

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

ESTUDIOS FUNCIONALES EN LA HIPERTROFIA
DE LAS GLANDULAS SALIVALES

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR

JOSE FIDEL MARQUEZ AVILES

PREVIA OPCION AL TITULO DE

DOCTOR EN CIRUGIA DENTAL

MAYO DE 1969



T
677.316
M 357e
1969
F.O.
G-4

N1566

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10123713

U N I V E R S I D A D D E E L S A L V A D O R

R E C T O R

DR. JOSE MARIA MENDEZ

SECRETARIO

DR. JOSE RICARDO MARTINEZ

F A C U L T A D D E O D O N T O L O G I A

D E C A N O

DR. JULIO EDUARDO MENDEZ

SECRETARIO

DR. RICARDO ACEVEDO

D O C T O R A M I E N T O P U B L I C O

PRESIDENTE

DR. JOSE JOAQUIN PARR S.

PRIMER VOCAL

DR. JUAN RAMON ALVARENGA

SEGUNDO VOCAL

DR. MAYO LEOPOLDO CUENCA

D E D I C A T O R I A

Dedico esta Tesis y el Acto de mi doctoramiento:

A mis padres:

Fidel Márquez h.

y

Cristina Avilés de Márquez

A mis hermanos:

Nila, José Raúl y Mario Roberto

Muy cordialmente:

A mis profesores, Compañeros y Amigos.

A G R A D E C I M I E N T O

Al doctor José Ricardo Martínez, por haber sido el Maestro que me inició en la disciplina del estudio de la glándula-salival y en la técnica de la micropunción, por haber asesorado y supervisado el desarrollo del presente estudio y haberme facilitado los medios que hicieron posible la realización del presente trabajo.

Al doctor Juan Ramón Alvarenga, de manera especial, por su valiosa contribución en la realización del estudio histórico-químico de este trabajo.

C O N T E N I D O

I - INTRODUCCION

II - MATERIALES Y METODOS

III- RESULTADOS

IV - DISCUSION

V - BIBLIOGRAFIA

I N T R O D U C C I O N

Las glándulas salivales y su producto de secreción, la saliva, han sido investigadas desde hace mucho tiempo. Galeno en su obra "De Usu Partum" señala y describe la situación de las glándulas salivales mayores y su desembocadura en la cavidad oral. Probablemente esta sea la referencia más antigua que pueda encontrarse en la literatura. Desde entonces han sido motivo de las más diversas investigaciones. Se encuentran referencias como la descripción anatómica efectuada por Vesalius, en 1543, que puede considerarse como la primera en su género. Posteriormente diversos anatomistas establecieron la existencia de los conductos glandulares, que fueron llamados con los nombres de sus descubridores: Stenon, Wharton y Rivinus. Ya entonces se comenzó a especular que estos conductos, además de servir como medio de transporte, desempeñaban otras funciones, posibilidad que fué considerada en 1883 por Merkel, quien estableció principalmente los fundamentos morfológicos, y en 1886 por Werther quien efectuó una investigación comparativa de la concentración de sales en varios tipos de saliva.

Bernard (1856) y Heindenhain (1868) reprodujeron las investigaciones de Graaf, las cuales consistían en la preparación de fístulas pancreáticas y submaxilares. Estos experimentos fueron más extensamente desarrollados por Pavlov, quien los llevó a su más alta expresión cuando estudió los efectos del sistema nervioso sobre las secreciones del tubo digestivo (2).

Es también interesante mencionar otros experimentos efectuados por Bernard en 1852, en los que comprobó que el estímulo -

de la cuerda del tímpano ejercía un efecto vasodilatador sobre la glándula submaxilar, siendo éste uno de los mejores ejemplos de un efecto vascular mediado neurológicamente (25). Posteriormente, en 1851, Ludwing había comprobado experimentalmente la existencia de un control nervioso para la secreción salival.

Con el advenimiento de la Bioquímica se hicieron posibles los estudios sobre composición salival, efectuándose determinaciones en muestras humanas y de distintas especies animales, bajo diferentes condiciones experimentales. Estas mismas técnicas han sido la base para ensayos posteriores, con el objeto de observar la influencia de diferentes fármacos sobre la composición salival y los mecanismos de intercambio de electrólitos que se producen a través de las paredes de los conductos.

Los estudios histoquímicos han contribuído también a esclarecer y comprobar los resultados de los trabajos mencionados(23)

Recientemente, y mediante técnicas de micropunción, se han efectuado análisis sobre composición electrolítica de secreción salival a nivel alveolar, y se comprobó que las secreciones sufrían modificaciones a través de su paso por los conductos, hasta su desembocadura en la cavidad oral (9-16-17).

En los estudios realizados se ha empleado diversos estímulos como son: mecánicos (32), gustatorios (32), farmacológicos (8-26) y estímulo directo a los troncos nerviosos que inervan estas glándulas (24-26). Dependiendo del tipo de estímulo empleado, se han reportado variaciones en la concentración de los diversos constituyentes, como lo demuestra Mason y col. (18), quienes recolectaron muestras de saliva bajo diferentes estímulos, lle -

gando a establecer que la concentración de los constituyentes salivales varía según el flujo de saliva; que existe una relación entre las concentraciones de los constituyentes salivales y su concentración en el plasma; y que hay posibilidades de variaciones durante el día (18).

Es también importante mencionar un nuevo enfoque, que en los últimos años se ha dado a la investigación de las glándulas salivales: la Mucoviscidosis o Enfermedad Fibroquística del Páncreas es una enfermedad crónica hereditaria que afecta a los niños, adolescentes y adultos jóvenes; en la que existe una disfunción generalizada del sistema glandular exocrino (6-14). La etiología de la enfermedad es aún desconocida, aunque la hipótesis más generalizada es que se debe a un error innato del metabolismo transmitido como un carácter mendeliano recesivo.

La enfermedad se manifiesta en forma de algunas anomalías, aparentemente poco relacionadas entre sí, entre las que se encuentran principalmente una conducta fisicoquímica anormal de las secreciones mucosas en muchas partes del cuerpo; una marcada elevación en las concentraciones de cloro, sodio y potasio en sudor y algo menos intensa en saliva; un aumento en algunos constituyentes enzimáticos y orgánicos (entre estos últimos: proteínas, glicoproteínas y mucopolisacáridos); así como también en los niveles de calcio y fósforo en la saliva submaxilar, y anomalías muy sugestivas en la función del sistema nervioso autónomo (6).

Las anormalidades en las glándulas salivales se manifiestan, principalmente, sobre las glándulas mayores y las labiales.

Con respecto a la parótida, hay datos de un aumento del flujo secretorio acompañado de alteraciones en la concentración de sodio, potasio y cloro; incluso este aumento ha llegado a tomarse como una posible medida de la actividad del Sistema Nervioso Autónomo, ya que frecuentemente se ha supuesto que éste puede en alguna forma estar comprendido en la producción de los defectos asociados con la Fibrosis Quística (6-11).

En 1959 y 1960, Wells y col. (36-37) reportaron que la amputación de incisivos inferiores en ratas, producía a las 24 horas un aumento en el peso de las glándulas salivales y lo atribuyeron a una hipertrofia de las células alveolares. Este aumento en el peso de las glándulas fué confirmado en cobayos por los estudios de Parr Sánchez (20), Campos (3) y Martínez (15). Posteriormente en 1961, Wells, Handelman y Milgram (35) sugirieron que esta respuesta era producida por el Sistema Nervioso Simpático, el cual es también responsable de la regulación del crecimiento y tamaño de las glándulas salivales.

En 1963, Handelman y Wells (7), efectuaron un examen morfológico más detallado de las glándulas hipertrofiadas por amputación y de las atrofiadas por administración de Dibenamina. Para este estudio emplearon una variedad de técnicas histoquímicas con objeto de caracterizar los cambios morfológicos fundamentales de este mecanismo. Con los resultados obtenidos comprobaron que las glándulas mostraban un marcado aumento en el tamaño de

las células alveolares, que el núcleo y nucleolo alveolar estaban también aumentados y no se observaban alteraciones mitóticas. De esto concluyeron que el aumento de las glándulas que seguía a la amputación de incisivos era debido a una hipertrofia altamente específica de las células alveolares de las glándulas submaxilar y sublingual; que el tamaño de los túbulos y conductos no era afectado por este procedimiento, aunque los túbulos mostraban una disminución de la pironina positiva. Las células alveolares hipertrofiadas, así como sus núcleos y nucleolos, presentaban un aumento en el contenido de RNA, lo cual es probablemente el reflejo de una síntesis acelerada de proteínas. Las células alveolares atrofiadas se mostraron casi desprovistas de su contenido de RNA. De estos resultados se interpretó que los cambios en el contenido de RNA eran el reflejo del grado de síntesis proteínica.

La investigación con respecto al análisis del defecto básico en la Mucoviscidosis se ha concretado a tres áreas principales: 1 - Las disfunciones del Sistema Nervioso Autónomo; 2 - Anormalidades en el metabolismo de las proteínas; y 3 - Alteraciones marcadas en el transporte de electrólitos (Na y K).

En el presente trabajo se reportan los resultados de la concentración de electrólitos (Na y K) y proteínas totales (Albúminas y globulinas), complementadas con un estudio histoquímico, en tejido y secreción de glándulas salivales de cobayos normales e hipertrofiados por amputación de incisivos inferiores.

El propósito de este estudio fué el de reproducir en animales un estado de disfunción salivar que se asemejara al de la -

enfermedad en humanos. La hipertrofia es producida por mediadores del Sistema Nervioso Autónomo, tal como se ha sugerido para la mucoviscidosis, y se caracteriza por alteraciones en la síntesis protéica, al igual que en la enfermedad. Pocos estudios existían sobre la secreción de electrolitos en la hipertrofia, pero era de suponerse que esta alteración morfológica estaría acompañada de cambios no sólo en un aspecto funcional (la síntesis protéica) sino en otros como la secreción de electrolitos, sobre todo en vista de evidencias concretas que la cantidad y calidad de las proteínas en la secreción puede afectar la cantidad de electrolitos que contenga.

