



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

El estrés crónico variable induce cambios  
morfológicos en la glándula submandibular de la  
rata macho joven

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Yazmín Sánchez Solís

**Directora**

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tlaxcala, Tlax.

Octubre 2020





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Posgrado en Ciencias Biológicas

El estrés crónico variable induce cambios  
morfológicos en la glándula submandibular de la  
rata macho joven

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Yazmín Sánchez Solís

### Comité Tutorial

Dra. Leticia Nicolás Toledo  
Dra. Ida Soto Rodríguez  
Dra. Margarita Cervantes Rodríguez

Tlaxcala, Tlax.

Octubre 2020

La presente tesis se realizó en las instalaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y bajo la dirección de la Dra. Leticia Nicolás Toledo.

Se contó con el financiamiento de beca CONACYT con número 925588.

La Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).



## AGRADECIMIENTOS

Al posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por el espacio, tiempo y confianza brindada durante la realización de este proyecto.

A la beca CONACYT con número 925588 recibida durante el periodo Septiembre 2018-Agosto 2020.

A mi directora de tesis, Dra. Leticia Nicolás Toledo, por su confianza, apoyo y paciencia, por su acertada orientación y discusión crítica que me permitió un buen aprovechamiento en el trabajo realizado y sus enseñanzas académicas que forman parte de mi carácter profesional y humano.

Al Comité tutorial:

Dra. Ida Soto Rodríguez, gracias por su atención y paciencia para revisar los resultados, porque con sus atinadas preguntas y comentarios hizo enriquecer notablemente este trabajo.

Dra. Margarita Cervantes Rodríguez, gracias por su calidez, confianza y por la sinceridad de sus consejos que orientan mi desarrollo profesional y personal.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

Le agradezco a Dios por estar conmigo y guiarme en mi camino, por brindarme la oportunidad de obtener otro triunfo personal, por darme salud, sabiduría y entendimiento para lograr esta meta.

A mí persona, por todo el esfuerzo, voluntad, ganas y perseverancia en alcanzar este logro.

A mi hijo Matias Vadym por ser mi alegría desde el momento que ya crecías en mi vientre, por todos esos abrazos y sonrisas que hemos compartido juntos, por ser la razón de que me levante cada día, esforzarme por el presente y el mañana, eres mi principal motivación.

A mi esposo Juan Carlos por ser una persona muy importante en mi vida, por brindarme tu amor y cariño, por tu esfuerzo, sacrificio, paciencia y por tus palabras de ánimo cuando sentí perder la fuerza.

A mis padres por haberme proporcionado la mejor educación y haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue, por infundirme valores, la ética y el rigor que guían mis pasos por la vida. Dios los bendiga siempre. Gracias a mi madre Leticia por ser siempre incondicional, por darme tú apoyo en todo momento, por confiar y creer en mí; Gracias a mi padre Antonio por tu apoyo y por cada consejo que orienta mis pasos por el camino recto.

A mis hermanas por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar. Gracias a mi hermana Nety por su apoyo y colaboración en la elaboración de este proyecto, por orientarme a cada momento que lo necesite; Gracias a mi hermana Iris por tu apoyo, enseñanzas y pláticas relacionadas al área odontológica las cuales fortalecieron a este proyecto.

A mi amiga y compañera Yanin Santamaria, gracias por las pláticas y risas que compartimos juntas en el laboratorio, por tu valiosa amistad y por todo el apoyo que me brindaste.

A todos mis familiares y amigos que celebran conmigo un logro más.

## **DEDICATORIA**

Esta tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mi hijo Matías Vadym por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

## RESUMEN

Las glándulas salivales están expuestas a diversos factores que conducen a la pérdida parcial o total de la función. En humanos, factores como la extirpación de alguna glándula, la radioterapia de cabeza y cuello, medicamentos y la edad causan disfunciones. Sin embargo, el estrés puede ser un factor de disfunción de las glándulas submandibulares. La información que se ha reportado es escasa, por ello, el objetivo de la tesis fue analizar el efecto del estrés crónico variable sobre la morfología en la glándula submandibular en la rata macho joven. Para ello, utilizamos ratas macho Wistar de 21 días de edad, asignados a 2 grupos: control (C) y estrés crónico variable (ECV). El ECV consistió en aplicar a las ratas diferentes estresores cada día en diferentes periodos de tiempo durante 4 semanas. Las ratas de ambos grupos fueron alimentadas con una dieta estándar para ratas y agua simple a libre acceso. No se encontraron diferencias significativas en la medición de niveles de corticosterona sérica. En el grupo de ECV, la ingesta de alimento y agua, el peso corporal y el peso de la glándula submandibular disminuyeron. Además, el flujo salival fue menor. En cuanto al análisis histológico se encontraron menos acinos y núcleos por efecto en el ECV. Así mismo se encontró la presencia de más linfocitos comparado al grupo control. Nuestros resultados muestran que factores estresantes crónicos podrían inducir una pérdida de funcionalidad en la glándula submandibular y así mismo producir xerostomía en la cavidad bucal.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Estrés.....	2
1.2 Glándulas salivales .....	5
1.3 Glándulas submandibulares en humano .....	5
1.4 Glándulas submandibulares en rata .....	5
1.5 Organización histológica de las glándulas submandibulares en ratas .....	6
1.5.1 Parénquima glandular e histología .....	6
1.5.2 Acinos serosos .....	7
1.5.3 Células mioepiteliales.....	7
1.5.4 Sistema ductal .....	7
1.5.5 Conductos intercalares .....	8
1.5.6 Conductos granulares .....	8
1.5.7 Conductos estriados .....	8
1.5.8 Conductos excretores .....	9
1.5.9 Estroma glandular .....	10
1.6 Vascularización e inervación .....	10
1.7 Saliva .....	11
1.7.1 Humectación y lubricación .....	13
1.7.2 Participación de la saliva en el procesamiento de alimentos.....	13
1.7.3 Participación de la saliva en los mecanismos de protección y defensa de la cavidad bucal.....	13
1.8 Mecanismo de secreción salival .....	15
1.9 Mecanismo de secreción proteínas .....	15

ANTECEDENTES .....	17
2.1 Estudio en humanos.....	17
2.2 Modelos animales .....	17
JUSTIFICACIÓN .....	18
HIPÓTESIS .....	19
OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general .....	19
5.2 Objetivos particulares .....	19
METODOLOGÍA .....	20
6.1 Manejo de los animales.....	20
6.2 Grupos experimentales .....	20
6.3 Diseño experimental .....	21
6.4 Protocolo de la dieta .....	21
6.5 Obtención de kilocalorías (Kcal) consumidas en el alimento.....	22
6.6 Modelo del estrés crónico variable .....	22
6.7 Extracción de muestra salival, obtención de muestras sanguíneas y extracción de glándulas submandibulares .....	24
6.8 Determinación de corticosterona sérica .....	24
6.9 Análisis histológico de la glándula submandibular .....	24
6.10 Análisis estadístico .....	26
RESULTADOS .....	27
7.1 Ingesta de alimento, agua, calorías totales y ganancia de peso corporal .....	27
7.2 Peso de las glándulas submandibulares .....	28
7.3 Corticosterona sérica .....	28

7.4 Características cualitativas de la glándula submandibular.....	29
7.5 Número de acinos.....	30
7.6 Promedio de área acinar.....	31
7.7 Área acinar.....	32
7.8 Número de núcleos dentro de los acinos.....	33
7.9 Número de linfocitos.....	33
7.10 Análisis histológico del sistema ductal de la glándula submandibular.....	34
7.11 Flujo salival.....	35
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIONES.....	39
PERPECTIVAS.....	40
REFERENCIAS.....	41
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	47

## INTRODUCCIÓN

La xerostomía es la sequedad de la cavidad bucal que resulta de una secreción insuficiente de saliva (Wiener y cols. 2010), por sí misma no es una enfermedad si no un síntoma que se presenta en diversas condiciones patológicas como síndrome de Sjögren y diabetes mellitus, entre otras (Seifert y cols. 1986). Cuando la cantidad de saliva disminuye induce hiposalivación, esta afecta la calidad de vida del individuo, así como a su salud bucal (Glore y cols. 2009).

La prevalencia de la xerostomía varía entre el 12% y 30% en todo el mundo (Glore y cols. 2009). La xerostomía es multifactorial, se observa en pacientes tratados con ciertos medicamentos administrados para el tratamiento de varias condiciones sistémicas (Guzik y Kamysz 2009), pacientes sometidos a radioterapia de cabeza y cuello, pacientes geriátricos mayores de 65 años (Glore y cols. 2009), mujeres menopáusicas, pero una de las causas menos estudiada es el estrés. En la mayoría de las investigaciones realizadas han comprobado que las mujeres son más afectadas que los hombres debido a los cambios hormonales (Porter y cols. 2004).

El diagnóstico de la xerostomía comienza con un historial médico completo del paciente. Se realiza un cuestionario para identificar y evaluar la gravedad de la xerostomía, el cuestionario más reciente califica 5 afirmaciones con respecto a las manifestaciones clínicas de boca seca utilizando una de las tres opciones de respuesta (“Nunca” 1, “Ocasionalmente” 2, “A menudo” 3). Las respuestas se califican y se suman para obtener una puntuación única, y las puntuaciones más altas representan manifestaciones clínicas más graves. Después del historial médico debe de realizarse un examen oral, revisando encía, papilas, lengua, suelo de boca, paladar y dientes para visualizar el buen estado o mal estado de la cavidad bucal (Jillian y cols. 2017). Las tasas de flujo salival también se pueden contar para un diagnóstico objetivo de hiposalivación. La producción de saliva estimulada se puede obtener haciendo que el paciente mastique una goma sin sabor o cera de parafina durante unos minutos. Y la producción de saliva no estimulada se debe realizar cuando el paciente esté en reposo y sin realizar algún movimiento masticatorio. La tasa de flujo salival normal cuando se estimula está entre 1.5 y

2.0 ml/min y cuando no se estimula es de 0.3 a 0.4 ml/min. La hiposalivación se refiere a una tasa de flujo salival estimulada de <0.5 a 0.7 ml/min, y la tasa de flujo salival no estimulada es <0.1 ml/min (Jillian y cols. 2017).

El síntoma principal de la xerostomía es la disminución de flujo salival (hiposalivación), que reseca la boca, sensación de ardor y dolor de origen mucoso, halitosis, dificultad en la formación del bolo alimenticio, masticación y deglución (Narhi y cols. 1999).

Si no es tratada la xerostomía, esta puede causar muchas complicaciones, como deficiencias nutricionales, disminución del estado de ánimo, depresión, disminución en la eliminación de bacterias y alimentos, favoreciendo la aparición de gingivitis, caries, dificultad para hablar, tragar y masticar (Thomson y cols. 2006; Tanasiewicz1 y cols. 2016).

## **1.1 Estrés**

El individuo en alguna ocasión de su vida, percibe sentimientos como ansiedad, tristeza, desvelo, taquicardia, nerviosismo, sudoración y tensión muscular los cuales son síntomas asociados a estrés (Sandi y cols. 2001).

La Organización Mundial de la salud (OMS, 1990) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 1990) en un estudio de la condición actual de la salud de los trabajadores, reconoce al estrés como un padecimiento del presente siglo (Reyes Gómez y cols. 2012).

El estrés es una amenaza para la homeostasis en la cual el individuo para sobrevivir, se relaciona con diferentes respuestas adaptativas que involucra la activación del sistema simpático y del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (Fabrice y cols. 2010).

Fases del síndrome general de adaptación (Fabrice y cols. 2010):

1. Fase de alerta. En reacción a un agente estresor, el hipotálamo estimulará a las glándulas suprarrenales (medula) para secretar adrenalina y suministrar energía en caso

de urgencia. Posteriormente habrá múltiples respuestas del organismo como taquicardia, vasodilatación y un incremento de la vigilancia.

