



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Estudio histoquímico de glicoconjugados en glándulas salivales de ratones alcohólicos crónicos.
(Modelo experimental)

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

CLAUDIO VIVEROS AMADOR

DIRECTORA DE TESIS:

C.D. MARIA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN

TUTOR:

DR. JUAN CARLOS CUAUHTEMOC HERNÁNDEZ GUERRERO

ASESOR

DR. JESÚS DANIEL REMBAO BOJÓRQUEZ

(Instituto Nacional De Neurología SSA)

Jesús Daniel Rembao Bojórquez
Hernández

MÉXICO D. F

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haberme permitido llegar a este día y por ayudarme a cumplir una de mis metas.

A mis padres por el ejemplo y la enseñanza de trabajo. Por su infinito amor, por su humildad y por enseñarme siempre a seguir adelante.

A mis hermanos Adán, Marco y Rubén por que no hay mejor ejemplo que ustedes para la palabra Hermano.

Ana por haberme enseñado la diferencia entre “ser” y estar, por enseñarme que también de los fracasos se aprende y por demostrarme tu amor a cada instante.

A la Universidad Nacional y a la Facultad de Odontología por haber sido más que una institución una forma de vida. A todos mis profesores “Gracias”.

Al Dr. Juan Carlos Hernández y la Dra. Ma. Dolores Jiménez por el interés mostrado en éste trabajo, por ser grandes personas y por haberme enseñado otro aspecto de la odontología.

Al Dr. Daniel Rembao Jefe del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía SSA por su apoyo en el diagnostico histopatológico.

Al personal del laboratorio de inmunología Mary, Lety, Denisse por su calidez y por el apoyo en el desarrollo de este trabajo.

INDICE

RESUMEN	I
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Alcohol.....	3
2.2 Absorción y metabolismo.....	3
2.3 Alcoholismo crónico.....	5
2.4 Efectos sobre la cavidad oral.....	6
2.5 Efectos sobre estructuras celulares.....	7
2.6 Consideraciones anatómicas de glándulas salivales.....	10
2.7 Glucosilación.....	13
2.8 Concepto y aplicaciones de las lectinas.....	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS.....	20
General.....	20
Específico.....	20
7. METODOLOGÍA.....	20
Procedimiento general.....	21
Histoquímica para lectinas (peroxidasa).....	21
8. RESULTADOS.....	23
9. DISCUSIÓN	31
10. CONCLUSIONES.....	35
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	36

RESUMEN

Los efectos del consumo crónico de etanol sobre diferentes tejidos y órganos han sido estudiados en diversos modelos experimentales y los resultados han mostrado daños en hígado, riñón, cerebro, páncreas, glándulas salivales, entre otras estructuras. A nivel celular los cambios más importantes se han encontrado en núcleo, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, membrana plasmática y mitocondria.

En el presente estudio se utilizaron bloques de glándulas salivales embebidas en parafina provenientes de 15 ratonas de la cepa Balb/c alcoholizadas crónicamente (40 semanas). Los 15 bloques fueron subdivididos como sigue: 5 bloques de glándula salival submandibular de ratonas alcoholizadas al 15%, 5 bloques de glándula salival de ratonas alcoholizadas al 24% y, un grupo control de 5 bloques de glándula salival submandibular de ratonas que no consumieron alcohol. Se obtuvieron 5 cortes de cada bloque (5 micras). Para el análisis histológico se realizó la técnica de HyE. El procedimiento histoquímico (peroxidasa) para la identificación de galactosa y ácido siálico se realizó utilizando lectinas LPA, MAA y PNA. El análisis histológico e histoquímico se realizaron en un microscopio Olympus CX31.

Los cambios que se presentaron en los acinos de las glándulas salivales submandibulares de los grupos experimentales fueron: degeneración en la porción serosa de la glándula submandibular observándose ausencia parcial y total de núcleos, nucleomegalia, y citoplasma en algunos casos granular con pérdida de la relación intercelular.

El análisis histoquímico mostró cambios en la expresión de moléculas con terminales galactosa y ácido siálico.