Si se pudiese establecer, por lo tanto, una relación secuencial entre una alteración entre el nivel de actividad del Sistema Nervioso Autónomo y cambios en la secreción de proteínas y electrolitos en las glándulas hipertrofiadas, se tendría un modelo para la fisiopatología de la Mucoviscidosis.

MATERIALES Y METODOS

I - ANIMALES EXPERIMENTALES:

Se utilizaron un total de 55 cobayos, jóvenes y sanos, de ambos sexos, criados y alimentados en el vivero de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, cuyo peso oscilaba entre 500 y 700 grs., anestesiados con Uretano (Ethil-Carbamato. Merck Sharp & Co., Inc.) en dosis de .007 mgs. por gramo de peso por vía intraperitoneal. Para cada experimento se emplearon grupos controles como referencia.

II - PRODUCCION DE LA HIPERTROFIA:

Para este objeto se procedía a la amputación de los incisivos inferiores de los cobayos a nivel del borde gingival, empleando un disco de carborundum montado en torno dental eléctrico (3-7-15-20-35-36-37).

III - PREPARACION DE TEJIDO Y SECRECION:

a - TEJIDO: Se obtenía el peso de la glándula y ésta se sometía a la deshidratación, colocándola en un horno a 90°C. durante dos horas; la glándula deshidratada era pesada de nuevo, se le agregaba .5 mls. de Acido Sulfúrico 8N. ($\text{SO}_4\text{H}_2.8\text{N}$) y se colocaba nuevamente en el horno, esta vez a 500°C durante cinco minutos para reducirla a cenizas. Se lavaba el crisol con Sterox (STEROX - SE Solution. Hartman - Leddon Co. Phi. Pennsylvania, U.S.A.) y se llevaba a 7 mls. con la misma solución. Este volumen se centrifugaba durante veinte minutos a 1500 rpm. Con el sobrenadante se preparaban diluciones de 1 en 20 para -

sodio y potasio. La determinación de electrolitos se efectuó en un fotómetro de llama.

Para proteínas se pesaba cada glándula y se homogenizaban por separado. De este homogenizado se obtenía la muestra para la determinación por el Método de Biuret Modificado.

b - SECRECION: Después de obtenido el peso y sexo de los cobayos, se anesthesiaban con uretano en la forma citada y previa traqueotomía procedíase a la localización, disección y canulación del conducto de Stenon, empleando tubo de polietileno - PE-50 (Clay-Adams Inc. N.Y.) La secreción era estimulada por medio de una inyección intraperitoneal de 0.1 cc. de pilocarpina al 1%. Se recolectaba un volumen de 0.5 a 1 ml. El tiempo de recolección fué variable de un animal a otro. De la muestra obtenida se efectuaron diluciones de 1 en 500 y 1 en 1000, ambas para sodio y potasio. Para las determinaciones se utilizó un fotómetro de llama.

Para proteínas se obtenía la muestra de saliva en la forma descrita, utilizando un volumen de 0.5 mls.

c - METODO DE HOMOGENIZADO PARA PROTEINAS: Se coloca la glándula en un tubo y se homogeniza con 0.4 mls. de una solución de cloruro de sodio al 8.5% (ClNa-8.5%) llevándola después a volumen de 1 ml. con la misma solución.

IV - METODO DE BIURET MODIFICADO: (1-5-19).

Este método está basado en que las sustancias que contienen dos o más cadenas peptídicas forman un complejo púrpura con las sales de cobre en solución alcalina (1). El término "mejorado o

modificado" se refiere a la adición que se le hace al reactivo de 0.1 grs. % de yoduro de potasio con el objeto de prevenir una excesiva reducción y no tiene un efecto detectable sobre el grado o calidad de color del reactivo.

Para emplear este método y hacerlo útil a los propósitos de esta investigación, fué necesario introducir algunos cambios en la mecánica del mismo, lo que dió por resultado el poder obtener datos más exactos en las mediciones.

Para la lectura del standard se empleó una solución de proteínas standard "Lab-Trol" de la casa Dade Reagents Inc., Miami Fla.

a - REACTIVOS EMPLEADOS:

- 1 - Solución de cloruro de sodio al 8.5%
- 2 - Solución de sulfato de sodio al 22.6%
- 3 - Eter Etílico (calidad reactivo).
- 4 - Standard de proteínas Lab-Trol.
- 5 - Reactivo de Biuret: Pesar 1.5 gramos de sulfato cúprico cristalizado; 6 grs. de tartrato doble de sodio y potasio y 1 gr. de yoduro de potasio; colocar en frasco volumétrico de 1 litro y disolver las sales en 200 mls. de H_2O ; añadir agitando, - 300 mls. de hidróxido de sodio al 10%; llevar a - 1000 mls. con H_2O y mezclar.

b - PROCEDIMIENTO

- 1 - Se colocan en un tubo 0.5 mls. de Lab.-Trol (muestra standard de proteínas) y se lleva a volumen - de 1 ml. con solución de cloruro de sodio al 8.5%.

- De esta solución se utilizan únicamente 0.5 mls.
- 2 - Del homogenizado se toma 0.5 mls. y se añade a la muestra y al standard 9.5 mls. de una solución de sulfato de sodio al 22.6% y se mezclan por inversión.
 - 3 - Inmediatamente después se toman 2 mls. y se transfieren a un tubo de ensayo marcado "P" que indica proteínas totales. Lo mismo se hace con el standard marcándolo con las iniciales "Pst".
 - 4 - Al residuo de 8 mls. de la muestra, se añade 3 mls. de éter y se agita durante 20 segundos para separar las globulinas, cuidando de que el éter, no se proyecte hacia fuera del tubo.
 - 5 - Se dejan 10 minutos en reposo y se llevan a la centrífuga a 1500 rpm. durante 15 minutos.
 - 6 - De los tubos centrifugados, se toman 2 mls. de la fase acuosa y se transfieren a un tubo marcado "A", que significa albúmina de la muestra, cuidando que no penetre al interior de la pipeta líquido sobrenadante, ni parte del botón de globulinas de la interfase.
 - 7 - Blanquet: Se prepara colocando 2 mls. de sulfato de sodio al 22.6% y añadiendo 8 mls. de Reactivo de Biuret, marcándolo con la inicial "B".
 - 8 - Mientras se centrifugan las muestras con éter, se añaden 8 mls. de Reactivo de Biuret a los tubos marcados "P"; se mezclan y dejan en reposo durante

30 minutos y luego se centrifugan a 1500 rpm.
durante 7 minutos.

9 - Se añaden 8 mls. de Reactivo de Biuret a los tu
bos marcados "A", "Ast" y "Pst", dejándolos en re
poso durante 30 minutos.

10 - Se llevan al Colorímetro Coleman y se lee con fil
tro de 540 microondas, ajustando a 100% de trami-
tancia con el blanquet.

La aplicación de este método es similar tanto para homo:
genizado de tejido glandular, como para la muestra de secreción.

R E S U L T A D O S

I - AMPUTACION.

24 horas después de practicar amputación de los incisivos inferiores, a nivel del borde gingival, se encuentra aumento - significativo de peso y tamaño de las glándulas submaxilar y pa - rótida, en relación a animales normales.

El aumento de peso de las glándulas es notorio, pese a que el sujeto experimental sufre un descenso promedio de peso corpo - ral estimado en 51.3 grs. (cuadro II) debido a que la amputa - ción hace difícil la ingestión de alimentos.

Después de someter las glándulas (normales e hipertrofia - das) al proceso de deshidratación, la relación de peso se in - vierte, resultando mayor peso en las glándulas de sujetos norma - les (cuadros I y II), gráficas 1 y 2). Las glándulas submaxilar y parótidas normales experimentan un descenso promedio en el pe - so del 58.7 y 64.7 % respectivamente, mientras que en las glán - dulas hipertrofiadas hay una disminución del 72.7% para las sub - maxilares y del 73% para las parótidas.

II - TEJIDO.

Al investigar en tejido glandular la presencia de electro - litos (Na y K), se encontró que la concentración de potasio es - mayor en sujetos normales que en amputados. Expresado en porcen - taje ésto significa que en las glándulas de los animales amputa - dos los valores de potasio fueron menores que en los normales. - Las submaxilares amputadas experimentaron una disminución del - 16.5% y las parótidas amputadas, 17.3%.

En cuanto a sodio los resultados fueron: a) mayor concentración de sodio en la submaxilar de amputados en una proporción del 15.8%; b) mayor concentración de sodio en la parótida de sujetos normales en una proporción de 20.7%.

Los valores de proteínas totales, expresados en gramos por ciento, fueron más altos en amputados que en normales, según lo manifiestan los resultados de los cuadros 3 y 4.

III - SECRECION.

En secreción los valores de sodio, potasio y proteínas se determinaron únicamente en glándula parótida. En cuanto al volumen/minuto en ul de secreción, no se encontraron variantes importantes entre el grupo normal y el de amputados (cuadros 6 y 8).

La concentración de electrólitos fué: para el sodio mayor concentración en los animales control y para el potasio, mayor concentración en los animales amputados.

Los valores de proteínas totales (albúmina y globulinas) resultaron en proporción inversa que en tejido. Igualmente expresados en gramos por ciento: valores de proteínas totales en mayor concentración en el grupo de animales control.