2. Fase de defensa o resistencia. Se activa si el estrés es constante. En la zona fascicular de la corteza de las glándulas suprarrenales, se secretará la hormona cortisol, cuyo objetivo es mantener constante el nivel de glucosa sanguínea para nutrir corazón, cerebro y músculos. Es una fase en la cual el individuo debe “aguantar”.
3. Fase de agotamiento o relajamiento. Si la condición se mantiene se acompaña de una alteración hormonal crónica. Si la condición se mantiene, es posible que el organismo se encuentre agotado. En este caso, las hormonas secretadas son menos eficaces e inician a acumularse en la circulación. El organismo estará invadido de hormonas que tendrán un efecto negativo en la salud.

El estrés se clasifica en agudo y crónico. Los estresores pueden ocurrir como eventos agudos de la vida, como ser despedido o descubrir que un ser querido ha muerto, o como dificultades crónicas, como vivir en un vecindario peligroso, tener problemas financieros o maritales persistentes (De Luca y cols. 2004).

El estrés agudo es la forma de estrés más común. Se produce en momentos puntuales, de forma temporal y dura de minutos a horas, como respuesta a la experimentación de uno o varios sucesos altamente estresantes. Los síntomas más comunes son (Kim y cols. 2013):

1. Agonía emocional: una combinación de irritabilidad, ansiedad y depresión
2. Problemas musculares
3. Problemas estomacales como acidez, diarrea y estreñimiento
4. Mareos, migrañas, disnea, palpitación, taquicardia y transpiración

El estrés crónico es aquel que se prolonga en el tiempo, dura varias horas, un día, semanas o incluso meses, se produce un agotamiento físico, emocional o mental que tiene consecuencias en la autoestima y la salud de la persona afectada, provocando incluso una severa depresión. Este tipo de estrés tiene una característica particular y es que el evento o factor estresante se

manifiesta una y otra vez, es decir, el estrés no es temporal y permanece inmodificable a lo largo del tiempo (Fabrice y cols. 2010).

La exposición aguda o crónica al estrés provoca un conjunto de respuestas fisiológicas y de comportamiento que alteran el estado metabólico en humanos y animales experimentales (Kim y cols. 2013). La investigación ha demostrado que estas dos formas de estrés tienen diferentes efectos. Eventos vitales agudos y dificultades crónicas, que ocurren durante la vida de una persona, pueden ejercer un efecto acumulativo en el cuerpo y en consecuencia tiene implicaciones para el desarrollo de la enfermedad (Lupien y cols. 2009). En un evento de estrés agudo, el organismo prepara al sistema inmunitario para desafíos como la infección. En eventos de estrés crónico, puede haber un proceso inflamatorio que lleva al desarrollo de enfermedades sistémicas como artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares o enfermedades periodontales (Dhabbar 2002).

En respuesta a eventos estresantes, el eje hipotálamo–hipofisario–adrenal (HHA) es estimulado, lo que conduce a la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que actúa sobre la glándula pituitaria. Esta glándula libera la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) que actúa sobre la corteza suprarrenal y aumenta la producción y liberación de cortisol (Tsigos y Chrousos 2002). El sistema nervioso autónomo (SNA) es estimulado por receptores adrenérgicos que conducen a la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) por la médula suprarrenal. Al aumentar los niveles de cortisol, adrenalina y noradrenalina se activa el sistema simpático que se acompaña con una disminución recíproca del sistema parasimpático. Cuando la activación simpática disminuye, el sistema parasimpático vuelve a la normalidad y todo el sistema se restablece a la función normal.

Si el factor estresante es de alta intensidad o duración, la respuesta simpática es aún más intensa y es posible que el sistema en su totalidad no pueda restablecerse al nivel normal de la función, y permanezca sintonizado al exceso de la activación simpática y disminución del parasimpático. Esto indica que al disminuir el sistema parasimpático, los niveles de saliva secretada por las glándulas salivales disminuyen (Payne y cols. 2015).

## **1.2 Glándulas salivales**

La cavidad bucal está formada por diversas estructuras anatómicas, entre las cuales encontramos las glándulas salivales. Estas vierten su contenido en la cavidad bucal por diversos conductos principales y su principal función es la producción y secreción de saliva (Conteras y cols. 2008). Son tres pares de glándulas voluminosas, localizadas fuera de la cavidad bucal y se denominan: glándulas parótidas, submandibulares o submaxilares y sublinguales (Carlson 2000).

## **1.3 Glándulas submandibulares en humano**

Las glándulas submandibulares son de forma ovoide o piriforme, pesan de 8 a 15 gramos aproximadamente, se ubican en el piso de la boca, por detrás y por debajo del borde libre del músculo milohioideo, cada una descarga sus secreciones a través del conducto de Wharton, que se abre en el piso de la boca en las carúnculas sublinguales ubicadas en la base del frenillo lingual, posterior a los incisivos inferiores (Khojasteh y Delashou 2012). La saliva, secretada por las glándulas submandibulares, representa el 65% de la saliva total producida por las glándulas salivales mayores (Bhattarai y cols. 2018).

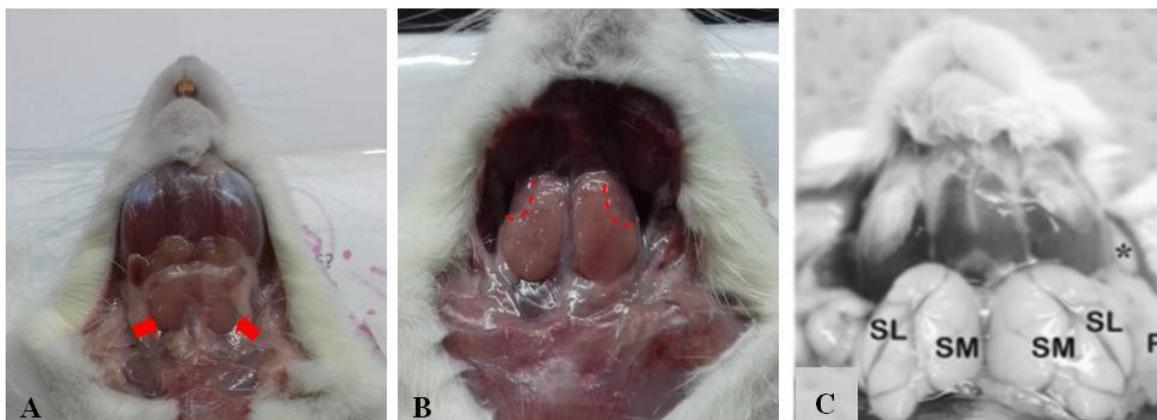
De acuerdo con su organización y al tipo de secreción de esta glándula, existen tres tipos de acinos: acinos serosos, acinos mucosos y mixtos con predominio serosos. El producto de secreción de éstos acinos se drenan de forma secuencial por diversos conductos llamados: intercalares, estriados y excretorios terminales o principales (Gómez y Campos 2002).

## **1.4 Glándulas submandibulares en rata**

Las glándulas salivales existentes en la rata son las glándulas parótidas, submandibulares y sublinguales, ubicadas fuera de la cavidad bucal y cuyas excreciones son vaciadas por diversos conductos.

Las glándulas submandibulares en la rata están ubicadas en los espacios del cuello anterior entre los ganglios linfáticos submandibulares y el esternón (Amano y cols. 2012).

En la rata las glándulas submandibulares son las primeras en desarrollarse, después las glándulas sublinguales y las glándulas parótidas son las últimas (Miletich 2010). Las glándulas submandibulares y las glándulas sublinguales se desarrollan en estrecha asociación, terminando en la misma ubicación anatómica donde comparten la misma cápsula de tejido conectivo (Figura 1). La glándula sublingual ocupa aproximadamente una cuarta parte latero-rostral del complejo submandibular-sublingual. El margen rostral de ambas glándulas bordea los ganglios linfáticos submandibulares. Los conductos excretores principales de las glándulas submandibulares y sublinguales se encuentran separados (Amano y cols. 2012).



**Figura 1. Glándulas submandibulares y sublinguales en rata.** A) La fotografía muestra la ubicación anatómica de las glándulas submandibulares y sublinguales rodeadas por tejido adiposo y ganglios linfáticos submandibulares en rata (flechas rojas). B) La fotografía muestra la división de las glándulas submandibulares y sublinguales (línea punteada), previamente se retiró el tejido adiposo y ganglios linfáticos submandibulares. C) La fotografía muestra la misma ubicación anatómica de las glándulas submandibulares (SM) y sublinguales (SL), compartiendo la misma cápsula de tejido conectivo (Amano y cols. 2012).

## 1.5 Organización histológica de las glándulas submandibulares en ratas

### 1.5.1 Parénquima glandular e histología

La unidad secretora de las glándulas salivales en rata es el acino y estos vierten su secreción por su cara apical a la luz central del mismo. En las glándulas submandibulares de las ratas, solo encontramos acinos de tipo seroso (Amano y cols. 2012).

### 1.5.2 Acinos serosos

Las células de los acinos serosos tienen un aspecto piramidal con una superficie basal amplia, sus núcleos son esféricos localizados en la parte central de la célula y en su citoplasma se encuentran las vesículas de secreción denominados gránulos de cimógeno. Estos acinos presentan una luz central muy pequeña (Figura 2). Se encargan de sintetizar, almacenar y secretar proteínas. La proteína más abundante aportada por estos acinos es la amilasa salival (Amano y cols. 2012).

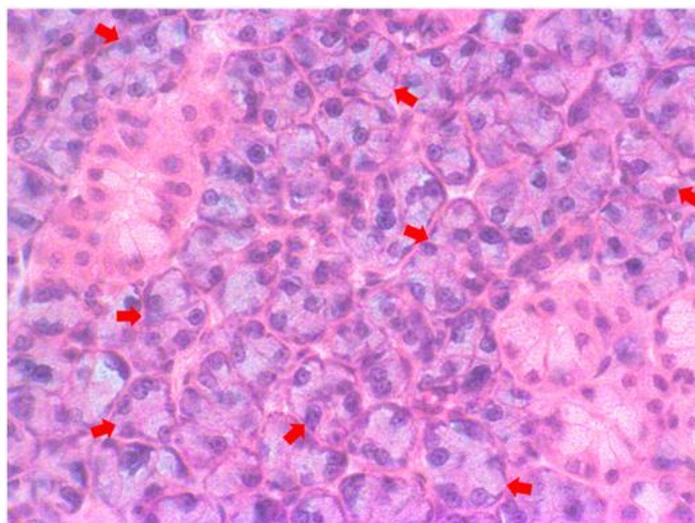


Figura 2. Fotomicrografía de los acinos serosos de las glándulas submandibulares en rata. Tinción de Hematoxilina-Eosina (40x). Acinos serosos (Flechas rojas). Fuente propia.

### 1.5.3 Células mioepiteliales

Los acinos serosos y su sistema ductal se encuentran rodeados por una lámina basal y por dentro de esta lámina basal se localizan las células mioepiteliales. Su función es contraerse para facilitar la expulsión de la secreción de las células acinares (Redman 1994).

### 1.5.4 Sistema ductal

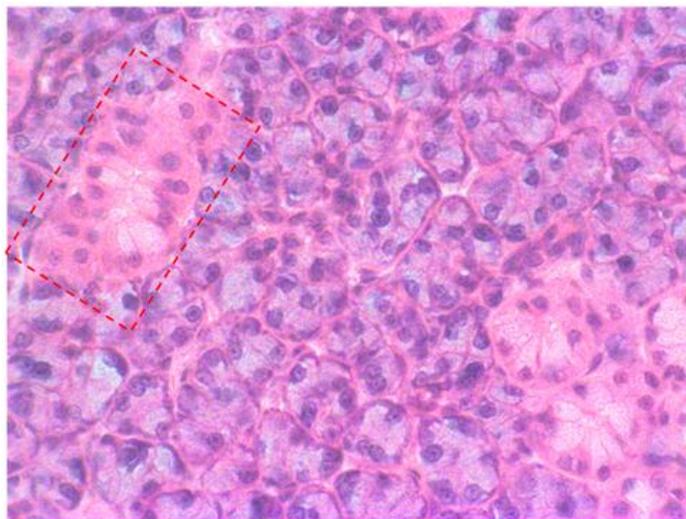
Su sistema de conductos está compuesto por conductos intercalares, granulares, estriados y principales por los cuales se drenará de forma secuencial su producto (Amano y cols. 2012).