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de alcohol crónico produce alteraciones sistémicas importantes que reflejan la vulnerabilidad de las diferentes estructuras celulares a su exposición. Se han reportado alteraciones a nivel celular en relación al consumo de alcohol tales como: daños en la permeabilidad de la membrana celular,² alteraciones en aparato de Golgi y retículo endoplásmico provocando anomalías en los procesos de glicosilación de las proteínas. Así mismo se han reportado cambios mitocondriales relativos a la disminución de los niveles de ATP, así como pérdida de la integridad de la membrana que se traduce en un aumento en la permeabilidad de este organelo.²³

Algunos cambios pueden ser observados por medios histoquímicos usando lectinas. El reconocimiento de las lectinas está basado en su capacidad de reconocimiento de estructuras sacarídicas.³⁰ Esta herramienta ha facilitado el estudio de alteraciones en el proceso de glicosilación asociado a diversas patologías. Cuando estas uniones se encuentran alteradas, podemos suponer que el organelo en el cuál se sintetiza la proteína esté dañado, o alguna de las enzimas involucradas en el proceso de glicosilación pueda estar siendo producida anormalmente.¹⁷

En glándulas salivales se han observado alteraciones celulares en relación al consumo cuantitativo de alcohol. Dichas alteraciones se han asociado principalmente al acetaldehído, el principal producto del metabolismo del alcohol³⁴, y se manifiestan con cambios en el parénquima glandular, pérdida de la arquitectura celular y vacuolización citoplasmática así como incremento en la inmunexpresión de los receptores del factor de crecimiento epidérmico tipo 1 y tipo 2.¹²

2. ANTECEDENTES

2.1 Alcohol (Etanol)

Los alcoholes pertenecen al grupo de los hidrocarburos alifáticos. Se forman por la sustitución de uno o más átomos de hidrógeno de las cadenas laterales de los cíclicos por uno o más grupos hidroxilo (OH).¹ El etanol es una molécula débilmente cargada y de muy bajo peso molecular, tiene una densidad de 0.809 y se mueve con mucha facilidad a través de las membranas celulares, equilibrándose con rapidez en la sangre y los tejidos, además es soluble en agua y parcialmente soluble en gases.²

Es un líquido incoloro, volátil e inflamable que se produce naturalmente como producto de la descomposición de los carbohidratos vegetales por la fermentación de almidones o azúcares de frutas, granos, papas o caña de azúcar por acción de levaduras.³

Desde el punto de vista farmacológico, el etanol es una sustancia que cae dentro de la clasificación de droga ya que, cuando es introducida en el organismo, es capaz de modificar una o varias de sus funciones a causa de sus propiedades farmacológicas, psicotrópicas y su potencialidad altamente adictiva.⁴

La formula del alcohol etílico es: C_2H_5OH

2.2 Absorción y metabolismo

El etanol se absorbe por difusión simple a través de las mucosas. Esta absorción comienza en la boca, continua en el esófago y posteriormente en el estómago,³ pero este fenómeno es más rápido en la mucosa fina del intestino delgado debido a la gran longitud que posee, de tal forma que todo lo que retarde el vaciamiento gástrico (alimentos, ejercicio o algunos

medicamentos anticolinérgicos) retardará también su absorción.² Penetra en la circulación portal, se distribuye en la sangre arterial, no se fija a proteínas plasmáticas y se distribuye rápidamente a través de membranas capilares por difusión hasta los tejidos del cuerpo, en proporción casi igual a su contenido acuoso y a la solubilidad del alcohol en agua.⁵

El etanol se difunde rápidamente desde la sangre a través de las paredes de las membranas al espacio intercelular y se equilibra con el agua corporal total. La cantidad de etanol que se elimina con el aire respirado, sudor y la orina suele ser menor al 5 % de la dosis ingerida, debido a que el resto se metaboliza básicamente en el hígado.²

El primer paso del metabolismo del etanol tiene lugar principalmente en el hígado a través de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y consiste en una oxidación (depende de NAD-nicotín/adenín/dinucleótido) generando en primer lugar acetaldehído que es destruido por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) y posteriormente generando acetato.

El NADH (nicotín-adenin-dinucleótido-reducido) puede ser oxidado de nuevo a NAD por la cadena respiratoria de la mitocondria o por las reacciones redox citoplasmáticas, como la conversión de piruvato a lactato y por acción de la enzima deshidrogenasa alcohólica que es de tipo citosólica.³

Otra vía metabólica es el sistema microsómico oxidante del alcohol (MEOS) responsable del 10% o más de la oxidación del etanol consumido y puede inducirse por una actividad aumentada de este sistema después de una exposición crónica al etanol cuando la otra vía se ve saturada. Finalmente, en caso de una ingesta extremadamente alta es activado un tercer sistema: el de la catalasa.²

Todas estas vías dan como resultado la producción de acetaldehído, que se oxida a acetato. Este último sale a la circulación y se transforma en los tejidos periféricos a CO₂ y H₂O. Aunque se sabe que a concentraciones bajas el acetaldehído puede causar estimulación y refuerzos de

comportamiento, la acumulación de niveles elevados de acetaldehído en hígado, cerebro u otros tejidos corporales puede causar lesiones en dichos órganos.²

A través de complejos mecanismos químicos el etanol se transforma en la cantidad de un gramo de alcohol por cada diez kilogramos de peso corporal cada hora en el humano.¹ Dicho metabolismo difiere con respecto a la rata y ratón, quienes metabolizan el alcohol en un rango de 300 a 550 mg/kg/hr respectivamente.⁷

2.3 Alcoholismo crónico

La OMS considera a la enfermedad alcohólica entre las no transmisibles y ha sustituido el término alcoholismo por el de síndrome de dependencia del alcohol, en la novena revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades y lo define como: "La dependencia psicológica y fisiológica del alcohol, caracterizada por la incapacidad del alcohólico de controlar el principio y la terminación del consumo del producto".