DETERMINACION DE ELECTROLITOS (Na y K) EN TEJIDO

CUADRO I

COBAYOS NORMALES - PESO SECO

	Peso seco en mgs.	Relac. Peso gl./ Peso cuyo	Concent. Meq/L de Na	Concent Meq./L de K.	Relac. Meq/Na Peso Glandu- dula.	Relación c. Meq./K.c. peso glandu- la	Relac. Meq/Na. con re- lac.pe- so gland. peso cuyo	Relac. Meq/K con re- lac.pe- so gland. peso cuyo	Peso fresco en Mgs.	Relac. Peso fresco gland/ peso cuyo
SD	56.85	.111	11.24	17.44	218.9	325.8	117.4	177.4	127	.296
SI	55.15	.109	10.81	17.93	226.7	354.1	113.6	179.9	148	.279
PD	70.55	.143	16.24	13.89	254.2	227.5	131.8	116.9	203	.386
PI	79.45	.191	16.39	17.11	286.2	283.3	116.7	113.9	216	.414

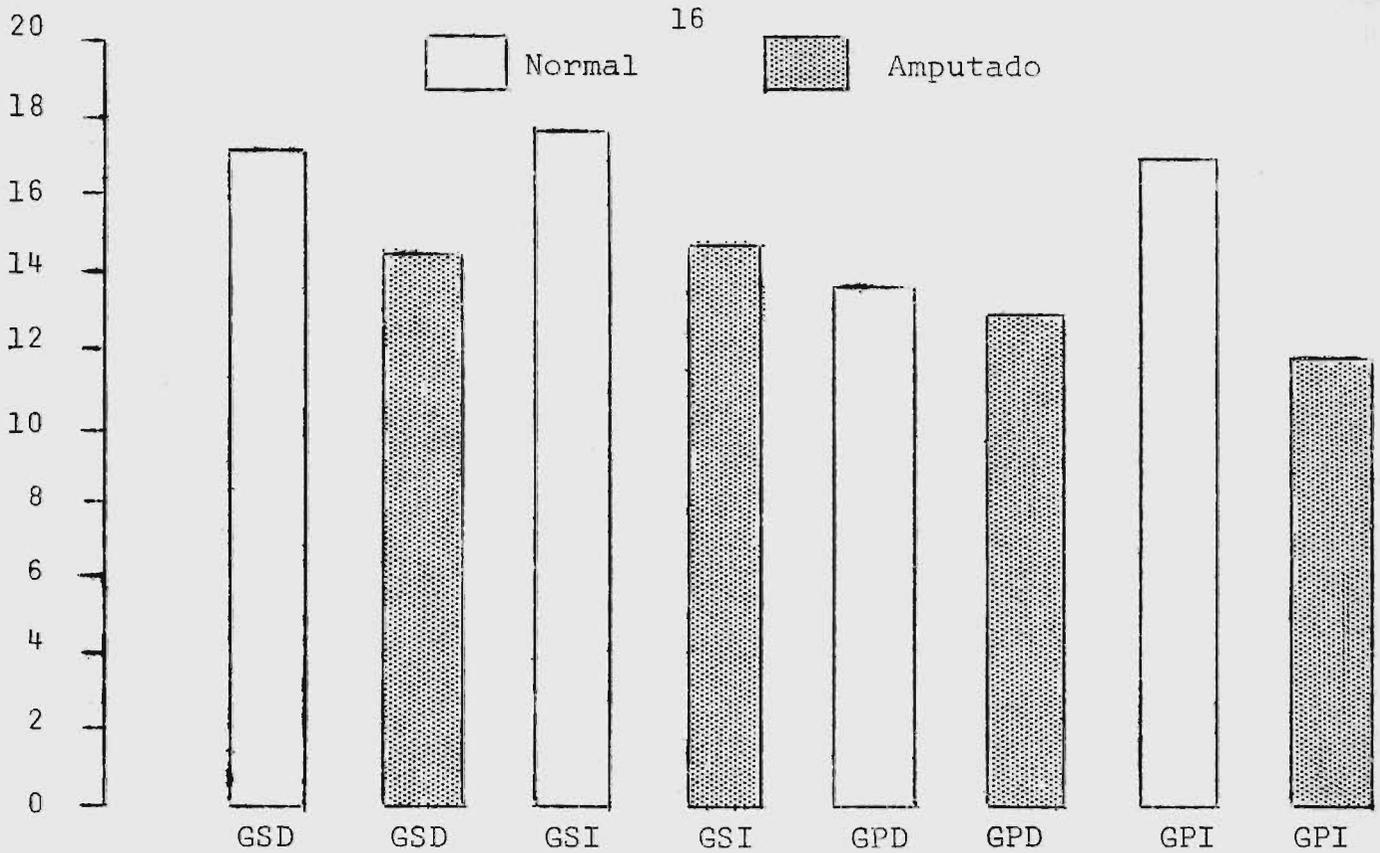
DETERMINACION DE ELECTROLITOS - (Na y K) EN TEJIDO

15

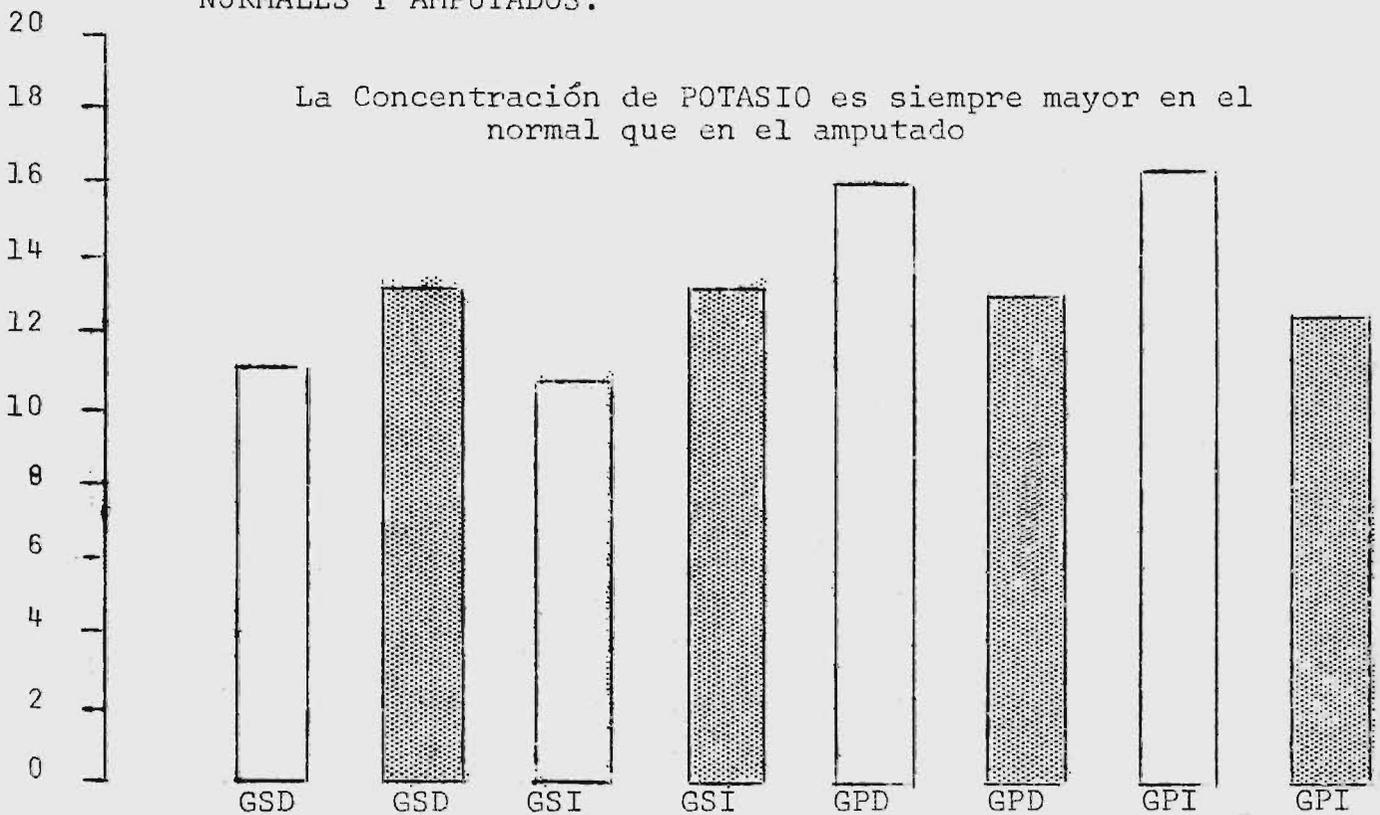
CUADRO No. 2

COBAYOS AMPUTADOS - PESO SECO

		Peso seco en Mgs.	Relac. peso gl./ peso cuyo	Concen tración Meq/L de Na.	Concen tración Meq/L de K.	Relación Meq/Na c. Peso Gl.	Relación Meq/K con Peso Gln.	Relac. Meq/Na con Re lac. \bar{P}_e so Glán/ peso \bar{c}_u	Relac. Meq./K con Re lac. \bar{P}_e so Glán/ peso cuyo	Peso fresco en Mgs.	Relac. Peso Fresco Glán./ Peso cuyo.
SD	49	.100		13.41	14.67	282.3	317.3	146.2	161.7	177	.354
SI	49	.098		13.28	14.86	289.9	337.1	148.0	169.3	182	.366
PD	59	.113		13.25	13.18	254.4	247.2	125.8	126.7	222	.424
PI	61	.119		12.65	12.08	241.0	216.0	119.5	110.8	222	.448