### 1.5.5 Conductos intercalares

Los conductos intercalares se encuentran entre el acino y el conducto granular. Son de calibre pequeño y las células epiteliales cuboidales forman el epitelio ductal. Su función es el transporte de saliva primaria (Amano y cols. 2012).

### 1.5.6 Conductos granulares

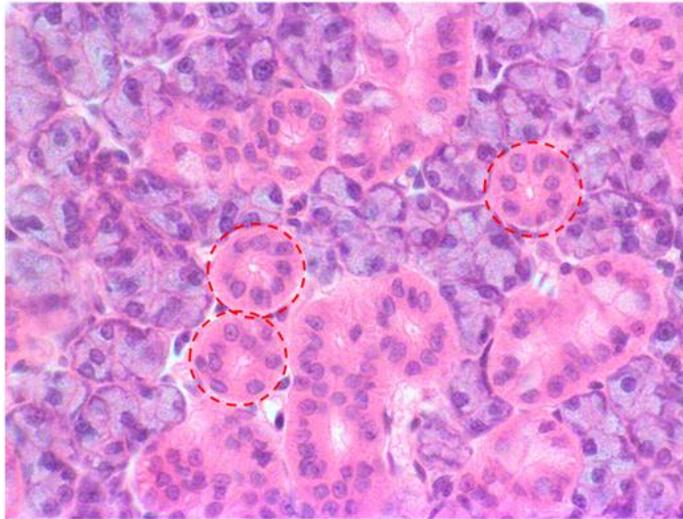
Los conductos granulares están ubicados entre el conducto intercaler y estriado (Figura 3). La pared de este conducto está revestida de un epitelio cilíndrico simple (Amano y cols. 2012).



**Figura 3. Fotomicrografía de conducto granular de las glándulas submandibulares en rata.** Tinción de Hematoxilina-Eosina (40x). Conductos granulares (líneas punteadas). Fuente propia.

### 1.5.7 Conductos estriados

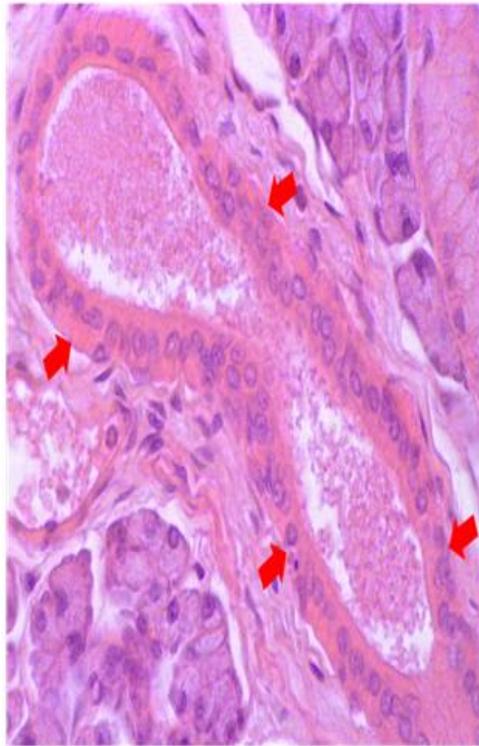
Los conductos estriados se caracterizan por contener mitocondrias entre sus abundantes pliegues basales, la que les confiere el aspecto estriado que exhiben al ser examinados con microscopio de luz. Estos conductos son los más prominentes, contienen numerosas vesículas claras en su citoplasma apical (Figura 4). Funcionan para la secreción y reabsorción de electrolitos y agua (Amano y cols. 2012).



**Figura 4. Fotomicrografía de conductos estriados de las glándulas submandibulares en rata.** Tinción de Hematoxilina-Eosina (40x). Conductos estriados (líneas punteadas). Fuente propia.

### **1.5.8 Conductos excretores**

Están revestidos por un epitelio cilíndrico simple, a medida que se van anastomosando con otros conductos interlobulillares, van aumentando de tamaño y el epitelio se convierte en pseudoestratificado, pudiendo contar con algunas células caliciformes intercaladas (Figura 5; Ross y Pawlina 2010).



**Figura 5. Fotomicrografía de conducto excretor de las glándulas submandibulares en ratona.** Tinción de Hematoxilina-Eosina (40x). Conducto excretor (flechas rojas). Fuente propia.

### **1.5.9 Estroma glandular**

El parénquima glandular está inmerso en tejido conectivo que lo sostiene y encapsula, este tejido conectivo se denomina estroma y a través de él se lleva a cabo la irrigación y la innervación de las glándulas salivales (Proctor y Carpenter 2014).

### **1.6 Vascularización e innervación**

Las ramas principales de las arterias y venas salivales se distribuyen por los tabiques, junto a los grandes conductos excretores. Las ramificaciones vasculares más pequeñas acompañan a los conductos de menor calibre y dan origen a una red capilar profusa que rodea a los acinos y conductos intralobulillares. La extensa irrigación es necesaria para la rápida secreción salival

que está compuesta por un alto porcentaje de agua. El control de la secreción salival se ejerce por el sistema nervioso autónomo (Garrett y Kidd1993). Los nervios parasimpáticos y simpáticos están en contacto con muchos tipos de células en las glándulas salivales, incluidas las células acinares, ductales, mioepiteliales y los vasos sanguíneos (Garrett y cols. 1991).

Las glándulas submandibulares, sublinguales y parótidas están inervadas por fibras simpáticas que proceden de ganglio cervical superior, la inervación parasimpática se da a través de los pares craneales VII (facial) y IX (glossofaríngeo). Dentro de las glándulas salivales, se localizan los axones simpáticos y parasimpáticos, los cuales se entrelazan y forman haces nerviosos que se distribuyen alrededor de los acinos y conductos (Proctor y Carpenter 2014).

Las interacciones entre los nervios simpáticos y parasimpáticos actúan de forma sinérgica sobre las glándulas salivales, particularmente cuando los niveles de estimulación son mínimos. Cada sistema provoca una respuesta celular diferente, la estimulación parasimpática provoca una secreción abundante y acuosa, mientras que la estimulación simpática produce mayor cantidad de proteínas y una mínima cantidad de salival espesa (Garrett y cols. 1991).

## **1.7 Saliva**

La saliva es una secreción líquida, transparente, insípida, de escasa viscosidad, levemente ácida, es estéril cuando sale del acino y pasa a través de diversos conductos, pero deja de serlo cuando entra a la cavidad bucal y se combina con los restos alimenticios y bacterias de la mucosa bucal (Mason y Chisholm 1975). El pH de la saliva es 6.8 – 7.2, su contenido es 99% agua y 1% moléculas orgánicas e inorgánicas (Edgar 1990). La saliva interviene en la mayoría de los eventos biológicos que ocurren en la cavidad bucal y contribuye al cuidado de la salud sistémica (Mason y Chisholm 1975).

En humanos, el volumen estimado de la saliva total secretada al día es 1 y 1.5L. Las contribuciones porcentuales de las glándulas salivales durante el flujo no estimulado diario es:

65% submandibular, 20% parotídea, 7% sublingual y aproximadamente el 8% de glándulas menores (Edgar 1990).

La cantidad de saliva secretada varía en los diferentes momentos del día, durante la vigilia en condiciones de reposo se produce un flujo salival escaso, suficiente para asegurar la protección de la mucosa bucal, pero la secreción de la saliva aumenta rápidamente durante las horas de comida, ya que la masticación es el principal estímulo para la salivación (Nauntofte y cols. 2003). La calidad de la saliva es de vital importancia ya que cada uno de sus componentes tiene características diferentes que desempeñan una serie de funciones específicas (Rudney 1995). La saliva está compuesta por componentes proteicos, glicoproteínas y enzimas como la amilasa, mucinas, lisozima, IgAs, proteínas ricas en prolina, cistatina, histatina, Anhidrasa carbónica secretora, factor de crecimiento nervioso y epidérmico, componentes orgánicos no proteicos (Urea, AMP Cíclico, Amoniac) y componentes inorgánicos como Na, K, Ca, Cloruros, fosfatos y bicarbonatos (Nauntofte y cols. 2003).

1. Bicarbonato, fosfatos y urea actúan para modular el pH
2. Proteínas y mucinas sirven para limpiar y tienen acción antibacteriana
3. El calcio, fosfato y proteínas trabajan en conjunto como un factor de anti solubilidad y modulan la desmineralización y remineralización
4. Inmunoglobulinas, proteínas y enzimas brindan acción antibacteriana

Funciones generales de la saliva son:

1. Lubricación y protección de la mucosa bucal
2. Preparación del bolo alimenticio, ayudando a humedecer los alimentos secos y contribuye a la masticación y deglución
3. Mantenimiento y protección de las estructuras de la cavidad bucal
4. Inicia el proceso de digestión y digiere los carbohidratos por la acción de la enzima digestiva “amilasa”
5. Mantiene el equilibrio ecológico de la cavidad oral a través de la acción de la lisozima

6. Regula pH de la cavidad bucal
7. Ayuda a eliminar restos alimenticios
8. Ayuda a la masticación, deglución del bolo alimenticio y facilita el habla

Las funciones principales de la saliva se relacionan, con humectación y lubricación, el procesamiento de los alimentos en la digestión y la protección de la cavidad bucal (Mandel 1987).

### **1.7.1 Humectación y lubricación**

Una de las funciones principales de las glándulas salivales es proporcionar un flujo continuo de saliva a la cavidad bucal para mantener la mucosa oral en una condición húmeda, de modo que sea menos susceptible a la abrasión, eliminación de microorganismos, células epiteliales descamadas y restos de alimentos por el proceso de deglución (Tabak 1990).

### **1.7.2 Participación de la saliva en el procesamiento de alimentos**

Debido al alto contenido acuoso y de mucinas sintetizadas por las glándulas mayores y menores facilitan la masticación, la formación del bolo alimenticio y su deglución (Tabak 1990).

Funciones digestivas: La proteína principal y también enzima digestiva en la saliva es la amilasa, esta enzima ayuda al desdoblamiento del almidón, su tiempo de acción es breve debido a que los alimentos se degluten rápidamente y el pH ácido del estómago detiene la acción de esta enzima (Iontcheva y cols. 1997). También ayuda a la degradación de restos alimenticios ricos en almidón que quedan retenidos entre los dientes (Tabak 1990).

### **1.7.3 Participación de la saliva en los mecanismos de protección y defensa de la cavidad bucal**

La película salival rica en mucinas recubre toda la superficie bucal, actúa modulando la flora microbiana bucal, ya que causan la aglutinación de las bacterias e impiden que se adhieran y

colonizan los tejidos bucales blandos y duros, facilita los movimientos linguales y la correcta fonación, proporciona una barrera efectiva contra las agresiones producidas por agentes irritantes como prótesis mal ajustadas, proporciona una función atemperante cuando se ingieren alimentos muy fríos o muy calientes, cuya presencia en boca produce un aumento rápido del flujo salival que contribuye a moderar dichas temperaturas y evitar un daño en la mucosa (Slomiany y cols. 1996).

La presencia de lisozima y calcio en la saliva hace que disminuya el tiempo de hemorragia en los tejidos bucales, debido a que estos activan la coagulación. También facilita la rápida cicatrización de las heridas bucales, debido a la acción de los factores de crecimiento nervioso y epidérmico (Rudney 1995).

La lisozima y lactoferrinas funcionando en conjunto, tienen un efecto inmediato sobre las bacterias bucales, afectando su capacidad de multiplicarse o causando su destrucción, así mismo, la cistatina inhibe el crecimiento de microorganismos con potencialidad de producir daño, la histatina es un bactericida, y la Anhidrasa carbónica secretora regula el pH y ayuda a la prevención en la formación de placa dentobacteriana (Dowd 1999).

Las IgAs poseen una acción aglutinante de virus y bacterias. Estas tienen la capacidad de unirse directamente a las células del epitelio de la mucosa bucal, incrementando su concentración local en las regiones que presentan inflamación como reacción ante la agresión microbiana (Dowd 1999).

Las proteínas ricas en prolina favorecen la remineralización del esmalte (Mandel 1987).

El bicarbonato/ ácido carbónico regula el pH de la cavidad bucal, si el pH es ácido es dañino para los tejidos blandos y en consecuencia habrá formación de úlceras, así mismo, se verán afectados los tejidos duros ya que ayudará a la desmineralización (Mandel 1987).

