(1):1-12.
25. DE MOERLOOZE L, SPENCER-DENE B, REVEST J, HAJIHOSSEINI M, ROSEWELL I, DICKSON C. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2(FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development.* 2000; 127: 483-492.
26. DENNY PC, BALL WD, REDMAN RS. Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(1):51-75.
27. DOZIN A. Introduction à l'étude de la morphogenèse des glandes sous-maxillaires et sublinguales chez l'embryon humain. *Arch Biol.* 1965; 75: 459-610.

- 
28. DUBREVIL G. Leçons d'Embryologie Humaine. Vigo-Frères, editeurs. Paris. 1929.
29. ERICSSON CA, PERRIS R. The role of cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest. *Dev Biol.* 1993; 159: 60-74.
30. FERREIRA JN, HOFFMAN MP. Interactions between developing nerves and salivary glands. *Organogenesis.* 2013; 3: 199-203.
31. FISCHER A. Compendio de Embriología humana. Editorial Labor. Barcelona. 1935.
32. GENIS JM. Biología del Desarrollo. Editorial Espasa. Barcelona. 1969.
33. GIROUD J, LE-LIEVRE A. Eléments d' Embryologie. Le François, edit. Paris. 1960.
34. GRESIK WE, KOYAMA N, HAYASHI T, KASHIMATA M. Branching morphogenesis in the fetal mouse submandibular gland is codependent on growth factors and extracellular matrix. *J Med Invest.* 2009; 56: 228-33.

- 
35. GROBSTEIN C. Epithelio-mesenchymal specificity in the morphogenesis of mouse submandibular rudiments in vitro. *J. Exp. Zool.* 1953; 124: 383-414.
36. GROBSTEIN C, COHEN J. Collagenase: effect on the morphogenesis of embryonic salivary epithelium in vitro. *Science* 1965; 150: 626-628.
37. HAARA O, FUJIMORI S, SCHMIDT-ULLRICH R, HARTMANN C, THESLEFF I, MIKKOLA ML. Ectodysplasin and Wnt pathways are required for salivary gland branching morphogenesis. *Development.* 2011; 138:2681–91.
38. HAARA O, KOIVISTO T. EGF-receptor regulates salivary gland branching morphogenesis by supporting proliferation and maturation of epithelial cells and survival of mesenchymal cells. *Differentiation.* 2009 Mar; 77(3): 298-306.
39. HAMILTON WJ, MOSSMAN HW. *Embriología Humana.* 4ª edición. Intermédica. Buenos Aires. 1975.
40. HARUNAGA J, HSU JC, YAMADA KM. Dynamics of salivary gland morphogenesis. *J Dent Res.* 2011 Sep; 90(9): 1070-7.

- 
41. HASHIZUME A, HIEDA Y. Hedgehog peptide promotes cell polarization and lumen formation in developing mouse submandibular gland. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 339 (3): 996-1000.
42. HOFFMAN MP, KIDDER BL, STEINBERG ZL, LAKHANI S, HO S, KLEINMAN HK, LARSEN M. Gene expression profiles of mouse submandibular gland development: FGFR1 regulates branching morphogenesis in vitro through BMP and FGF dependent mechanisms. *Development* 2002; 129: 5767-5778.
43. HOLSINGER FC, BUI DT. Anatomy, Function, and Evaluation of the Salivary Glands. In *Salivary Gland Disorders* (pp. 1-16). Springer Berlin Heidelberg. 2007.
44. JASKOLL T, ABICHABEKER G, WITCHER D, SALA FG, BELLUSCI S, HAJIHOSSEINI MK, MELNICK M. FGF10/FGFR2b signaling plays essential roles during in vivo embryonic submandibular salivary gland morphogenesis. *BMC Dev Biol*. 2005; 22: 5-11.
45. JASKOLL T, LEO T, WITCHER D, ORMESTAD M, ASTORGA J, BRINGAS P JR, CARLSSON P, MELNICK M. Sonic hedgehog signaling plays an essential role during embryonic salivary gland epithelial branching morphogenesis. *Dev Dyn*. 2004; 229(4): 722-32.