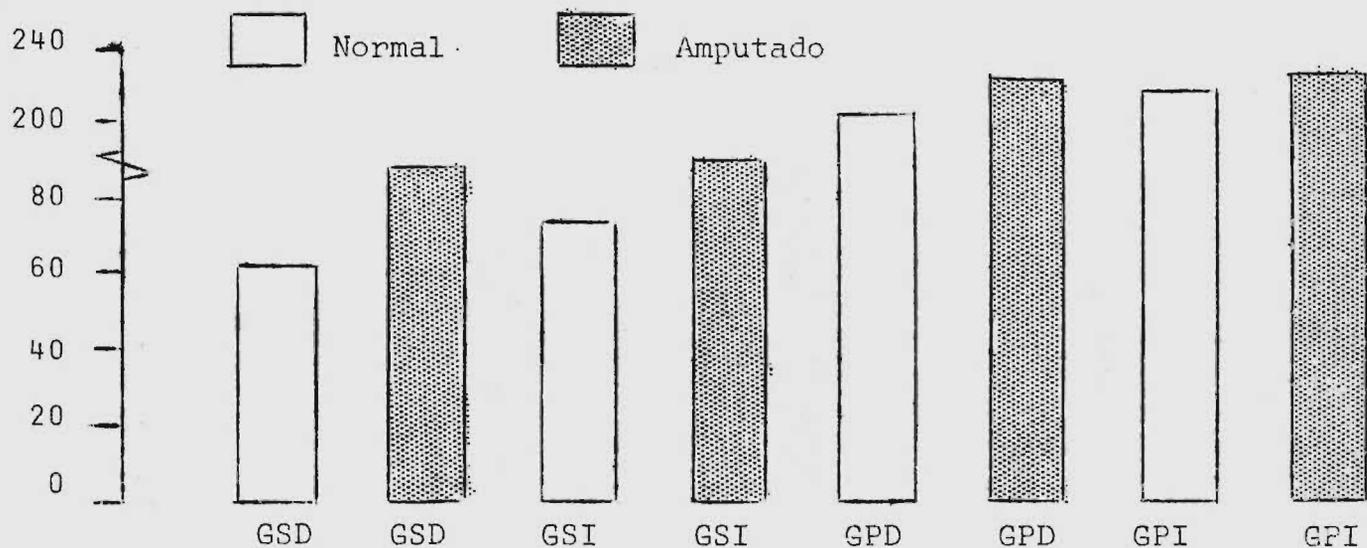


GRAFICAS COMPARATIVAS DE LAS CONCENTRACIONES EN meq/L DE POTASIO Y SODIO EN TEJIDO DE GLANDULAS SALIVALES DE COBAYOS - NORMALES Y AMPUTADOS.

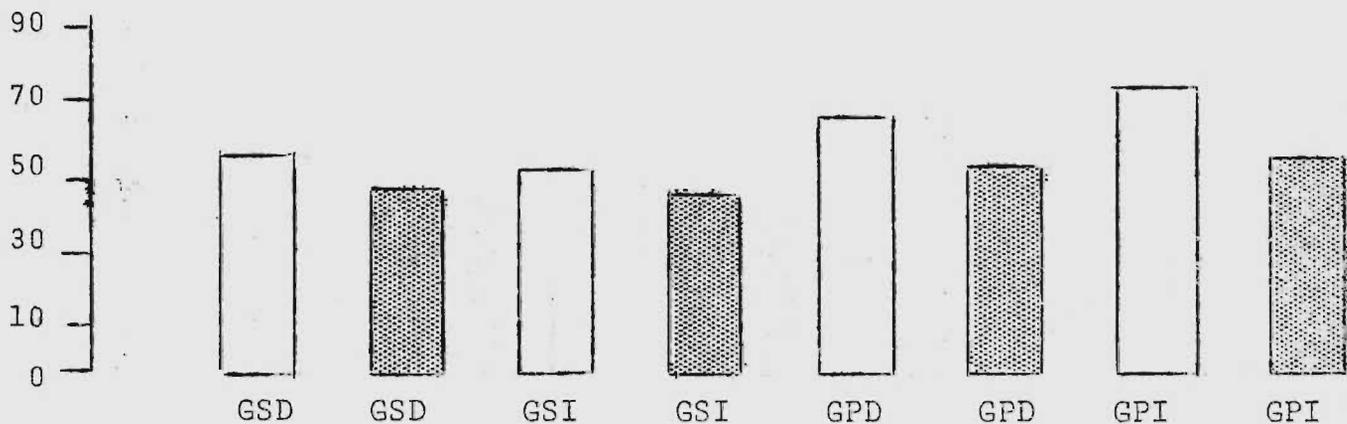


SODIO: Glándula Submaxilar = concentración de sodio mayor en el amputado
 Glándula Parótida = concentración de sodio mayor en normal.

GRAFICAS COMPARATIVAS DEL PESO (FRESCO Y SECO) EM MILIGRAMOS, DE LAS GLANDULAS SALIVALES SUBMAXILAR Y PAROTIDA DE COBAYOS NORMALES Y AMPUTADOS.



Peso Fresco (antes de ser sometidas al proceso de deshidratación): el peso de las glándulas es mayor en los sujetos amputados.



Peso seco (después de sometidas al proceso de deshidratación): en sujetos normales el peso de la glándula es mayor.

PROTEINAS EN TEJIDO

CUADRO No.3

COBAYOS NORMALES					
	Peso fresco en Mgs.	Grs. por ciento Prot. Totales	Grs. por ciento de Albúminas	Grs. por ciento de Globulinas	Relac. Grs. P.T./Grs. Tejidos.
SD	182.4	3.77	1.63	2.13	.210
SI	182.6	3.69	1.48	2.20	.201
PD	160.5	3.06	1.52	1.52	.187
PI	153.5	2.98	1.38	1.60	.201

CUADRO No.4

COBAYOS AMPUTADOS					
	Peso Fresco en Mgs.	Grs. por ciento proteínas totales	Grs. por ciento de albú minas	Grs. por ciento de Globu linas.	Relac. Grs. P.T./Grs. Tejido
SD	200.8	5.70	1.90	3.85	.280
SI	204.6	5.88	2.13	3.76	.283
PD	278.4	6.63	3.79	2.85	.243
PI	272.9	5.65	2.91	2.74	.209

CUADRO No.5

CONCENTRACIONES DE Na y K EN SECRECION DE GLANDULA PAROTIDA DE COBAYOS NORMALES								
		Tiempo de recolección	Volumen en Mls.	Volu _{men} Minu _{to} en ul	Meq/L de Na ⁺	Meq/L de K ⁺	Peso Glándula en grs.	Peso del animal en Grs.
Cobayo 1	PD	35'40"	1	28.2	64	14	.3018	602.6
	PI	45'50"	1	21.9	58	15	.2535	
Cobayo 2	PD	33'	1	30.3	50	14	.2654	634.3
	PI	60'	1	16.6	62	14	.2660	
Cobayo 3	PD	28'15"	1	35.4	62	12	.2783	557.3
	PI	28'15"	1	35.4	72	12	.2110	
Cobayo 4	PD	28'25"	1	35.1	71	13	.3089	501.6
	PI	28'25"	1	35.1	61	12	.3641	
Cobayo 5	PD	43'30"	1	22.9	48	18	.2937	569.1
	PI	43'30"	1	22.9	50	17	.3085	

CUADRO No.6

VALORES PROMEDIO Na-K en COBAYOS NORMALES				
	Volumen Minuto en ul	Meq./L de Na +	Meq./L de K ⁺	Peso Glándula en Grs.
PD	30.4	59	14.2	.2896
PI	26.4	61	14	.2806

CUADRO No.7

CONCENTRACIONES DE Na y K EN SECRECION DE GLANDULA PAROTIDA
DE COBAYOS AMPUTADOS

		Tiempo de re-colección.	Volumen en mls.	Volumen en ul. Minuto	Meq./L Na+	Meq./L K+	Peso Glánd. en Grs.	Peso del animal en grs.
Cobayo 1	PD	19'30"	0.5	25.6	64	12	.3098	476.3
	PI	24'	0.5	20.8	60	12	.3505	
Cobayo 2	PD	17'	0.5	29.4	62	12	.2784	489.4
	PI	17'	0.5	29.4	69	10.5	.3347	
Cobayo 3	PD	20'30"	0.5	24.4	63	19	.3819	594.0
	PI	20'30"	0.5	24.4	64	19	.4088	
Cobayo 4	PD	15'	0.5	33.3	32	21	.4054	589.7
	PI	15'	0.5	33.3	33	24	.3833	
Cobayo 5	PD	7'54"	0.5	62.5	32	18	.4216	733.6
	PI	7'54"	0.5	62.5	23	23	.4334	
Cobayo 6	PD	23'	0.5	21.7	35	19	.5001	680.1
	PI	39'	0.5	12.8	50	16	.4443	
Cobayo 7	PD	18'15"	0.5	27.4	32	20	.4922	685.6
	PI	21'30"	0.5	23.2	33	17	.4210	

CUADRO No.8

VALORES PROMEDIO Na-K EN COBAYOS AMPUTADOS

	Volumen Minuto-en ul.	Na+	K+	Peso Glándula
PD	32.0	45.7	17.3	.3985
PI	29.5	47.1	17.4	.3966

PROTEINAS EN SECRECION

CUADRO No.9

	COBAYOS	NORMALES	
	Grs. por ciento Prot. totales.	Grs. por ciento - de albúminas.	Grs. por ciento de Globulinas.
PD	.652	.513	.140
PI	.665	.549	.115

CUADRO No.10

	COBAYOS	AMPUTADOS	
	Grs. por ciento Prot. - Totales	Grs. por ciento de albúminas.	Grs. por ciento de Globulinas.
PD	.463	.384	.079
PI	.405	.311	.094



CUADRO No.11

PESO DE COBAYOS EN GRAMOS ANTES Y DESPUES DE AMPUTADOS			
	Peso en gram <u>os</u> Previa- amputación.	Peso en gramos 24 horas después de amputados	Disminu <u>ción</u> de peso en gramos
Cobayo 1	549.6	476.3	73.3
Cobayo 2	555.1	489.4	65.7
Cobayo 3	642.1	594.0	48.1
Cobayo 4	706.8	680.1	26.7
Cobayo 5	729.6	685.6	44.0
Cobayo 6	639.8	589.7	50.1
Cobayo 7	785.0	733.6	51.4
PROMEDIO	658.2	606.9	51.3

D I S C U S I O N

I - CONCENTRACION DE ELECTROLITOS.