## **1.8 Mecanismo de secreción salival**

La estimulación parasimpática conduce a la liberación del neurotransmisor acetilcolina. Esta va a actuar sobre los receptores muscarínicos M3 ubicados en las células acinares salivales, esta unión causará un aumento en la concentración de calcio intercelular a través del sistema de segundo mensajero trifosfato de inositol (IP3). El aumento de calcio intercelular estimulará que las vesículas localizadas dentro de la célula se fusionen con la membrana apical de la célula y esta acción lleve a la secreción salival (Proctor y Carpenter 2014).

El neurotransmisor norepinefrina al unirse a los receptores alfa-adrenérgicos ( $\alpha$ ) de las células acinares también contribuirá a la producción de saliva pero en menor cantidad (Proctor y Carpenter 2014).

## **1.9 Mecanismo de secreción proteínas**

La secreción de proteínas es causada por la exocitosis de los gránulos de almacenamiento de proteínas en células acinares. Cuando las células se estimulan mediante nervios simpáticos se activan los receptores adrenérgicos beta1 ( $\beta_1$ ). La señalización intracelular se caracteriza por un aumento del AMP cíclico (AMPc) que activa la proteína quinasa A (PKA), provocando que los gránulos de almacenamiento se fusionen con la membrana apical de las células acinares y su contenido de proteína se libera en la saliva (Proctor y Carpenter 2014).

## **ANTECEDENTES**

Existe poca la información sobre los efectos del estrés sobre las glándulas salivales tanto en el humano como en modelos animales.

### **2.1 Estudio en humanos**

Un estudio realizado a 247 pacientes, se demostró que el estrés, depresión y ansiedad desempeñan un papel importante en la reducción de la tasa de flujo salival no estimulado (Gholami y cols. 2017). Este reporte concuerda con lo observado por Borahan, donde realizaron un estudio similar y mostraron que el estrés y la depresión desempeñan un papel importante en la reducción de la tasa de flujo salival y en el aumento de la incidencia de la xerostomía (Borahan y cols. 2012).

### **2.2 Modelos animales**

En ratas macho de la cepa Wistar de 10 semanas de edad, sometidos a estrés por inmovilización por 2 horas diarias durante 7 días y luz constante durante 20 días consecutivos, se observó una disminución en la ingesta de alimento hasta un 30%, asociado a la disminución del peso corporal y de las glándulas submandibulares. Así mismo, el volumen de la saliva secretada por estas glándulas aumentó durante 20 minutos (Alterman y cols. 2012).

## **JUSTIFICACIÓN**

La saliva juega un papel importante en la salud bucodental de los individuos, debido a que sus componentes en conjunto realizan diversas actividades con el propósito de mantener íntegras las estructuras blandas y duras de la cavidad bucal. Nauntofte y cols. (2003) mencionan “las funciones más importantes que realiza la saliva y encontramos lubricación y protección de la mucosa bucal, mantiene un equilibrio bacteriano y regula el pH.” Todas estas funciones tienen como objetivo principal omitir la aparición de caries dental y facilitar las actividades funcionales de la cavidad oral. Los niveles de segregación salival adecuados son indispensables para mantener una buena salud dental. Edgar (1990) afirma “las secreciones de las glándulas salivales son 20% en la parótida, 7% por la sublingual y 65% corresponde a la glándula submandibular siendo la glándula más importante en cuanto a su aportación”. Cuando la producción de saliva se modifica y disminuye, su composición se afecta y a su vez modifica las actividades bucales. Glore y cols. (2009) comentan “a esta disminución de saliva se le denomina xerostomía, síntoma que acompaña a diversas condiciones patológicas o padecimientos”. Y una de las causas que actualmente no se ha estudiado es el estrés.

El estrés daña directamente a las glándulas salivales, Thomson y cols. (2006) afirman “al ser modificada la composición y producción de saliva perjudica las actividades que se realizan dentro de la cavidad bucal como la masticación, deglución y fonación”. Tanasiewicz1 y cols. (2016) mencionan “Al ser modificada la composición salival habrá una disminución en la eliminación de bacterias bucales, lo cual ayudará a la aparición de caries dental, desmineralización, gingivitis”. Esto nos indica que habrá mayor susceptibilidad a presentar úlceras e infecciones fúngicas en la mucosa bucal.

Es escasa la información existente en humanos y son pocos los estudios en modelos animales que han estudiado los efectos que tiene el estrés en la composición de enzimas existentes en la saliva, pero se desconoce los efectos que tiene el estrés sobre la organización histológica de la glándula submandibular.

## **HIPÓTESIS**

El estrés crónico variable afecta la morfología en la glándula submandibular de la rata macho joven.

## **OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Analizar el efecto del estrés crónico variable sobre la morfología en la glándula submandibular de la rata macho joven.

### **5.2 Objetivos particulares**

1. Determinar el peso corporal del animal y el peso de las glándulas submandibulares
2. Determinar los niveles de corticosterona sérica
3. Determinar el número de núcleos en el acino, el área acinar de los acinos serosos y el área de los conductos estriados, granulares y excretores
4. Determinar la respuesta secretora de las glándulas salivales al estrés crónico variable

## **METODOLOGÍA**

### **6.1 Manejo de los animales**

Se utilizaron 16 ratas machos de la cepa Wistar de 21 días de edad, mantenidas en condiciones de bioterio con un fotoperiodo de 12/12 hrs, con ciclo luz-oscuridad invertido y temperatura de  $20\pm 2$  °C.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la regulación establecida en el Manual de Seguridad en el laboratorio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta y en la Norma Oficial Mexicana en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio NOM-062ZOO-1999.

### **6.2 Grupos experimentales**

Al día del destete se tomaron las ratas macho procedentes de madres diferentes y fueron colocadas aleatoriamente en jaulas independientes para formar dos grupos: ratas controles (C) y ratas con el estímulo de estrés crónico variable (ECV).

### 6.3 Diseño experimental

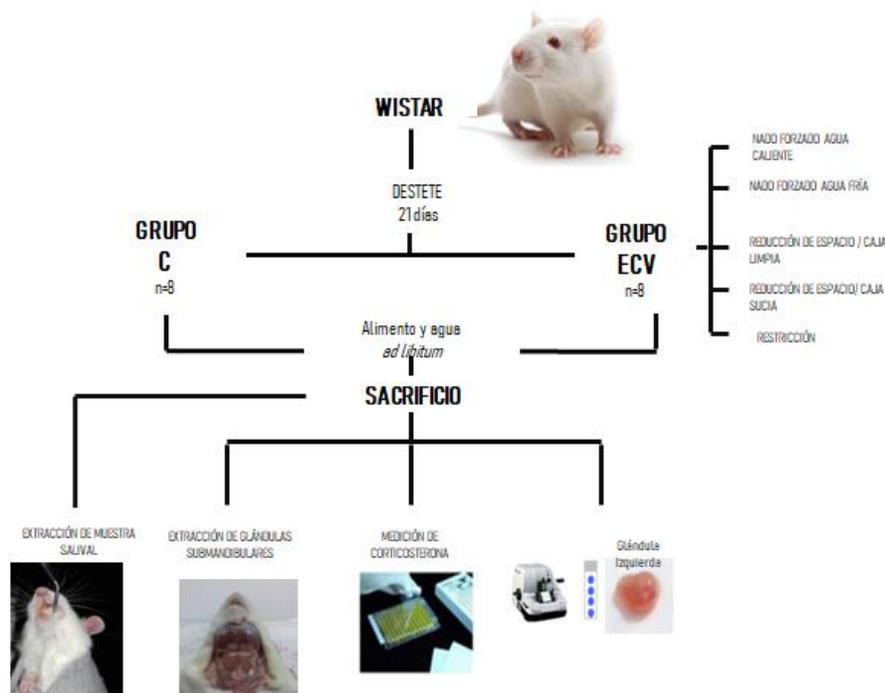


Figura 6. Diseño experimental. Grupo control (n=8). Grupo estrés crónico variable (n=8).

### 6.4 Protocolo de la dieta

Todas las ratas fueron alimentadas con dieta normal Chow 5001 de purina. Ambos grupos consumieron agua simple. El consumo de alimento y agua fue *ad libitum*. Durante el periodo de tratamiento, se realizó un registro diario del peso corporal, consumo de alimento y agua. El consumo de alimento y agua fue medido colocando una cantidad conocida en cada jaula obteniendo la cantidad remanente 24 horas después.

<b>Nutrimento</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>Kcal</b>
<b>Proteínas</b>	29	98.6
<b>Lípidos</b>	13	44.2
<b>Carbohidratos</b>	58	197.2
<b>Total</b>	100	340

**Tabla 1.** Aporte calórico y nutricional por cada 100 gramos de dieta Chow 5001 de purina.

### **6.5 Obtención de kilocalorías (Kcal) consumidas en el alimento**

Para la obtención de Kcal consumidas por el alimento:

1. Se obtuvo la ingesta de alimento por semana de vida de cada individuo.
2. Posteriormente todas las ingestas se promediaron para obtener los gramos consumidos por grupo por semana.
3. Estos gramos se multiplicaron por 3.4 que son las Kcal que nos proporciona 1 gramo de alimento Chow 5001.

### **6.6 Modelo del estrés crónico variable**

El modelo del estrés crónico variable inicio a los 51 días de edad.

Consistió en aplicar diferentes estresores individuales y grupales cada día en diferentes periodos de tiempo (un estresor por día) por cuatro semanas. No se aplicaron estresores durante los fines de semana.

Los estímulos estresores que se utilizaron fueron los siguientes: a) Reducción de espacio en caja limpia por 5 horas (se introdujeron ocho ratas en una jaula colectiva diseñada para cuatro o cinco ratas con aserrín limpio, cuyas dimensiones de la jaula son 50cm x 40cm x 21cm), b) Reducción de espacio en caja sucia por 5 horas (mismo procedimiento con aserrín sucio), c) Restricción durante 3 horas (se colocaron a las ratas individualmente en tubos de plástico de

16cm x 6cm con el objetivo de limitar su movimiento, el extremo más pequeño se mantuvo abierto para permitir que la rata respire y el extremo amplio del tubo fue sellado con cinta adhesiva), d) Nado forzado en agua fría durante 10 minutos (se colocaron a las ratas individualmente en un recipiente de plástico con dimensiones de 100cm de altura x 50cm de diámetro que contiene 75 cm de agua a 15°C), e) Nado forzado en agua caliente durante 10 minutos (mismo procedimiento con agua a 28°C) (Zeeni y cols. 2013)(Tabla 2).

<b>Lunes</b>	<b>Martes</b>	<b>Miércoles</b>	<b>Jueves</b>	<b>Viernes</b>
Reducción de espacio 8:00-13:00	Restricción 14:00-17:00	Nado forzado frío 13:00- 13:10	Nado forzado caliente 15:00-15:10	Reducción del espacio/caja sucia 10:00-15:00
Nado forzado caliente 15:00-15:10	Reducción del espacio/caja sucia 10:00-15:00	Reducción de espacio 8:00-13:00	Nado forzado frío 13:00- 13:10	Restricción 14:00-17:00
Reducción del espacio/caja sucia 10:00-15:00	Nado forzado frío 13:00- 13:10	Restricción 14:00-17:00	Reducción de espacio 8:00-13:00	Nado forzado caliente 15:00-15:10
Nado forzado frío 13:00- 13:10	Nado forzado caliente 15:00-15:10	Reducción del espacio/caja sucia 10:00-15:00	Restricción 14:00-17:00	Reducción de espacio 8:00-13:00

**Tabla 2.** Calendario que se aplicó a las ratas para el estímulo de estrés crónico variable, con el tipo de estrés y horario.

### **6.7 Extracción de muestra salival, obtención de muestras sanguíneas y extracción de glándulas submandibulares**

Al término del experimento, los animales fueron anestesiados con Pentobarbital Sódico 1mL/2.5 Kg de peso e inmediatamente se obtuvo una muestra de saliva, colocando rollos de algodón debajo de la lengua durante 10 minutos, posteriormente fueron sacrificados por decapitación para colectar dos tubos (13 x 100) de sangre.