- 
46. JASKOLL T, MELNICK M. Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF- $\alpha$ /EGF, IGF, TGF- $\beta$ , TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, and EGF-r null mutations. *Anat Rec.* 1999; 256(3): 252-68.
47. JASKOLL T, WITCHER D, TORENO L, BRINGAS P, MOON AM, MELNICK M. FGF8 dose-dependent regulation of embryonic submandibular salivary gland morphogenesis. *Dev Biol.* 2004; 268(2): 457-69.
48. JASKOLL T, ZHOU YM, CHAI Y, MAKARENKOVA HP, COLLINSON JM, WEST JD, ET AL. Embryonic submandibular gland morphogenesis: stage-specific protein localization of FGFs, BMPs, Pax6 and Pax9 in normal mice and abnormal SMG phenotypes in *FgfR2-IIIc(+/\Delta)*, *BMP7(-/-)* and *Pax6(-/-)* mice. *Cells Tissues Organs.* 2002; 170:83–98.
49. JASKOLL T, ZHOU YM, TRUMP G, MELNICK M. Ectodysplasin receptor-mediated signaling is essential for embryonic submandibular salivary gland development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003 Apr; 271(2): 322-31.
50. JOHNS ME. The Salivary Glands: Anatomy and Embryology. *Otolaryngol Clin North Am.* 1977 Jun; 10(2): 261-71.

- 
51. KANNO Y, SASAKI Y, SHIBA Y. Effects of denervation on cell to cell communication between acinar cells of rat submandibular salivary gland. *Archs Oral Biol.* 1987; 32: 43-46.
52. KASHIMATA M, GRESIK EW. Contemporary approaches to the study of salivary gland morphogenesis. *Eur J Morphol.* 1996; 34: 143-147.
53. KOYAMA N, KASHIMATA M, SAKASHITA H, SAKAGAMI H, GRESIK EW. EGF-stimulated signaling by means of PI3K, PLCgamma1, and PKC isozymes regulates branching morphogenesis of the fetal mouse submandibular gland. *Dev Dyn.* 2003; 227: 216-226.
54. KNOX SM, LOMBAERT IM, REED X, VITALE-CROSS L, GUTKIND JS, HOFFMAN MP. Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis. *Science.* 2010; 329 (5999): 1645–1647.
55. KNOSP WM, KNOX SM, HOFFMAN MP. Salivary gland organogenesis. *Dev Biol.* 2012; 1: 69-82.
56. KUMAGAI M, SATO I. Immunolocalization of fibronectin and collagen types I and III in human fetal parotid and submandibular glands. *Cells Tissues Organs.* 2003;173(3): 184-90.

- 
57. KUSAKABE M, SAKAKURA T, SANO M, NISHIZUKA Y. A pituitary-salivary mixed gland induced by tissue recombination of embryonic pituitary epithelium and embryonic submandibular gland mesenchyme in mice. *Dev Biol.* 1985; 110: 382-91.
58. KWON HR, NELSON DA, DESANTIS KA, MORRISSEY JM, LARSEN M. Endothelial cell regulation of salivary gland epithelial patterning. *Development.* 2017; 144(2): 211-220.
59. LAWSON KA. The role of mesenchyme in the morphogenesis and functional differentiation of rat salivary epithelium. *J Embryol Exp. Morph.* 1972; 27(3): 497-513.
60. LEE SK, LIM CY, CHI JG, YAMADA K, HASHIMURA K, KUNIKATA M, MORI M. Prenatal development of human major salivary glands and immunohistochemical detection of keratins using monoclonal antibodies. *Acta Histochem.* 1990; 89(2): 213-35.
61. LEESON CR, BOOTH, WG. Histological, histochemical and electron microscopic observations on the postnatal development of the major sublingual gland of the rat. *J Dent Res.* 1961; 40: 838-845.