A - TEJIDO: Tanto en la glándula submaxilar como en la parótida hipertrofiadas, el potasio sufrió un descenso estimado - en el 16.5% y el 17.3% respectivamente, en relación a las glándulas normales.

Es probable que el potasio intracelular pase al medio extra celular por un mecanismo de transporte activo, similar al sugerido por Martínez y Ulrich (17) en el sistema de conductos de la glándula submaxilar de ratas, y por Lundberg (9) en la glándula sublingual de gatos. Esto sugiere que la disminución de po tasio posterior a la amputación, puede ser debido a que ésta origina cambios en el transporte activo de electrolitos, al mismo tiempo que da efectos morfológicos.

Respecto al sodio los resultados obtenidos fueron diferentes para ambos tipos de glándulas, que fueron igualmente sometidas al proceso de hipertrofia y deshidratación. Los valores de sodio encontrados en la submaxilar hipertrofiada experimentaron un aumento del 15.8% en relación a los obtenidos en glándulas normales; en cambio en la parótida hipertrofiada se manifestó un descenso del 20.7% respecto a los valores del grupo control.

Schneyer y Schneyer (30), investigaron los movimientos de agua, electrolitos y sólidos totales en cortes de glándula submaxilar de ratas, con el fin de delinear los mecanismos de trans porte de los mismos. De esta investigación se dedujo que el so -

dio y el potasio pueden ser transportados de la célula al medio extracelular y de éste a la célula, aún en contra de un gradiente de potencial electroquímico.

Pudiese ser que en la glándula submaxilar, los cambios debidos a la hipertrofia afecten la secreción alveolar de sodio en el sentido de disminuir la magnitud de dicho proceso, con lo que aumentaría la concentración del electrólito en el tejido glandular. Como se observa, además, una disminución en la concentración de potasio, lo cual probablemente significa un efecto de la hipertrofia sobre el mecanismo de secreción de potasio, el efecto de la hipertrofia sobre el sodio podría ser indirecto, a través del potasio, en cuyo caso aquél tendría que conservarse en el interior de la célula para mantener el equilibrio electrolítico.

En cuanto a la glándula parótida es probable que la hipertrofia no afecte el mecanismo de secreción del sodio en la misma magnitud que en la submaxilar. Por otra parte, en esta glándula la hipertrofia puede afectar no sólo la secreción de sodio, sino su reabsorción posterior tal como lo sugieren los hallazgos en secreción. El potasio en esta glándula experimentó una disminución similar a la del sodio. Esta disminución del potasio se manifiesta en la secreción, donde está aumentado con respecto a los valores tomados como control.

B - SECRECION: C.A.Schneyer, y L.H. Schneyer han estudiado ampliamente el fenómeno de la concentración de sodio y potasio en ratas. Trabajando en diferentes circunstancias experi -

mentales, establecieron inicialmente en 1959 (27) la existencia de distintos niveles de concentración de sodio y potasio en las glándulas submaxilar-sublingual y parótida. Tomando el plasma como punto de referencia, encontraron que la secreción de estas glándulas era hipotónica. Posteriormente, en 1960 (28), reportaron que las variaciones en el flujo originaban alteraciones en la concentración de sodio y potasio. Estas alteraciones se manifiestan principalmente en la parótida, en la cual se puede establecer que cuando el flujo secretorio aumentaba, la secreción se volvía casi isotónica. Finalmente, en 1961 (29), reportaron que el sistema de conductos en el interior de la glándula, aún en ausencia de tejido normal alveolar era igualmente capaz de secretar fluídos y electrólitos y que el grado de formación de fluído en los conductos puede ser del mismo orden o magnitud que el de la glándula normal. Con ésto se trató de dejar establecido la verdadera importancia del funcionamiento del sistema de conductos, que era considerado mucho menor antes de realizarse tales experimentos.

Martínez y col.(9-16-17), efectuaron estudios histológicos y de micropunción en la glándula submaxilar de ratas jóvenes y adultas, en base a los cuales llegaron a aclarar muchas de las interrogantes relativas a la fisiología de las glándulas salivales y a comprobar algunos hechos que anteriormente no pasaban de la simple especulación. Entre otras cosas comprobaron la existencia de una secreción alveolar isoosmótica con el plasma, la cual pasa a través del sistema de conductos sin sufrir mayores cambios, hasta que alcanza el conducto prin

principal donde se ve sometida a rápidas y grandes modificaciones, perdiendo progresivamente sodio y cloro, hasta tornarse en una solución hipotónica. De estos dos electrólitos fué el sodio, el que experimentó una disminución mayor, por lo que se sugirió la existencia de un mecanismo de transporte diferente para ambos, y que el sodio al final es reemplazado por otro catión en orden de mantener los valores de osmolaridad observados. Posteriormente estos mismos investigadores, comprobaron que el electrolito que compensaba la salida de sodio, era el potasio.

En el presente trabajo la determinación de concentración de sodio y potasio en secreción se efectuó únicamente en la parótida. Los valores de sodio disminuyeron en el amputado, respecto al normal, aproximadamente en un 22.4% mientras que el potasio aumentó en un 23.4%, siempre en el amputado.

Los valores de concentración de ambos electrolitos fueron medidos en la secreción obtenida del conducto excretorio principal, poco antes de su desembocadura en la cavidad oral, por lo que se considera que tanto en los animales control como en los amputados la secreción fué obtenida en igualdad de circunstancias, y que aunque la naturaleza del experimento no permitía determinar exactamente el nivel a que se producirían las diferencias de concentración de ambos cationes, puede asumirse que el proceso de la hipertrofia produce alteración evidente en los mecanismos de transporte de los mismos.

En vista de que no se encontraron variaciones en el flujo, se puede deducir que éstas no son la causa de las variaciones en la concentración de sodio y potasio observadas en estos experimentos, y que los cambios electrolíticos fueron principalmente debidos a trastornos funcionales causados por efecto de la amputación sobre el mecanismo de transporte de sodio y potasio a nivel de los conductos. Es lógico suponer que la hipertrofia afecta no sólo el mecanismo de transporte a nivel alveolar sino en todos los niveles glandulares donde se efectúa.

Un dato interesante, observado en los resultados de amputados se refiere a que el aumento de potasio es de magnitud proporcional a la pérdida de sodio, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de intercambio o sea que la absorción del sodio está íntimamente relacionada con la secreción de potasio.

II - PROTEINAS: TEJIDO Y SECRECION

Schneyer y Hall (26), reportaron que la pilocarpina, empleada como medio para provocar un estímulo de la secreción salival, es útil si únicamente se quiere estudiar la intensidad del flujo secretorio y la concentración de electrólitos, pero no es sustituto satisfactorio cuando se desea estudiar el contenido de proteínas y actividad de la amilasa. Esta afirmación la basaron en el hecho de que cuando empleaban pilocarpina (50 Mgs/Kg.de peso), encontraron una concentración 5-20 veces mayor de proteínas totales que cuando estimulaban directamente el nervio aurículo temporal.

Schneyer y Hall utilizaron en sus experimentos una dosis supramaximal de pilocarpina, la cual se encontró que no era adecuada para los fines de investigación como los propuestos - en el presente trabajo, por lo que en los experimentos realizados se decidió emplear una dosis menor.

De los resultados obtenidos se estableció que las proteínas totales en tejido experimentaron un aumento en los amputados del 55.2% en la glándula submaxilar y del 86.8% en la parótida, mientras que en la secreción de la parótida experimentaron un descenso del 29.1%.

Handelman y Wells (7), realizaron estudios histoquímicos en ratas, encontraron una síntesis mayor de RNA en los alvéolos glandulares de los animales sometidos a hipertrofia glandular por amputación, en relación a los grupos control; sugiriendo que la mayor o menor cantidad de RNA puede considerarse como índice de la síntesis de proteínas para las células alveolares. Esto parece estar de acuerdo con el aumento de proteínas totales encontrado en el tejido glandular de cobayos amputados. El estudio histológico e histoquímico efectuado en este trabajo, mostró un mayor acúmulo de material basófilo PAS + en el citoplasma de las células alveolares de las glándulas hipertrofizadas, el cual puede ser el resultado de una síntesis mayor de proteínas.

De los resultados obtenidos es posible deducir, que a pesar de que las unidades alveolares de las glándulas amputadas contienen una cantidad de proteínas mayor que las normales no

son capaces de secretarlas debido probablemente a que la hipertrofia afecta este mecanismo disminuyéndolo por lo que los valores de proteínas encontrados en saliva de los animales amputados son menores que los reportados para el grupo control.

III - EFECTO MORFOLOGICO DE LA AMPUTACION.

Los resultados aquí reportados sobre la hipertrofia de las glándulas salivales de cobayo, 24 horas después de la amputación de los incisivos inferiores, confirman los trabajos efectuados en roedores por otros investigadores (3-7-15-20-21-36).

Esta hipertrofia se manifiesta en el aumento de tamaño y peso de dichas glándulas, pese a que los animales experimentales sufren pérdida de peso corporal después de la amputación (Cuadro No.11).