Se colocó la cabeza de la rata en una caja Petri y se realizó la extracción de ambas glándulas submandibulares (derecha e izquierda) y fueron pesadas.

La sangre que se colectó en tubos se dejó reposar en baño maría durante 15 minutos, después se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos. El suero se separó para hacer alícuotas de 100µL de suero las cuales se conservaron en refrigeración, hasta la determinación de corticosterona.

### **6.8 Determinación de corticosterona sérica**

La concentración de corticosterona en suero se midió utilizando un kit Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: “Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas” (ELISA) disponible comercialmente, el cual se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (AssayDesigns, Inc., EE. UU.). La sensibilidad intraensayo e interensayo fue de 2,1 y 5,3 pg / mL, respectivamente.

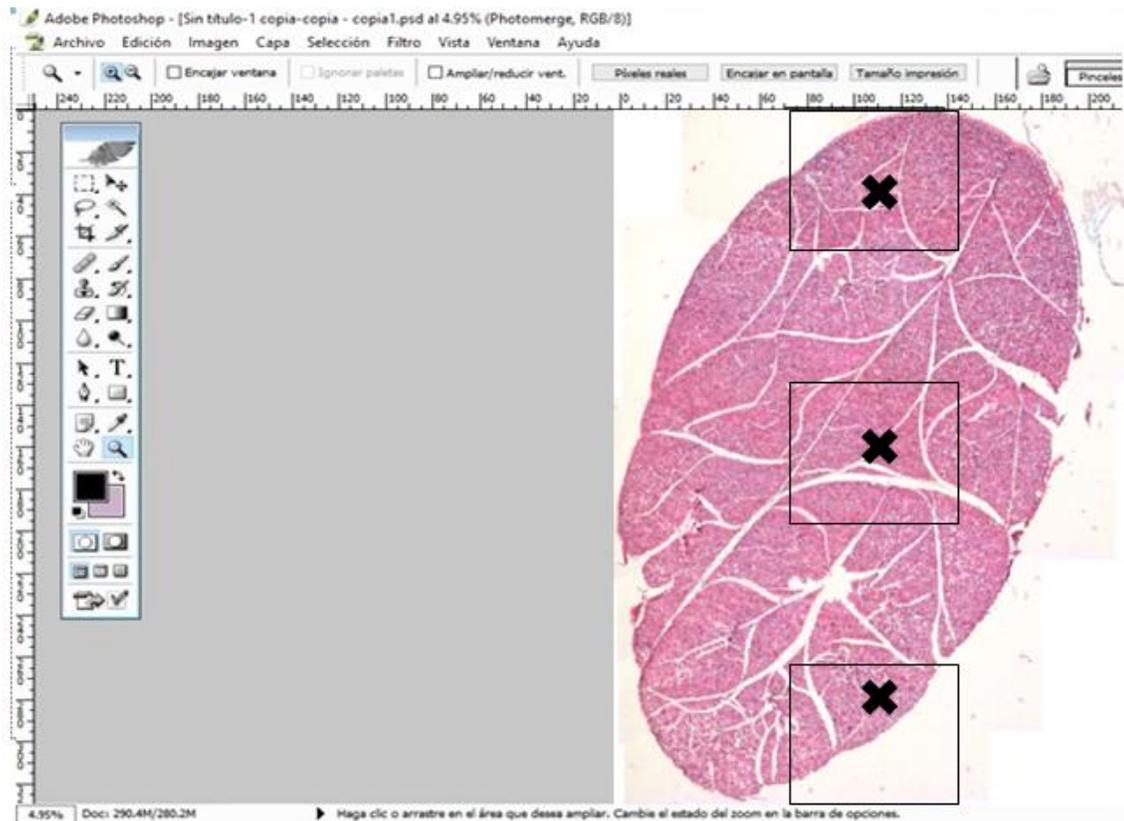
### **6.9 Análisis histológico de la glándula submandibular**

La glándula submandibular izquierda fue fijada con Bouin durante 24hrs. Posteriormente, el tejido fue deshidratado con alcohol etílico en concentraciones ascendentes (60, 70, 80, 96 y 100%), aclarado en xileno para infiltrarlo e incluirlo en Paraplast-Plus.

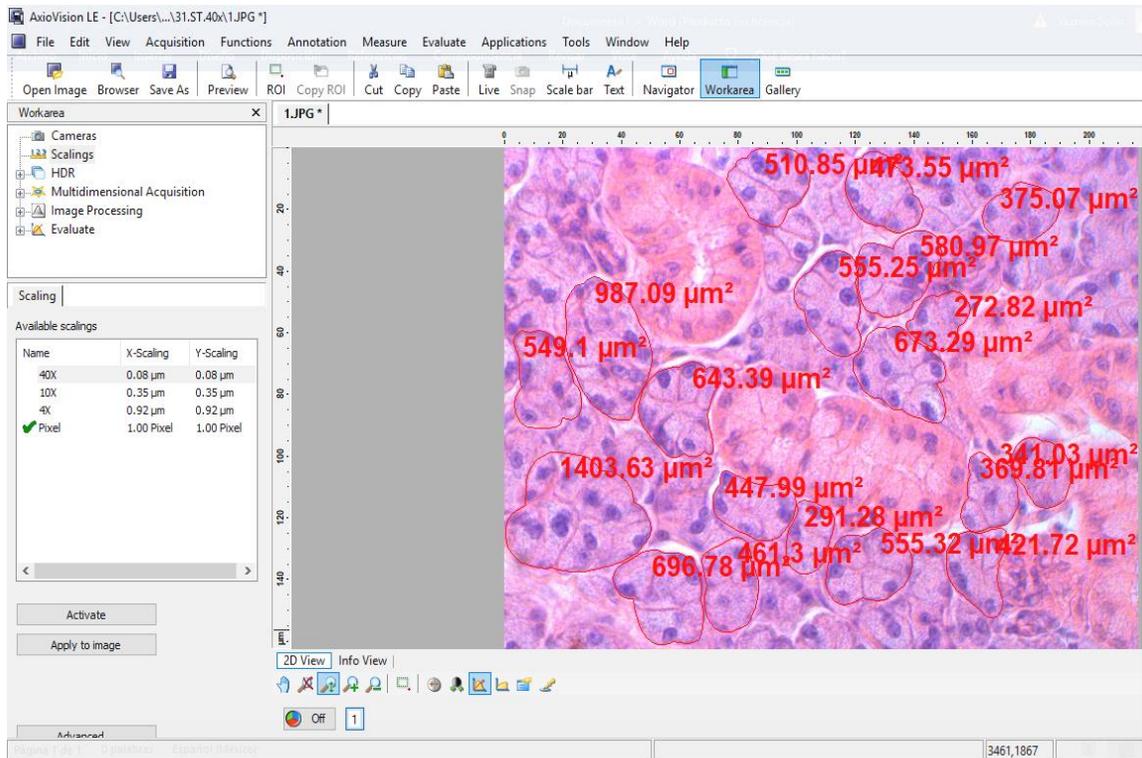
Se realizaron cortes longitudinales de 5  $\mu\text{m}$  de espesor que fueron obtenidos con un micrótomo, los cuales se colocaron en portaobjetos, 4 cortes por laminilla.

La laminilla n° 8 se utilizó para teñir Hematoxilina-Eosina para identificar y cuantificar los acinos serosos y su sistema ductal.

Se tomaron microfotografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles montada en un microscopio óptico Progres (a 4x, 40x y 100x) y con un analizador de Adobe Photoshop CS se realizaron reconstrucciones de los cortes para muestrear aleatoriamente, y seleccionar tres regiones en la glándula (figura 7), a los cuales, se les tomó una microfotografía a 40x para poder medir el área de los acinos, el sistema ductal y el conteo de linfocitos por campo (figura 8) con la ayuda de un analizador de Imágenes AxioVision REL 4.8 (ZeissInc 2007).



**Figura 7. Adobe Photoshop CS y cuadrícula.** Fotomicrografía de las reconstrucciones de los cortes histológicos de la glándula submandibular con tinción de Hematoxilina-Eosina (4x).



**Figura 8. AxioVision.** Fotomicrografía de los acinos serosos y medición del área acinar de la glándula submandibular con tinción de Hematoxilina–Eosina (40x).

## 6.10 Análisis estadístico

Para ambos experimentos, los valores obtenidos se analizaron en una base de datos por medio del programa GraphPad Prisma 5.01, a través de una prueba *t-Student*. Se realizó pruebas de distribución de frecuencias.

## RESULTADOS

De acuerdo con los objetivos de este estudio a continuación se describen los resultados de los grupos control y experimental.

### 7.1 Ingesta de alimento, agua, calorías totales y ganancia de peso corporal

Estas variables fueron registradas durante las semanas en que se aplicó el estrés crónico variable (4 semanas).

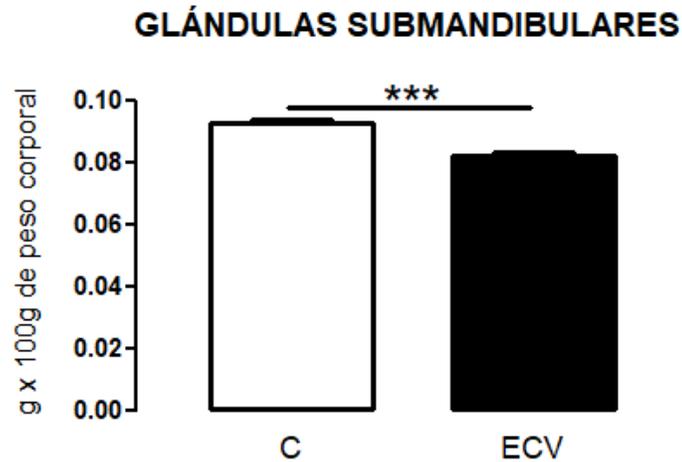
La ingesta de alimento, el consumo de agua e ingesta total de calorías por día disminuyó en el grupo ECV vs grupo C ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$ ;  $p < 0.05$ ; respectivamente; Tabla 3). Como consecuencia la ganancia de peso corporal del grupo ECV fue menor comparado con el grupo C ( $p < 0.001$ ; Tabla 3).

PARÁMETROS	C	ECV
Ganancia de peso corporal (g)	246.4 ± 9.362	205.8 ± 9.293**
Ingesta de alimento (g/día)	19.96 ± 0.4320	16.58 ± 0.7774**
Ingesta de agua (mL/día)	45.57 ± 1.152	37.51 ± 2.501*
Ingesta calórica (Kcals)	30.21 ± 1.352	26.36 ± 0.5521*
Ganancia de peso corporal (g)	246.4	205.8

**Tabla 3: Ganancia de peso corporal, ingesta de alimento, agua y calorías totales.** Se muestra la media ± e.e. Prueba *t-Student*. Diferencias significativas \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ . Grupo control (C) y grupo estrés crónico variable (ECV) (n=8/grupo).

## 7.2 Peso de las glándulas submandibulares

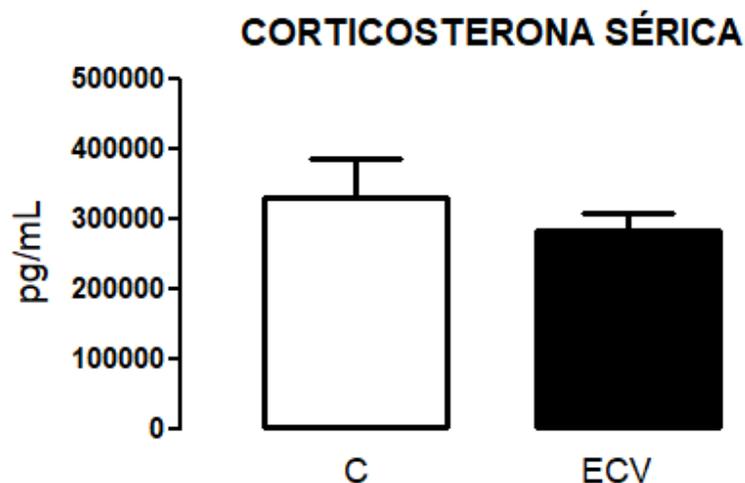
El peso de las glándulas submandibulares disminuyó en el grupo de ratas sometido a estrés crónico variable ( $p < 0.0001$ ) comparado con el grupo C (Figura 9).