- 
62. LOMBAERT IM, KNOX SM, HOFFMAN MP. Salivary gland progenitor cell biology provides a rationale for therapeutic salivary gland regeneration. *Oral Dis.* 2011; 17: 445-449.
63. MARTINEZ-MADRIGAL F, MICHEAU C. Histology of the Major Salivary Glands. *Am J Surg Pathol.* 1989; 13 (10): 879-899.
64. MATERAZZI G, VITAIOLI L, MENGHI G. Histochemical aspects of the submandibular and sublingual glands of rats during pre- and post-natal development. *Riv Biol.* 1973; 66(3): 215-27.
65. MATSUMOTO K, YOSHITOMI H, ROSSANT J, ZARET KS. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science.* 2001; 294(5542): 559-63.
66. MELNICK M, JASKOLL T. Mouse submandibular gland morphogenesis is a paradigm for embryonic signal processing. *Crit Rev Oral Biol.* 2000; 11: 199–215.
67. MELNICK M, PHAIR RD, LAPIDOT SA, JASKOLL T. Salivary gland branching morphogenesis: a quantitative systems analysis of the Eda/Edar/NFkB paradigm. *BMC Dev Biol.* 2009; 6: 9-32.

- 
68. MÉRIDA-VELASCO JA, SÁNCHEZ-MONTESINOS I, ESPÍN-FERRA J, GARCÍA-GARCÍA JD, GARCÍA-GÓMEZ S, ROLDAN-SHILING V. Development of the human submandibular salivary gland. *J Dent Res.* 1993; 72(8): 1227-32.
69. MÉRIDA VELASCO JR, DE LA CUADRA BLANCO C, MÉRIDA VELASCO JA. Development of the juxta oral organ in rat embryo. *Anat Rec.* 2012; 295: 769-775.
70. MICHAELIS L. *Embriología Humana*. Editorial Labor. Barcelona. 1929.
71. MOORE KL, PERSAUD TVN, TORCHIA MG. *Embriología Clínica* 9ª edición 2013. Barcelona. Saunders, Elsevier. 2013.
72. MORAL 1915. Citado por RODRIGUEZ VAZQUEZ MC (1987): Origen y desarrollo de la glándula salival sublingual humana. Granada. 1987.
73. MORRIS-KAY G, RUBERTE E, FUKIISHI Y. Mammalian neural crest and near crest derivatives. *Ann Anat.* 1993; 175: 501-507.
74. MURAKAMI M, NAGATO T, TANIOKA H. Effect of parasympathectomy on the histochemical maturation of myoepithelial cells of the rat sublingual salivary gland. *Arch Oral Biol.* 1991; 36(7): 511-7.

- 
75. MURAKAMI M, NAGATO T, TANIOKA H. Morphological changes in the myoepithelial cells of the rat sublingual salivary gland during differentiation as shown by the nitrobenzoxadiazole-phalloidin fluorescent method. *Arch Oral Biol.* 1989; 34(2): 143-5.
76. NAGLER RM, BAUM BJ. Prophylactic treatment reduces the severity of xerostomia following radiation therapy for oral cavity cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 129 (2): 247-250.
77. NAKANISHI Y, UEMATSU J, TAKAMATSU H, FUKUDA Y, YOSHIDA K. Removal of Heparan Sulfate Chains Halted Epithelial Branching Morphogenesis of the Developing Mouse Submandibular Gland in vitro. *Develop Growth Differ.* 1993; 35 (4): 371-384.
78. NARBAITZ R. Embriología. 3ª edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. 1973.
79. NEDVETSKY PI, EMMERSON E, FINLEY JK, ETTINGER A, CRUZ-PAHCECO N, PROCHAZKA J, HADDOX CL, NORTHRUP E, HODGES C, MOSTOY KE, HOFFMAN MP, KNOX SM. Parasympathetic innervation regulates tubulogenesis in the developing salivary gland. *Dev Cell.* 2014; 30(4): 449-62.