Por lo tanto, en los roedores parece existir un mecanismo que, como lo sugirió Parr Sánchez (20), es de origen adrenérgico. El mismo fenómeno es explicado por Wells (34) diciendo - que el trauma causado por la amputación estimula algún tipo de receptores nerviosos localizados en la pulpa de los incisivos inferiores, y que estos estímulos se transmiten por ramas del quinto par craneal al sistema nervioso central, donde se establece una comunicación con centros reguladores del sistema nervioso autónomo, responsables de la función de las glándulas salivales. Pereg y col. (21) reprodujeron los experimentos de Wells relativos a la amputación y efectuaron, además, la extracción de incisivos inferiores, comprobando que ésta originaba -

hipertrofia de las glándulas, aunque de menor intensidad que la producida por amputación. Basados en ésto, sugirieron que la ausencia de una oclusión funcional es también responsable de la hipertrofia de dichas glándulas. Por otra parte, Wells comprobó que la amputación de los incisivos inferiores no ejerce ningún efecto sobre las glándulas salivales (34) lo cual, además de dejar establecido que los receptores responsables de transmitir los estímulos de la amputación están localizados en el área de los incisivos inferiores, contradice en parte la hipótesis de que la ausencia de una oclusión funcional es también un estímulo responsable de la hipertrofia glandular.

Un resultado significativo del presente trabajo fué - que después del proceso de desecación las glándulas hipertrofiadas que antes tenían un peso mayor que las normales, tenían ahora un peso menor que éstas, lo que se interpreta como que el aumento se debe a un mayor contenido de líquido.

Con el fin de corroborar estos resultados se efectuó un estudio histológico e histoquímico en las glándulas normales e hipertrofiadas, encaminado principalmente a determinar si había un cambio significativo en el material mucopolisacárido de las glándulas, que fuera responsable de los fenómenos antes señalados. Los tejidos fueron fijados en alcohol formol Lillie (12) incluídos en parafina y seccionados en 6 micras - de espesor. Se utilizaron las técnicas siguiente: Acido Peryódico de Schiff (PAS), Hierro Coloidal (IC), Hierro Coloidal-Acido Peryódico de Schiff (IC-PAS) y Azure 2.

De los resultados obtenidos puede deducirse lo siguiente:

a) Glándula Submaxilar Hipertrofiada; en el interior de los conductos de la glándula de los animales amputados obsérvase abundante material mucopolisacárido de tipo básico y moderada cantidad de material mucopolisacárido ligeramente básico y ácido. En los alvéolos glandulares se observó una ligera hipertrofia del citoplasma por acumulación de material secretorio PAS + (básico) y el núcleo rechazado hacia la parte basal con una basofilia marcada.

b) Glándula Submaxiliar Normal: los resultados fueron pocos menos que contrarios a los reportados para la submaxilar hipertrofiada. En los conductos se observa poco material mucopolisacárido intraluminal, casi en su totalidad básico. Ningún acúmulo de material intracitoplasmático. Los alvéolos glandulares observáronse de tamaño normal con moderada cantidad de material mucopolisacárido PAS + (Básico). Núcleo en una posición más central y basofilia citoplasmática abundante.

c) Glándula Parótida: Los hallazgos no fueron diferentes en animales amputados y normales. Con excepción de una mayor distensión de las células alveolares en la glándula hipertrofiada, por acumulación de material secretorio PAS+, ambas coincidieron en las características citológicas siguientes: en los conductos se observa escaso material secretorio mucopolisacárido, excepto en los conductos intralobulares de mayor diámetro, resaltando ocasionalmente el tipo ácido. Ningún material secretorio intracitoplasmático.

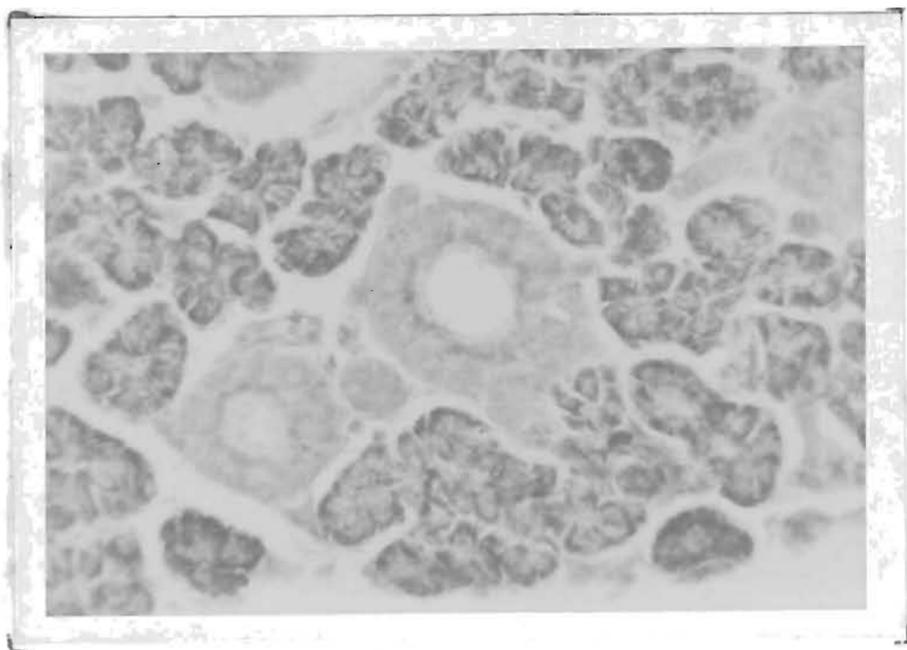
Básicamente los hallazgos antes reportados coinciden con los reportados por Handelman y Wells (7) en ratas y por Spicer (31) en ratas, ratones, cobayos, y conejos albinos. El hecho de que los animales empleados fuesen roedores no implica que los resultados sean

iguales para todos ellos, máxime cuando ha habido variaciones en los métodos empleados por cada investigador. Por otra parte estas diferencias no impiden el efectuar algunas comparaciones, con el fin de dejar más claramente establecido el resultado de todas estas investigaciones.

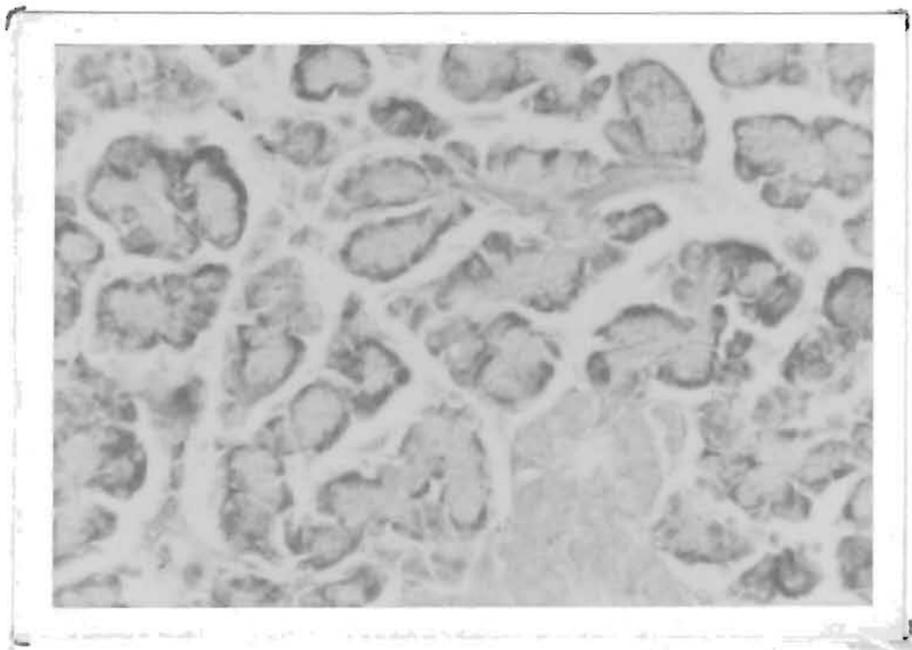
Los estudios histoquímicos efectuados por Handelman y Wells (7), fueron en ratas sometidas a sucesivas amputaciones (realizadas cuatro veces con intervalo de dos días entre cada una y autopsiadas 24 horas después de la última amputación), de lo que se puede inferir que los resultados histológicos varían de los encontrados en cobayos 24 horas después de la amputación. Sin embargo, tanto los resultados reportados en este trabajo como los reportados por Handelman y Wells, coinciden en que la hipertrofia es debida a un aumento en el volumen del citoplasma de las células alveolares, que tiene su origen en una acumulación de material basófilo, siendo esto válido tanto para la glándula submaxilar como para la parótida.

Los resultados obtenidos en el material mucopolisacárido ácido, coinciden con los de Handelman, Wells y Spicer en el sentido de que no se obtienen cambios significativos en la calidad del mucopolisacárido. Estos resultados concuerdan con otros similares reportados por J.H.Kronman y J.J.Spinalle (10), quienes han observado alteraciones histológicas en glándulas salivales bajo influencias hormonales.

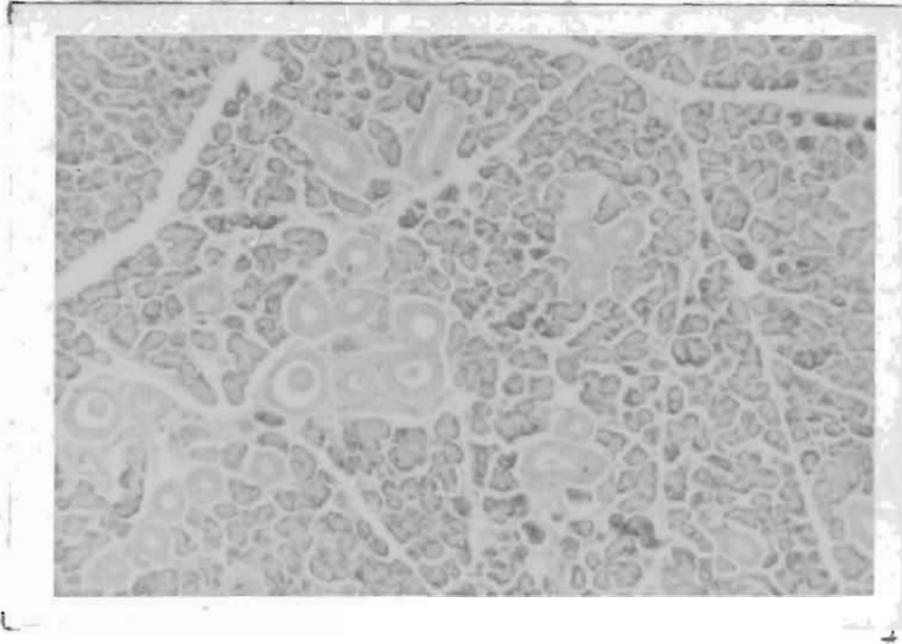
En conclusión se hace necesario extender los estudios histoquímicos a la investigación de otros componentes tisulares, que podrían aportar mayores datos para obtener conclusiones valederas.