**Figura 9: Peso de las glándulas submandibulares.** Se muestra la media  $\pm$  e.e. Prueba *t-Student*. Diferencias significativas, \*\*\* $p < 0.0001$ . Grupo control (C) y estrés crónico variable (ECV) ( $n=8$ /grupo).

## 7.3 Corticosterona sérica

No se encontró diferencias significativas en la medición de corticosterona sérica entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ) (Figura 10).

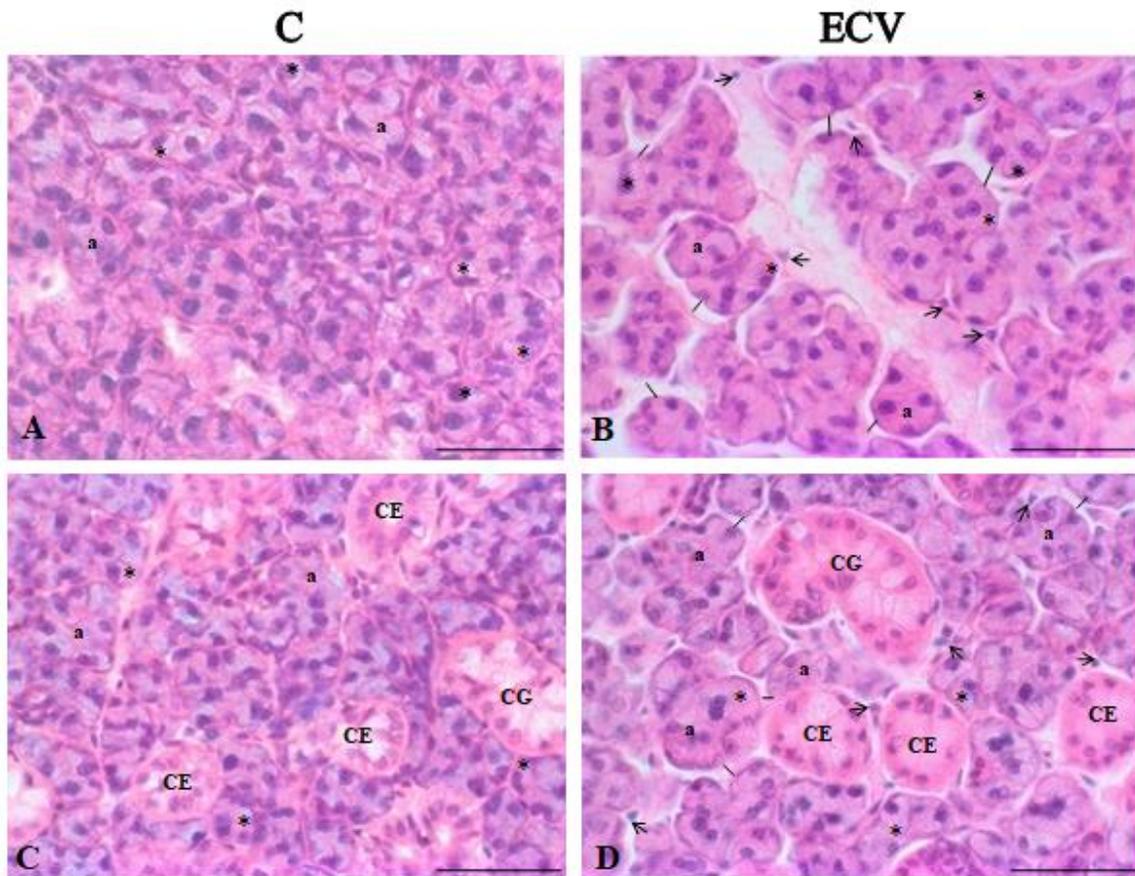


**Figura 10: Nivel de corticosterona sérica.** Se muestra la media  $\pm$  e.e. Prueba *t-Student*. Grupo control (C) y estrés crónico variable (ECV) (n=8/grupo).

#### 7.4 Características cualitativas de la glándula submandibular

La figura 11 (A y C) muestra las características histológicas de la glándula submandibular en una rata que pertenece al grupo control. En estas imágenes se puede apreciar los acinos serosos cuyas células epiteliales tienen un aspecto piramidal y la superficie basal amplia. Los núcleos están bien definidos, son esféricos y centrales. Los acinos son de distintas formas y se encuentran inmersos en tejido conjuntivo. Existe poco espacio extracelular entre los acinos. Se aprecian conductos estriados y granulares.

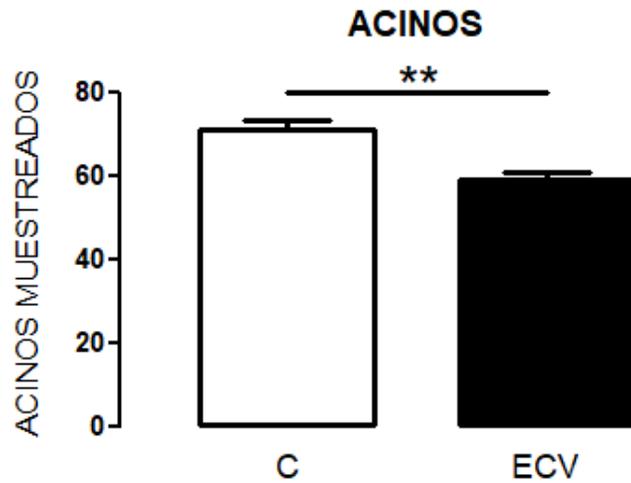
Las figuras 11 B y D muestran las características histológicas de la glándula submandibular en la rata experimental, en las imágenes se observaron cambios histológicos tales como, la presencia de linfocitos, el espacio extracelular es más evidente y un menor número de acinos que fue confirmado al realizar el análisis estadístico (grupo C  $71.13 \pm 2.263$ ; grupo ECV  $59 \pm 1.899$ ).



**Figura 11: Fotomicrografías de los acinos serosos presentes en la glándula submandibular y su sistema ductal. A y C) Células epiteliales (\*), acinos serosos (a), conducto granular (CG), conductos estriados (CE) en grupo control. B y D) Células epiteliales (.), acinos serosos (a), conducto estriado (CE), conducto granular (CG), linfocitos (flecha negra), espacio extracelular (línea negra) en grupo estrés crónico variable. Tinción de Hematoxilina–Eosina (40x). Las barras negras equivalen a 50  $\mu$ m.**

### 7.5 Número de acinos

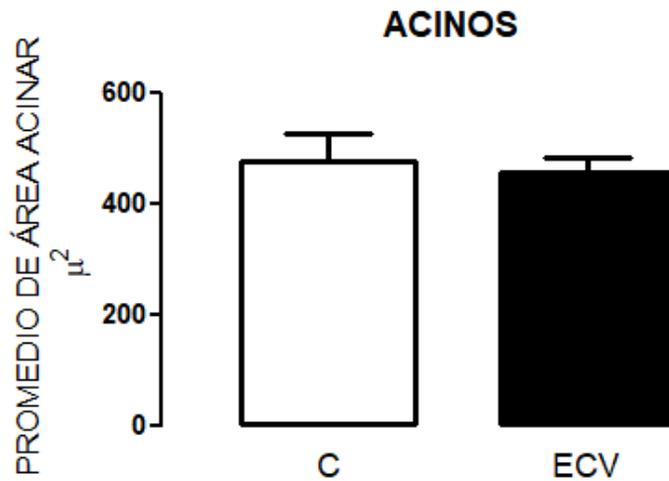
El número de acinos a los que se les midió el área acinar, fue menor en el grupo ECV comprado al grupo control ( $p < 0.001$ ; Figura 12).



**Figura 12: Número de acinos muestreados.** Se muestra la media  $\pm$  e.e. Prueba *t-Student*. Diferencias significativas,  $**p < 0.001$ . Grupo control (C) y estrés crónico variable (ECV) (n=8/grupo).

### 7.6 Promedio de área acinar

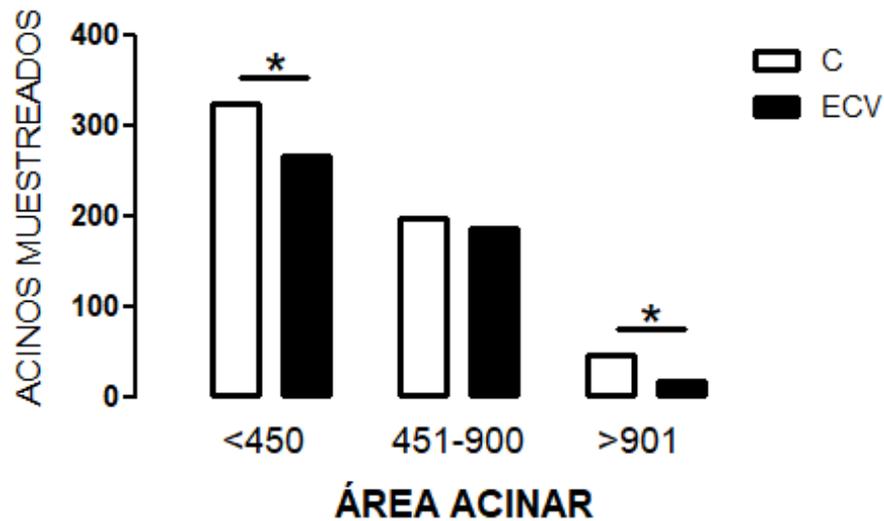
El promedio del área acinar por animal fue similar entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ; Figura 13).



**Figura 13: Promedio de área acinar.** Se muestra la media  $\pm$  e.e. Prueba *t-Student*. Grupo control (C) y estrés crónico variable (ECV) (n=8/grupo).

### 7.7 Área acinar

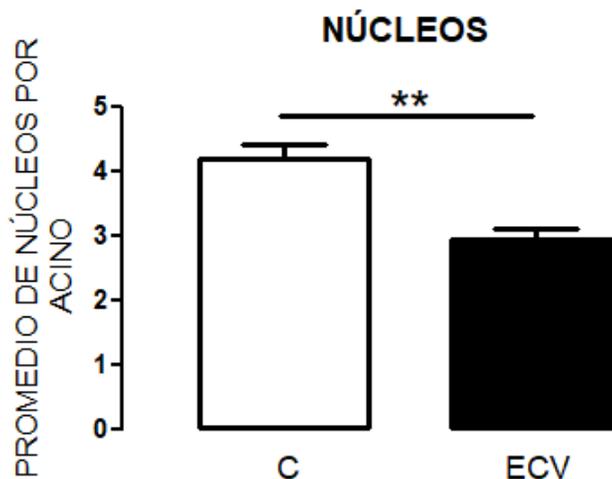
Al clasificar los acinos en tres tamaños, encontramos que los acinos que midieron <450 (Chicos) en el grupo ECV fueron menos comparados con el grupo C ( $p<0.05$ ). En cuanto a los acinos que midieron 451-900 (Medianos) no se observaron diferencias entre ambos grupos ( $p>0.05$ ). Los acinos que midieron >901 (Grandes) en el grupo ECV fueron menos vs el grupo C ( $p<0.05$ ) (Figura 14).



**Figura 14: Número de acinos por tamaño.** Se muestra la media  $\pm$  e.e. Prueba *t-Student*. Diferencias significativas,  $*p<0.05$ . Grupo control (C) y estrés crónico variable (ECV) ( $n=8$ /grupo).

### 7.8 Número de núcleos dentro de los acinos

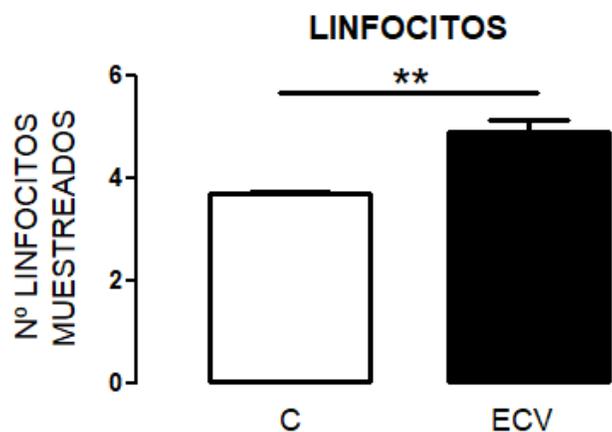
Con respecto al número de núcleos por acino, en el grupo ECV fueron menores comparados con el grupo C ( $p < 0.001$ ; Figura 15).