- 
80. ONO H, OBANA A, USAMI Y, SAKAI M, NOHARA K, EGUSA H, SAKAI T. Regenerating Salivary Glands in the Microenvironment of Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:293570.
81. O'RAHILLY R, MÜLLER F. Developmental Stages in human embryos: revised and new measurements. *Cells Tissues Organs.* 2010; 192 (2): 73-84.
82. ORTS LLORCA F. Anatomía Humana. Tomo II. 4ª edición. Editorial científico-médica. Barcelona. 1972.
83. PATEL VN, HOFFMAN MP. Salivary gland development: a template for regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2014; 25-26: 52-60.
84. PATEL VN, REBUSTINI IT, HOFFMAN MP. Salivary gland branching morphogenesis. *Differentiation.* 2006; 74: 349-364.
85. PATEL N, SHARPE PT, MILETICH I. Coordination of epithelial branching and salivary gland lumen formation by Wnt and FGF signals. *Dev Biol.* 2011; 358: 156–67.
86. PATTEN BM. Embriología humana. 2ª edición. El Ateneo. Barcelona 1953.

- 
87. POIRIER J., COHEN I, BAUDET J.. Embriología humana. Editorial Marbán. Madrid. 1974.
88. POSPISILOVA-ZUZAKOVA V. Differentiation of the large salivary glands of the rat. *Folia Morphol.* 1973; 21(4): 404-5.
89. PROCTOR GB, CARPENTER GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci.* 2007; 133 (1): 3-18.
90. QUIROS L. Desarrollo embriológico de la glándula submandibular. Tesis Doctoral. Madrid. 2015.
91. RAFII S, BUTLER JM, DING BS. Angiocrine functions of organ specific endothelial cells. *Nature* 2016; 529: 316-325.
92. REDMAN RS, BALL WD. Cytodifferentiation of secretory cells in the sublingual gland of the prenatal rat: a histological, histochemical and ultrastructural study. *Am J Anat.* 1978; 153(3): 367-89.
93. REDMAN RS, SREEBNY LM. Morphologic and biochemical observations on the development of the rat parotid gland. *Develop Biol* 1971; 25: 248-279.

- 
94. RIVINIUS A (1679). Citado por SAPPEY. *Traité d'Anatomie descriptive*. 2ª ed. Tomo IV. Paris. 1874
95. RODRIGUEZ MC. Origen y desarrollo de la glándula salival sublingual humana. [Tesis Doctoral]. Granada: Editorial Universidad de Granada; 1987.
96. ROTHOVA M, THOMPSON H, LICKERT H, TUCKER AS. Lineage tracing of the endoderm during oral development. *Dev Dyn*. 2012; 241(7): 1183-91.
97. RYU YK, COLLINS SE, HO HY, ZHAO H, KURUVILLA R. An autocrine Wnt5a-Ror signaling loop mediates sympathetic target innervation. *Dev Biol*. 2013; 377(1): 79-89.
98. SAKAKURA T, NISHIZUKA Y, DAWE CJ. Mesenchyme-dependent morphogenesis and epithelium-specific cytodifferentiation in mouse mammary gland. *Science*. 1976; 194 (4272): 1439-41.
99. SAKAI T, LARSEN M, YAMAMADA KM. Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature*. 2003; 423: 876-881.
100. SHOENWOLF G, BLEYL S, BRAUER P, FRANCIS-WEST P. *Larsen's Human Embryology*. Elsevier. 2014.