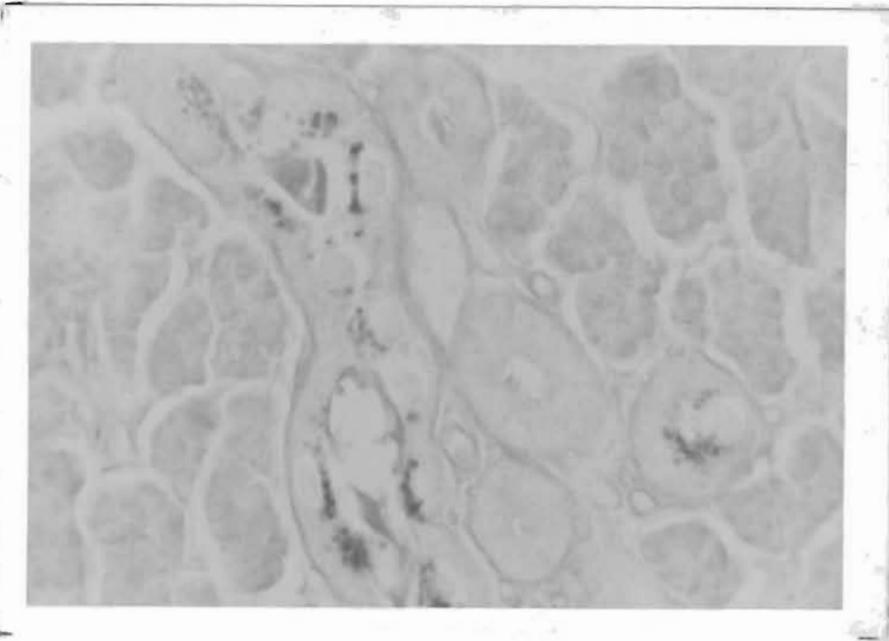
- 1 - SUBMAXILIAR NORMAL.- Azure Floxina. 250 x : Nótese presencia de material ligeramente metacromático en la parte apical de conductos. Material ortocromático en parte basal del citoplasma y núcleo de la célula alveolar.



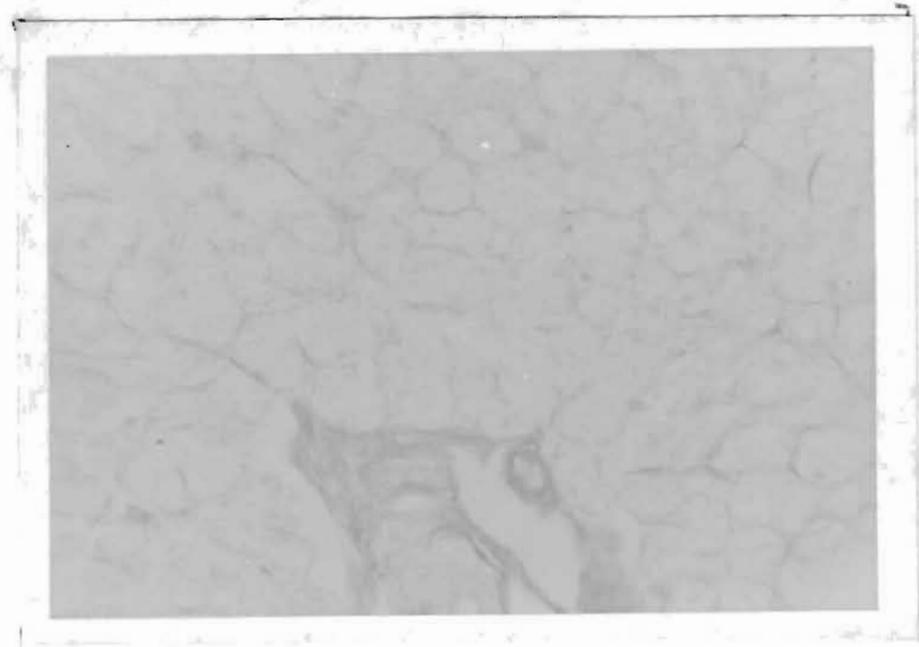
- 2 - SUBMAXILAR AMPUTADA. Azure Floxina. 250 x : Nótese hipertrofia de las células alveolares, con ortocromasia citoplásmica y nuclear.



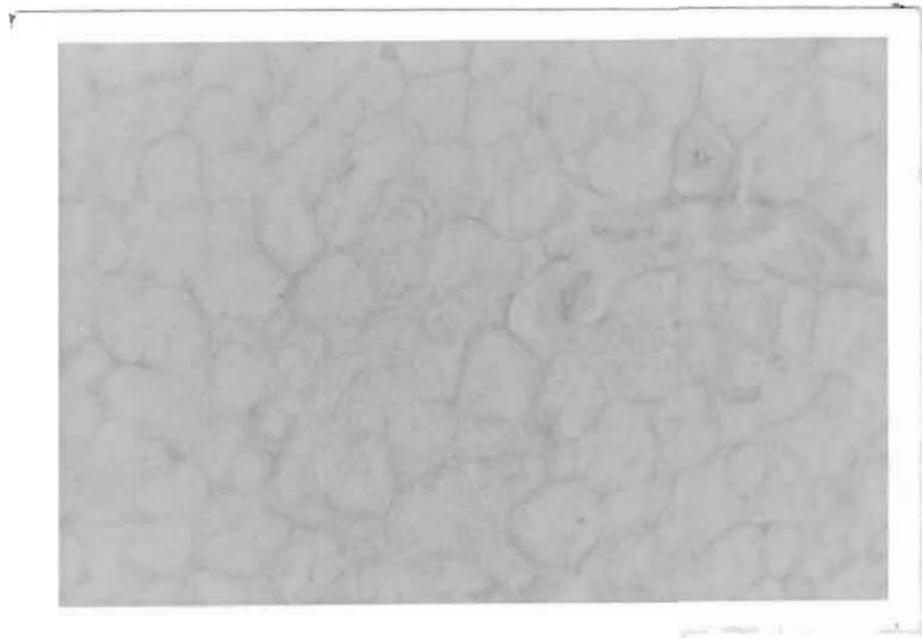
3 - SUBMAXILAR AMPUTADA.- Azure Floxina. 100x : Nótese hipertrofia de las células alveolares, con ortocromasia citoplásmica y nuclear y el contenido de secreción en los conductos.



4 - SUBMAXILAR AMPUTADA.- Hierro Coloidal/Acido Peryódico de Schiff (IC/PAS). 400x : Nótese conductos con material IC positivo en la parte apical y aparato de Golgi. Material - PAS + en las células alveolares.



5 - PAROTIDA NORMAL. - IC/PAS. 100x: Nótese material PAS + en las células del alvéolo.



6 - PAROTIDA AMPUTADA. IC-PAS. 100x: Nótese mayor distensión del citoplasma y menor contenido de material PAS + en las células del alvéolo. Puede también observarse material IC positivo en la parte apical de algunos conductos.

IV - POSIBLE RELACION CON LA MUCOVISCIDOSIS.

En la introducción de este trabajo se especifica que uno de los objetivos del mismo ha sido el de reproducir ciertos estados anormales de la función de las glándulas salivales, similares a los encontrados en la Mucoviscidosis. El propósito era conocer variaciones en la concentración de electrólitos (sodio y potasio) y de proteínas, que pudieran compararse con los observados en esa enfermedad.

De la revisión de los reportes relativos a las alteraciones de electrólitos y proteínas en la mucoviscidosis, se deduce que aún no existe un acuerdo general en lo que respecta al grado en que se manifiestan tales alteraciones, aunque sí se ha comprobado que están presentes en la enfermedad. Di Sant' Agnese en una amplia revisión de datos sobre la mucoviscidosis, señala precisamente las considerables contradicciones que suscita el estudio de los resultados del análisis de sodio y potasio, como también las diferencias en volumen de secreción cuando la saliva de las glándulas submaxilares y parótidas era analizada separadamente.

Respecto a las proteínas, Chernick y Barbero demostraron en 1961 (14) que la saliva submaxilar en pacientes con mucoviscidosis es sorprendentemente anormal en apariencia y composición química. En contraste a la secreción clara y transparente de sujetos normales, la saliva submaxilar de pacientes con mucoviscidosis es turbia y posee un alto contenido de calcio, proteínas totales, hexosa, fucosa, ácido siálico y hexosaminas, amilasa y actividad de ribonucleasa ácida y alcalina. Este incremento de la mayoría de los componentes analizados fué confirmado por los estudios de Mandel y col. (13), Gingler y Palaviccini (6) y por Zipkin (6). Así

mismo los niveles de calcio y fósforo, proteínas totales, proteínas-carbohidratos y tiroxina, estuvieron aumentados al igual que la actividad de lisozima y amilasa.