**Figura 15: Promedio de núcleos por acino.** Se muestra la media  $\pm$  e.e. Prueba *t-Student*. Diferencias significativas,  $**p < 0.001$ . Grupo control (C) y estrés crónico variable (ECV) ( $n=8$ /grupo).

### 7.9 Número de linfocitos

El número de linfocitos aumento en el grupo de ratas sometido a estrés crónico variable ( $p < 0.001$ ) comparado al grupo control (Figura 16).



**Figura 16: Número de linfocitos por campo.** Se muestra la media  $\pm$  e.e. Prueba *t-Student*. Diferencias significativas,  $**p < 0.001$ . Grupo control (C) y estrés crónico variable (ECV) (n=8/grupo).

### 7.10 Análisis histológico del sistema ductal de la glándula submandibular

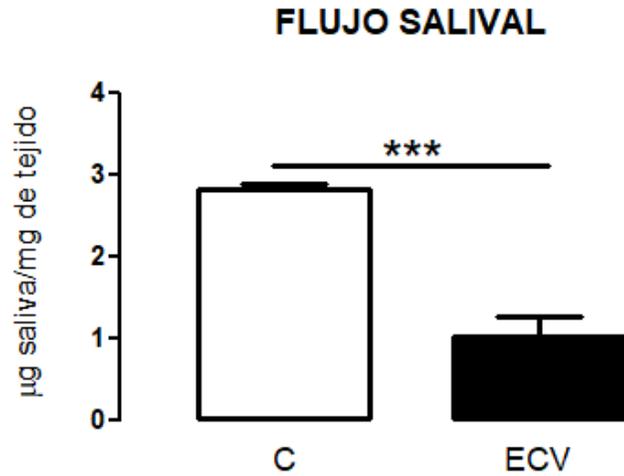
El número de conductos granulares, estriados y excretores a los que se les midió el área fueron similares entre ambos grupos. En cuanto a los núcleos que fueron muestreados en los conductos granulares y estriados no se encontraron diferencias entre el grupo ECV comparado con el grupo C. El promedio del área de los conductos granulares, estriados y excretores no se observan diferencias entre ambos grupos (Tabla 4).

SISTEMA DUCTAL	C	ECV
Número de conductos granulares	3.125 $\pm$ 0.3981	3.250 $\pm$ 0.3660
Número de conductos estriados	6.143 $\pm$ 0.8289	5.000 $\pm$ 0.8729
Número de conductos excretores	6.250 $\pm$ 0.5590	4.500 $\pm$ 0.8452
Numero de núcleos muestreados en conducto granular	35.50 $\pm$ 6.015	32.50 $\pm$ 4.436
Núcleos muestreados en conducto estriado	45.14 $\pm$ 4.642	35.43 $\pm$ 6.244
Área de los conductos granulares	1646 $\pm$ 249.9	1524 $\pm$ 252.6
Área de los conductos estriados	900.5 $\pm$ 101.9	745.0 $\pm$ 111.0
Área de los conductos excretores	4583 $\pm$ 906.9	2955 $\pm$ 251.3

**Tabla 4: Análisis histológico del sistema ductal de la glándula submandibular.** Se muestra la media  $\pm$  e.e. Prueba *t-Student*. Grupo control (C) y grupo estrés crónico variable (ECV) (n=8/grupo).

### 7.11 Flujo salival

El estrés crónico variable disminuyó la respuesta secretora de las glándulas salivales en el grupo experimental cuando se compara con el grupo control ( $p < 0.0001$ ; Figura 17).



**Figura 17: Flujo salival.** Se muestra la media  $\pm$  e.e. Prueba *t-Student*. Diferencias significativas, \*\*\* $p < 0.0001$ . Grupo control (C) y estrés crónico variable (ECV) ( $n=8$ /grupo).

## DISCUSIÓN

El estrés crónico variable disminuyó la ingesta de alimento, agua, calorías totales, peso corporal y las glándulas submandibulares. A pesar de que los niveles de corticosterona no fueron afectados.

Los efectos que tiene el estrés sobre el peso corporal están determinados tanto por la gravedad del estrés como por la percepción de cada individuo (Levine y Morley 1981). En ratas, los factores estresantes leves como el pellizco de la cola, no afecta la ingesta de alimento; mientras que, los factores estresantes más severos, como los que se aplicamos en este estudio, disminuyen la ingesta de alimento y tienen efectos a largo plazo sobre el peso corporal y el peso de las glándulas submandibulares. Así, ratas jóvenes expuestas a estrés por inmovilización y exposición constante a la luz induce una reducción en la ingesta de alimento afectando el peso corporal y el peso de las glándulas submandibulares (Alterman y cols. 2012).

En ratas adultas la exposición a estrés por restricción durante 3 horas por 3 días consecutivos también induce una disminución en la ingesta de alimento y peso corporal (Harris y cols. 1998), en concordancia con resultados reportados en ratas adultas expuestas a estrés por desarmonía oclusal provoca una tendencia a disminuir el peso corporal (Irie y cols. 2010). Así mismo en ratas jóvenes a las cuales se les aplicó estrés por restricción durante 4 semanas se observa una reducción en la ingesta de alimento y el peso corporal (Corona-Pérez y cols. 2017).

El estrés crónico variable no afectó los niveles de corticosterona sérica. Estos resultados no concuerdan con lo reportado en ratas estresadas por desarmonía oclusal, el cual aumenta los niveles plasmáticos de corticosterona (Irie y cols. 2010) ni con los resultados de ratas sialoadenectomía y con estrés crónico por restricción (Saruta y cols. 2012). Previamente, hemos mostrado que la concentración de corticosterona sérica no es afectada por estrés crónico aplicando restricción de movimiento en ratas jóvenes adultas (Corona-Pérez y cols. 2017) el cual sugiere que las ratas se adaptan al estímulo del estrés (Zardooz y cols. 2006). Es posible que la hormona adrenocorticotrópica esté elevada y, a su vez, regule el exceso de

corticosterona (Viau y cols. 1993). A pesar de ello, hubo un efecto del estrés sobre el arreglo histológico de la glándula submandibular y el volumen salivar, lo que sugiere que la respuesta simpática fue intensa y hubo una elevada activación simpática y disminución del parasimpático; Ello indica que al disminuir el sistema parasimpático, los niveles de saliva secretada por las glándulas salivales disminuyen (Payne y cols. 2015). En apoyo a ello, las glándulas salivales están bajo control de la inervación autónoma (Takakura y cols. 2003).

Es importante resaltar que la organización histológica de la glándula submandibular en humanos es diferente en comparación con la rata, debido a que en el humano esta glándula es mixta (acinos serosos, mucosos y mixtos) y que en la rata solo encontramos acinos serosos, por tal motivo no debe haber confusión en esta información (Lichtman 1977; Osailan y cols. 2006; Miletich 2010; Amano y cols. 2012; Nair y cols. 2016). Nuestros hallazgos contribuyen a aclarar que el complejo submandibular-sublingual consta de dos glándulas salivales diferentes. Estas se desarrollan en estrecha asociación, terminando en la misma ubicación anatómica y compartiendo la misma cápsula de tejido conectivo, con características histológicas distintas como, por ejemplo, el tipo de acinos presentes en cada una de ellas. Así la glándula submandibular (serosos), glándula sublingual (mucosos), así mismo la presencia del conducto granular exclusivamente en la glándula submandibular, lo cual coincide con previos estudios (Amano y cols. 2012).

El estrés crónico variable disminuyó el número de acinos y núcleos. Esto podría deberse a que un estrés prolongado o muy intenso provoca que las células epiteliales no permitan la función adecuada de la producción, secreción y la calidad de la saliva y proteínas en el retículo endoplásmico, alterándose la homeostasis de calcio (Vakifahmetoglu y cols. 2017; Lindholm y cols. 2017; Enger y cols. 2014). La disminución de calcio puede atribuirse al déficit de receptores de inositol trifosfato observado en las células epiteliales (Teos y cols. 2015). La interacción funcional de los receptores de inositol trifosfato tipo 1 con la proteína chaperona producida durante el estrés en el retículo endoplásmico (78KD), conduce a una actividad del canal deteriorada y apoptosis celular (Higos y cols. 2010). La regulación positiva de la autofagia durante el estrés en el retículo endoplásmico parece ser una respuesta esencial de supervivencia y es necesaria para la eliminación de proteínas gravemente afectadas o

fragmentadas (Hoyer y Jaattels 2007). Sin embargo, el estrés intenso, prolongado o no resuelto en el retículo endoplásmico puede iniciar mecanismos de muerte celular dependientes de la autofagia y la activación del proceso apoptótico intrínseco (Song y cols. 2017). El aumento de linfocitos en el grupo experimental corrobora una reacción autoinmune, que culmina en un proceso inflamatorio inducido por estrés y esto, a su vez, conduce a una apoptosis celular (Panaretakis y cols. 2009). Con nuestros resultados no podemos sugerir que los cambios histológicos observados en la glándula submandibular puedan deberse a una apoptosis, se requiere más información para aclarar este punto.

No encontramos cambios con respecto a la parte histológica de los conductos granulares, estriados, excretores y la parte ductal. Sin embargo, los acinos con área chica y grande fueron menos en el grupo experimental, lo cual nos puede indicar que habrá menor número de células epiteliales y esto nos conlleva a menor producción de saliva.

Es importante mencionar que no existen trabajos que describan la histología de esta glándula en ninguna condición de estrés. Nuestros resultados sugieren que los cambios podrían asociarse a la disminución de saliva.

El flujo salival liberado por las glándulas salivales disminuyó en el grupo experimental, lo cual no concuerda con los resultados de Alterman y cols. 2012, quienes observaron un aumento en el volumen de saliva en las ratas sometidas a estrés por inmovilización comparadas con el grupo control. Posiblemente la aplicación de pilocarpina exclusivamente en el grupo experimental, el cual es un fármaco agonista colinérgico que actúa incrementando el flujo salival. Es posible que el estrés crónico variable modifique la función del sistema nervioso autónomo, aumentando la respuesta del sistema simpático y disminuyéndola actividad del sistema parasimpático, lo que induce un aumento en la de producción de proteínas fragmentadas o afectadas y la disminución del volumen salival (Cozma y cols. 2017).

## CONCLUSIONES

- Los niveles de corticosterona sérica no inducen directamente los cambios en la glándula submandibular.
- El estrés crónico variable afecta la morfología de la glándula submandibular, disminuyendo la cantidad de saliva. De tal manera que el estrés podría, afectar actividades bucales y disminuir la eliminación de bacterias, lo que favorecería la aparición de patologías bucales como caries dental, desmineralización y gingivitis.

## **PERPECTIVAS**

Debido a la ausencia de acinos y núcleos se sugiere realizar un estudio en el cual se pueda verificar si en la glándula submandibular hay un proceso de apoptosis celular. Así mismo, investigar si otra hormona pudiera estar afectando a la glándula submandibular, como por ejemplo la aldosterona, la cual es aumentada por el estímulo del estrés.