- 
- 101.SIMIAN M, HIRAI Y, NAVRE M, WERB Z, LOCHTER A, BISSELL MJ.  
The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 2001; 128: 3117-3131.
- 102.SERRANO CUENCA V. Horario morfogenético de la glándula submandibular. Embriones humanos de 12 a 15 mm. Estadíos 17 a 22 de O'Rahilly. Tesis Doctoral. Madrid. 1983.
- 103.SOLERE M, HAEGEL P. Embriología. Cuadernos prácticos. Teray-Masson. Barcelona 1969.
- 104.SPOONER BS, WESSELLS NK. An analysis of salivary gland morphogenesis: role of cytoplasmic microfilaments and microtubules. *Dev Biol* 1972; 27: 38-54.
- 105.STEINBERG Z, MYERS C, HEIM VM, LATHROP CA, REBUSTINI IT, STEWART JS, LARSEN M, HOFFMAN MP. FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development*. 2005; 132: 1223-1234.
106. SUDLER, MT. The development of the nose and the pharynx and its derivatives in man. *Amer J Anat*. 1902; 1: 391-416.

- 
107. SZYMANSKA, Z. The embryonic development of the submandibular and sublingual salivary glands in the white rat. *Acta Theriol.* 1963; 7: 25-31.
108. TAGA R, SESSO A. Postnatal development of the rat sublingual glands. A morphometric and radioautographic study. *Arch Histol Cytol.* 1998; 61(5): 417-26.
109. TAKAHASHI Y, NOGAWA H. Branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in basement membrane-like substratum separated from mesenchyme by the membrane filter. *Development.* 1991; 111(2): 327-35.
110. TESTUT L, JACOB O. *Traité d' Anatomie topographique.* Doin. Ed. Paris. 1914.
111. TESTUT L, TORNEUX F. *Embryologie humaine.* Doin. Ed. Paris. 1921.
112. THOMPSON HA, SPOONER BS. Proteoglycan and glycosaminoglycan synthesis in embryonic mouse salivary glands: effects of beta-D-Xyloside, an inhibitor of branching morphogenesis. *J Cell Biol* 1983; 96: 1443-1450.

- 
113. TUCKER AS. Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18: 237-244.
114. TUCKER AS, MILETICH I. Salivary Glands. Development, adaptations and disease. *Frontiers of Oral Biology.* Editorial: Karger. 2010.
115. TYLER MS, KOCH WE. In vitro development of palatal tissues from embryonic mice. Interactions between palatal epithelium and heterotypic oral mesenchyme. *J Embryol Exp Morph* 1977; 38: 37-48
116. VELAZQUEZ G. Morfogénesis de la glándula salivar submandibular en el embrión humano. Tesis Doctoral. Madrid. 1952.
117. VIGNOLI J. Manual de Embriología Humana. Salvat. Barcelona. 1926
118. WELLS KL, GAETE M, MATALOVA E, DEUTSCH D, RICE D, TURKER SA. Dynamic relationship of the epithelium and mesenchyme during salivary gland initiation: the role of Fgf10. *Biology Open.* 2013; 9: 981-9
119. WOLFF MS, MIRELS L, LAGNER J, HAND AR. Development of the rat sublingual gland: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *Anat Rec.* 2002; 266(1): 30-42.

- 
120. YAMADA A, FUTAGI M, FUKUMOTO E, SAITO K, YOSHIZAKI K, ISHIKAWA M, ARAKAKI M, HINO R, SUGAWARA Y, ISHIKAWA M, NARUSE M, MIYAZAKI K, NAKAMURA T, FUKUMOTO S. Connexin 43 is necessary for salivary gland branching morphogenesis and FGF10-induced ERK1/2 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2016; 291(2): 904-12.
121. YAMAMOTO S, FUKUMOTO E, YOSHIZAKI K, IWAMOTO T, YAMADA A, TANAKA K, SUZUKI H, AIZAWA S. Platelet-derived growth factor receptor regulates salivary gland morphogenesis via fibroblast growth factor expression. *J Biol Chem* 2008; 283 (34): 23139-49.
122. YOUNG JA, VAN LENNEP EW. The morphology of the salivary glands. Academic Press. London. 1978.