Por el contrario, la saliva parotídea tiene una secreción con un contenido mucho más bajo en glicoproteínas y aparece mucho menos afectada que la saliva submaxilar en la mucoviscidosis. Todos los índices determinados por Mandel y col. (13) y por Zipkin (6) en saliva submaxilar, fueron medidos también en la secreción salival de la glándula parótida y se encontró que estaban normales. Recientemente, en 1967, Mangos y col. (14) llegaron a demostrar la existencia de un factor en saliva de pacientes con mucoviscidosis capaz de inhibir la reabsorción de sodio en la glándula parótida de ratas, y sugirieron que este factor puede ser el responsable del aumento de salinidad en la saliva de pacientes con mucoviscidosis, al provocar una inhibición análoga a la reabsorción de sodio en sus glándulas salivales.

De los resultados analizados en la discusión se deduce que la amputación, por intermedio del sistema nervioso autónomo, causa alteraciones funcionales en las glándulas salivales de cobayos sometidos a este procedimiento. Estas alteraciones se manifiestan en los mecanismos de intercambio de electrólitos, que ocurren tanto a nivel alveolar como de conductos, y en la síntesis de proteínas la cual, como se dejó establecido, se ve alterada por lo menos en la glándula parótida.

Algunas de estas modificaciones son similares a las observadas en la mucoviscidosis, específicamente el aumento tisular en proteínas y el aumento de potasio en secreción. Sin embargo, la concentración de proteínas disminuye en la secreción estudiada, lo que

no corresponde a lo observado en la enfermedad. Hay que hacer notar que se trata de secreción parotídea que en la mucoviscidosis no sufre mayores alteraciones. La disminución en contenido de proteínas puede ser debida a efectos de la hipertrofia sobre la síntesis intracelular. No se puede afirmar por lo tanto, que los mismos mecanismos intervengan en el origen de ambos tipos de alteración, pero sí que el sistema nervioso autónomo tiene influencia - no sólo sobre la morfología sino sobre la función de las glándulas exócrinas.

El factor o factores responsable de la alteración en el contenido de electrólitos, en este caso pudieran ser los investigados por Mangos y col (14). En el presente estudio puede observarse que en tejido de glándula submaxilar el contenido de sodio aumenta casi en la misma proporción que disminuye el potasio. En cambio, en la glándula parótida ambos electrólitos disminuyen en un 20.7% para sodio y en un 17.3% para potasio. De ésto se deduce que la amputación, como causa de la hipertrofia, afecta de distinta manera a ambas glándulas. Con respecto al sodio en secreción de la glándula parótida es probable que si la hipertrofia afecta su reabsorción, - su concentración en secreción será menor. Posteriormente al alcanzar esta secreción el conducto principal la tonicidad es compensada por un aumento en el contenido de potasio en cifras aproximadas a la disminución del sodio.

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

- 1 BIURET METHOD. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods. pgs. 450/451.
- 2 BURGER, A.S.V. and N.G.EMMELIN. Historical Introduction Physiology of the Salivary Glands. Great-Britain, Butler & Tanner Ltd. 279 pgs. - 1961.
- 3 CAMPOS H. A. and J.J.PARR. Enlargment of the Guinea Pigs Salivary Gland caused by catecholamines, or Tooth amputation. European J. of Phar. 2(1968). 371-376.
- 4 CHERNIK W.S., G.J. BARBERO AND F.M. PARKINS. Studies on submaxillary saliva in Cystic Fibrosis - J. Ped. 59: 890-898, 1961.
- 5 DETERMINACION DE PROTEINAS SERICAS: Proteína total, Albúminas y Globulinas. Método de Biuret pp. 7-3/7-4. 1967/1968. Manual de Prácticas de Bioquímica. Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador.
- 6 DI SANT' AGNESE PAUL AND R.C.TALAMO. Pathogenesis and - Physiopathology of Cystic fibrosis of the pancreas. New England J.of Med. 277: 1287/1295, 1343/1352, 1399/1408. Dec./67.
- 7 HANDELMAN CH. AND H. WELLS. Morphological and Histochemical Studies of Experimentally Enlarged and Atrophied salivary gland of rats. Am.J. Anat. 112:1 - 68/80, 1963.
- 8 HALLOWAY P.J. AND R.A.D. WILLIAMS. A study of the oral - secretions of rats stimulated by pilocarpine. Arch. Oral Biol. 237/243 (10), 1965.
- 9 HOLZGREVE H., J.R. MARTINEZ AND A. VOEGEL. Micropuncture and Histologic study of submaxillary glands of young rats. Plügers Archiv. 290. 134-143, 1966.
- 10 KRONMAN J.H. and J.J. SPINALE. The effect of Impaired thyroided function upon salivary glands histochemistry in the Rat. Acta Anat. 68:272-283, 1967.
- 11 KUTSCHER H.A., I.D. MANDEL, R.H. THOMPSON ET AL. Parotid Saliva in Cystic fibrosis. I - Flow Rate. Am. J. of Diseases Children. vol.110: 643/651, 1965.

- 12 LILLIE, R.D. Histopathologic technic and practical histochemistry. Ed. McGraw Hill Book Co. 3a.Ed. XII. 175 p. 1965.
- 13 MANDEL I.D., A. Kutscher, C.R. DENNING, R.H. THOMPSON AND F.V. ZEGARELLI. Salivary Studies in Cystic Fibrosis. Am. J. Dis. Child. 113: 431-438, 1967.
- 14 MANGOS, J.A., N.R. MC SHERRY AND P.S. BENKE. A sodium - transport inhibitory factor in the saliva of patients with cystic fibrosis of the - pancreas. Pediatric Research 1: 436-442 (1967).
- 15 MARTINEZ, E.V. Modificaciones en la actividad de la amilasa salival y contenido de proteínas en la glándula salival hipertrofiada. Tesis de - doctorado en Odontología. Universidad de El Salvador, 1966.
- 16 MARTINEZ, J.R., H. HOLZGREVE AND A. FRICK. Micropuncture study of submaxillary glands of adult rats. Plügers Archiv. 290. 124:133. 1966.
- 17 MARTINEZ, J.R. AND K.J. ULRICH. Micropuncture studies of rat submaxillary gland. Research on Pathogenesis of cystic fibrosis. 129: 135.1966.
- 18 MASON, D.K., M. McG.HARDEN AND W.D. ALEXANDER. Problems - of interpretation in studies of salivary - constituents. J. of Oral Medicine. 66(21) No.2 April/66.
- 19 METODO DE BIURET MEJORADO. Manual de Métodos Clínicos - "Lab-Trol". Dade Reagents Inc. Miami, Fla. U.S.A.
- 20 PARR S., J.J. Acerca del mecanismo de crecimiento de la glándula salival inducido por amputación de incisivos o por isoproterenol. Tesis de Doctorado en Odontología, Universidad de El Salvador, 1965.
- 21 PEREC, C.J., A.B. HOUSSAY, A. PERONACE AND M.N.FABIANO. Submaxillary and retrolingual hypertrophy by inferior incisor extractions in the rat. Acta Physiol. Lat. Amer. 14: 211-214. 1964.
- 22 PERONACE. A. ET AL. Alterations in submandibular and retrolingual glands following parasympathetic denervation in rats. Anat. Record. 150: - 25, 1964.

- 23 QUINTARELLI G. Histochemical identification of salivary Mucins. Vol. 106. Art. 2. 339/363, March/65.
- 24 RICHINS C. and A. KUNZ. Role of sympathetic nerves in the regulation of salivary secretions. Am. J. Physiol. Vol. 173. No.3. 1953.
- 25 RUCH, T. and H.D. PATTON. Physiology and Biophysics. - Cap. 49 - 979/996. 19ed. 1966.
- 26 SCHNEYER, C.A. and H.D.HALL. Comparison of rat salivas evoked by auriculo temporal and pilocarpine stimulation. Am. J. Physiol. 209(3): 484/488, 1965.
- 27 SCHNEYER, C.A. AND L.H. SCHNEYER. Electrolyte levels of rats salivary secretions. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101: 568/569, 1959.
- 28 SCHNEYER, C.A. and L.H. SCHNEYER. Electrolyte levels of rat salivary secretions in relation to fluid-flow rate. Am. J. Physiol. 199(1): 55-58, 1960.
- 29 SCHNEYER, C.A. and L.H. SCHNEYER. Secretion by salivary glands deficient in acini. Am. J. Physiol. 201 (5): 939-942, 1961.
- 30 SCHNEYER, L.H. and C.A. SCHNEYER. Electrolyte and Water transport by salivary glands slices. Am. J. - Physiol. 203(3): 567/571, 1962.
- 31 SPICER, S.S. A correlative study of the histochemical - properties of rodent acid mucopolysaccharides. J. of Histochem. and Cytochem. 8(1):18-35, 1960.
- 32 SWENEY, E.A., J.H. SHAW, E. CHILD AND D. WEISSBERGER. Studies on the protein composition of rodent - saliva. I - Application of methods of paper - electrophoresis to two strains of laboratory rats. Arch. Oral Biol. vol 7 - 621/631, 1962
- 33 THAYSEN, J.H. Glandular secretions of electrolytes. CIBA Foundation Colloquia on Ageing vol. 4. 62/73, 1958.
- 34 WELLS H. The Neural regulation of salivary gland growth Annals of the New York Academy of Sciences. 106: 2. 654/667. 1963.
- 35 WELLS H., C. HANDELMAN AND E. MILLGRAM. Regulation by the sympathetic nervous system of the accelerated growth of salivary glands of rats. Am. J. Physiol. 201: 707/710, 1961.
- 36 WELLS H. and P. MUNSON. Experimental Enlargement of sub-mandibular salivary glands of rats. Am - J. - Physiol. 199(1): 63/66, 1960.

- 37 WELLS, H., S.J. ZACKIN, P. GOLDBER AND P. MUNSON.
Increase in weight of the submandibular
salivary glands of rats following periodic
amputation of the erupted portion
on the incisor teeth. Am. J. Physiol. -
196: 827/830, 1959.