## REFERENCIAS

1. Wiener RC, Wu B, Crout R, Wiener M, Plassman B, Kao E, McNeil D. 2010. Hyposalivation and xerostomia in dentate older adults. *J Am Dent Assoc* 141: 279–284.
2. Seifert G, Miehke A, Haubrich J, Chilla R. 1986. Disorders of secretion. Diseases of the salivary glands: Pathology, diagnosis, treatment. Stuttgart, Germany: Theme Verlag Theem. p. 71-76.
3. Glore RJ, Spiteri-Staines K, Paleri V. 2009. A patient with dry mouth. *ClinOtolaryngol* 34: 358–363.
4. Guzik L, Kamysz E. 2009. Xerostomia – więcej niż suchość jamy ustnej. *Farmakoterapia* 6: 411–414.
5. Porter SR, Scully C, Hegarty AM. 2004. An update of the etiology and management of xerostomia. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodontics* 97:28-46.
6. Jillian W, Wang EA, Nasim Fazel MD. 2017. Etiology, evaluation and management of xerostomia. *Clinics in Dermatology* 35: 468–476.
7. Narhi TO, Meurman JH, Ainamo A. 1999. Xerostomia and hiposalivation: causes, consequences and treatment in elderly. *Drug Aging* 15:103-16.
8. Thomson WM, Lawrence HP, Broadbent JM, Poulton R. 2006. The impact of xerostomia on oral-health-related quality of life among younger adults. *Health and quality of life outcome* 4:86.
9. Tanasiewicz M, Hildebrandt T, Obersztyn I. 2006. Xerostomia of Various Etiologies: A Review of the Literature. *Adv Clin Exp Med* 25, 1: 199–206.
10. Sandi C, Venero C, Cordero MI. 2001. Estrés, Memoria y Trastornos Asociados. Barcelona. Ed. Ariel.
11. Reyes-Gómez LV, Ibarra-Zavala D, Torres-López ME, Razo-Sánchez RS. 2012. El estrés como un factor de riesgo en la salud; análisis diferencial entre docentes de universidades públicas y privadas. *Revista Digital Universitaria*. Volumen 13 Número 7. ISSN: 1067-6079.
12. Fabrice-Duval MD, Félix-González MD, Hassen-Rabia MD. 2010. Neurobiología del estrés. *Rev Chil Neuro-Psiquiat* 48 (4): 307-318.

13. De Luca PA, Sánchez AM, Pérez-Olan G, Leija-Salas L. 2004. Medición integral del estrés crónico. *Revista Mexicana De Ingeniería biomédica*. Pp 60-66.
14. Kim JE, Cho BK, Cho DH, Parque HJ. 2013. Expression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in common skin diseases: evidence of its association with stress-related disease activity. *Acta Derm Venereol* 93 (4): 387-93.
15. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. 2009. Efectos del estrés a lo largo de la vida en el cerebro, el comportamiento y la cognición. *Nature Reviews Neuroscience* 10:434–445.
16. Dhabbar FS. 2002. Aumento de la función inmune inducido por el estrés: el papel de las hormonas del estrés, el tráfico de leucocitos y las citoquinas. *Brain Behav Immun* 16: 785-798.
17. Tsigos C, Chrousos GP. 2002. Eje hipotalámico-pituitario-adrenal, factores neuroendocrinos y estrés. *J Psychosom Res* 53: 865-871.
18. Payne P, Levine PA, Crane-Godreau MA. 2015. Experiencias somáticas: el uso de la interocepción y la propiocepción como elementos centrales de la terapia del trauma. *Frente Psychol* 6, 93.
19. Contreras C, Jiménez LF, Ortiz MJ, Moret de González Y, González JM. 2008. Ubicación anatómica de las glándulas salivales linguales o glándulas salivales menores presentes en la lengua. Vol. 46 N° 2.
20. Carlson GW. 2000. The salivary glands: embryology, anatomy, and surgical applications. *SurgClin North Am* 80: 261– 273.
21. Khojasteh SMB, Delashou M. 2012. Microscopic anatomy of the parotid and submandibular salivary glands in Europe anhamster (*Cricetus cricetus* L.). *Internat Res J Applied Basic Scienc* 3: 1544-1548.
22. Bhattarai KR, Junjappa RP, Handigund M, Kim HR, Chae HJ. 2018. The imprint of salivary secretion in autoimmune disorders and related pathological conditions *Rev J*. 1-2.
23. Miletich I. 2010. Introduction to salivary glands: Structure, function and embryonic developments. *Front Oral Biol*. Vol. 14, pp 1–20.
24. Gómez de Ferrais ME, Campos A. 2002. *Histología y embriología bucodental*. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana: México.

25. Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K. 2012. Anatomy and Histology of Rodent and Human Major Salivary Glands. *Acta Histochem. Cytochem* 45 (5): 241–250.
26. Joven JA, Van-Lennep EW. 1978. La morfología de las glándulas salivales. Academic Press; Londres:
27. Redman RS. 1994. Myoepithelium of salivary glands. *Microsc Res Tech* 27: 25-45.
28. Ross MH, Pawlina W. 2010. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Quinta edición: Editorial Médica Panamericana.
29. Proctor GB, Carpenter GH. 2014. Salivary secretion: mechanism and neural regulation. *Monogr Oral Sci* 24: 14.
30. Garret JR, Kidd A. 1993. La inervación de las glándulas salivales como lo revelan los nódulos morfológicos. *Microsc. Res. Tecnología* 26: 75-91.
31. Garrett JR, Suleiman AM, Anderson LC, Proctor GB. 1991. Respuestas secretoras en conductos granulares y acinos de glándulas submandibulares in vivo a la estimulación nerviosa simpática o parasimpática en ratas. *Cell Tissue Res* 264: 117-126.
32. Mason DK, Chisholm DM. 1975. *Salivary glands in health and disease*. London, United Kingdom: Saunders pp. 37-135.
33. Edgar WM. 1990. Saliva y salud dental. Implicaciones clínicas de la saliva: informe de una reunión de consenso. *Br Dent J*, 169 pp. 96 – 98.
34. Nauntofte B, Tenevuo JO, Lagerlof F. 2003. Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O and Kidd E, eds. *Dental Caries. The disease and its clinical management*. Oxford. Blackwell Munksgardpp. 7-29.
35. Rudney JD. 1995. ¿Influye la variabilidad en las concentraciones de proteínas salivales en la ecología microbiana oral y la salud oral? *CritRev Oral BiolMed*, pp. 343-367.
36. ID Mandel. 1987. La función de la saliva. *J Dent Res*, 66 pp. 623 – 627.
37. Tabak LA. 1990. Structure and function of human salivary mucins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1:229-34.
38. Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF. 1997. Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res* 76:734-43.

39. Slomiany BL, Murty VL, Poitrowski J, Slomiany A. 1996. Salivary mucins in oral mucosal defense. *Gen Pharmacol* 27:761-71.
40. Down FJ. 1999. Saliva and dental caries. *Dent Clin North Am* 43:579-97.
41. Gholami N, Sabzvari BH, RazzaghiA, Salan S. 2017. Efecto del estrés, la ansiedad y la depresión en la tasa de flujo salival no estimulado y la xerostomía. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 11 (4): 247–252.
42. Borahan MO, Pekiner FN, Atalay T. 2012. Evaluación de los efectos de los factores psicológicos en la saliva. *Revista de Marmara University Institute of Health Sciences* 2 (supl. 1): S8-S14.
43. Alterman A, Mathison R, Coronel CE, Stroppa MM, Finkelberg AB, Gallara RV. 2012. Functional and proteomic analysis of submandibular saliva in rat exposed to chronic stress by immobilization or constant light. *Sciverse Science Direct* 663- 669.
44. Zeeni N, Daher C, Fromentin G, Tome D, Darcel N, Chaumontet C. 2013. A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Informa Healthcare USA, Inc.* 16(2): 211–219.
45. Levine AS, Morley JE. 1981. Stress-induced eating in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 241: R72–6.
46. Harris RBS, Zhou J, Youngblood BD, Rybkin II, Smagin GN, Ryan D. 1998. Efecto del estrés repetido sobre el peso corporal y la composición corporal de ratas alimentadas con dietas bajas en grasas y altas en grasas. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 275, pags. R1928 – R1938.
47. Irie K, Ekuni D, Tomofuji T, Azuma T, Endo Y, Kasuyama K, Morita M. 2010. Occlusal disharmony induces BDNF level in rat submandibular gland. *Archives of oral biology* 56 (2011) 35-40.
48. Corona-Pérez A, Díaz-Muñoz M, Cuevas-Romero E, Luna-Moreno D, Valente-Godínez E, Vázquez-Martínez O, Martínez-Gómez M, Rodríguez-Antolín J, Nicolás-Toledo L. 2017. Interactive effects of chronic stress and a high sucrose diet on nonalcoholic fatty liver in young adult male rats.
49. Saruta J, Lida M, Kondo Y, Hayashi T, Hori M, Sato S, Tsukinoki K. 2012. Chronic Stress Induces Neurotrophin-3 in Rat Submandibular Gland. *Yonsei Med J* 53(6): 1085-1092.

50. Zardoos H, Zahedi-Asl S, Gharib-Naseri MK, Hedayati M. 2006. Effect of chronic restraint stress on carbohydrate metabolism in rat. *Physiol Behav* 89:373–378.
51. Viau V, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. 1993. Increased Plasma ACTH Responses to Stress in Nonhandled Compared with Handled Rats Require Basal Levels of Corticosterone and Are Associated with Increased Levels of ACTH Secretagogues in the Median Eminence. *The Journal of Neuroscience*, 733: 1097-1105.
52. Takakura AC, Moreira TS, Laitano SC, De Luca LA, Júnior, Renzi A, Menani JV. Los receptores muscarínicos centrales señalan la salivación inducida por pilocarpina. *J Dent Res*. 2003; 82: 993–997.
53. Cole MA, Kim PJ, Kalman BA, Spencer RL. 1999. Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. *Psycho neuroendocrinology* 25 (2000) 151–167.
54. Lichtman JW. 1977. The organization of synaptic connexions in the rat submandibular ganglion during postnatal development. *J Physiol*, 273, pp 155-177.
55. Osailan SM, Proctor GB, McGurk M, Paterson KL. 2006. Intraoral duct ligation without inclusion of the parasympathetic nerve supply induces rat submandibular gland atrophy. *Int. J. Exp. Path.* 87, 41-48.
56. Nair RP, Zheng C, Dossabhoy GS. 2016. Retroductal Submandibular Gland Instillation and Localized Fractionated Irradiation in a Rat Model of Salivary Hypofunction. *J. Vis. Exp.* (110), e53785, doi: 10.3791/53785.
57. Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. 2017. El papel de las mitocondrias en el metabolismo y la muerte celular. *Biochem Biophys Res Commun* 482: 426-431.
58. Lindholm D, Korhonen L, Eriksson O, Koks S. 2017. Recent insights into the role of unfolded protein response in ER stress in health and disease. *Front Cell Dev Biol* 5, 48.
59. Enger TB, Aure MH, Jensen JL, Galtung HK. 2014. Calcium signaling and cell volumen regulation are altered in Sjogren´s síndrome. *Acta Odontol Sacnd* 72: 549-556.
60. Teos LY, Zhang Y, Cotrim AP, Swaim W, Won JH, Ambrus J, Shen L, Bebris L, Grisius M, Jang S. 2015. El déficit de IP3R subyace a la pérdida de líquido salival en el síndrome de Sjögren. *Sci Rep.* 5. 13953

61. Higos T, Hamada K, Hisatsune C, Nukina N, Hashikawa T, Hattori M, Nakamura T, Mikoshiba K. 2010. Mechanism of ER stress induced Brain damage by IP3 receptor. *Neuron* 68: 865-878.
62. Hoyer-Hansen M, Jaattela M. 2007. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* 14: 1576-1582.
63. Song S, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q. 2017. Crosstalk of autophagy and apoptosis: involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J Cell Physiol* 232, 2977-2984.
64. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, Durchschlag M, Joza N, Pierron G, Van Endert P. 2009. Mechanisms of pre-apoptotic chaperone exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 28, 578-590.
65. Cozma S, Dima-Cozma LC, Ghiciuc CM, Pasquali V, Saponaro A, Patacchioli FR. 2017. Salivary cortisol and  $\alpha$ -amylase: subclinical indicators of stress as cardiometabolic risk. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 50(2).

## **GLOSARIO DE TÉRMINOS**

**ECV**      ESTRÉS CRÓNICO VARIABLE

**C**        CONTROL

**CRH**     HORMONA LIBERADORA DE CORTICOTROPINA

**ACTH**    HORMONA ADRENOCORTICOTRÓPA

**SNA**     SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO

**IP3**      INOSITOL TRIFOSFATO

**HHA**     EJE HIPOTÁLAMO HIPOFISIARIO ADRENAL

**PKA**     PROTEÍNA QUINASA

**A**        ACINO

**CG**      CONDUCTO GRANULAR

**CE**      CONDUCTO ESTRIADO

**IgAs**    INMUNOGLOBULINAS A