La misma OMS amplió la definición considerando que la ingestión diaria de alcohol superior a 50 gramos en la mujer y 70 gramos en el hombre provoca perjuicio a la salud del bebedor, a sus relaciones con otras personas y a su actividad económica".⁶

En México, el porcentaje de hombres dependientes del alcohol es de 12.5%, mientras que el de las mujeres es de 0.6%. El grupo de edad con una incidencia más alta fue de 18 a 29 años.⁴

2.4 Efectos sobre la cavidad oral

Las alteraciones orales secundarias al alcoholismo generalmente se producen como consecuencia de la falta de higiene oral, por infiltración grasa de las glándulas salivales y déficit nutricionales de moderados a intensos, además del incremento en el riesgo de desarrollar carcinomas en la cavidad oral, faringe, laringe y esófago.⁵

Los pacientes alcohólicos frecuentemente presentan un aumento en la incidencia de periodontitis crónica avanzada, con tejidos gingivales inflamados y pérdida de hueso alveolar.⁹

El alcoholismo crónico ha sido asociado con diferentes cambios fisiológicos y estructurales, no solo a nivel del epitelio de la mucosa oral sino también afectando glándulas salivales mayores y menores. Aunque estos cambios se presentan mayormente en glándulas mayores, por medios histoquímicos se han encontrado alteraciones existentes en glándulas menores de alcohólicos crónicos.^{48,49}

Algunos presentan como consecuencia un aumento del tamaño de las glándulas salivales mayores, sobre todo de las glándulas parótidas. Esta inflamación usualmente es bilateral y el rostro se puede parecer al de una persona con hipertrofia de los músculos maseteros.¹⁰ Histológicamente se encuentran depósitos de grasa que infiltran las glándulas salivales como resultado de la alteración generalizada del metabolismo lipídico.⁹

El alcohol estimula el sistema reticular ascendente, causando la contracción de los músculos maseteros y bruxismo nocturno durante los periodos de sueño con movimientos oculares rápidos (REM). Esto predispone al alcohólico a la atrición dental y disfunción de la articulación temporomandibular.⁹

El fluido salival y las concentraciones de alfa-amilasa y sodio en saliva mixta decrecen significativamente, mientras las concentraciones de potasio en saliva se incrementan después de la exposición crónica al alcohol.¹¹ Este

decremento en la actividad de la amilasa en saliva puede reflejar alteraciones inducidas por el etanol en células acinares.⁴⁰

Se ha observado pérdida de la arquitectura celular, vacuolización citoplasmática y pérdida de núcleos celulares así como un incremento en la Inmunoexpresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico tipo 1 y 2 en las glándulas salivales de ratones alcoholizados crónicamente. Esto ha sugerido que en condiciones experimentales, el consumo crónico de alcohol provoca degeneración del parénquima glandular y cambios en la expresión de factores tróficos que afectan la función glandular.¹²

2.5 Efectos Sobre Estructuras Celulares

Debido a su total y rápida absorción, el alcohol ingerido es incorporado rápidamente al torrente sanguíneo y a los tejidos corporales causando diversos daños en el organismo.

Una gran variedad de mecanismos por los cuales el etanol produce daño celular ha sido discutido ampliamente. A nivel celular el etanol se disuelve en los lípidos de la membrana plasmática, y los hace más densos y mecánicamente inestables. Esto interfiere en diferentes procesos de la membrana: 1) se alteran y disminuyen los cambios rápidos en el reflujo de Na^+ y K^+ que constituyen el fundamento de potencial de acción. Por esta razón, cuando hay grandes concentraciones de alcohol se deprimen la conducción de impulsos nerviosos y la contracción muscular (músculo liso, estriado y cardíaco).² También se ha demostrado que la exposición al etanol altera las propiedades físico-químicas de los lípidos de la membrana plasmática, expandiéndola e incrementando su fluidez.¹³ Todos los tipos celulares son afectados de la misma manera, pero este efecto es más pronunciado en las células con membranas excitables.⁵²

El consumo crónico de etanol produce alteraciones en los niveles de glicoconjugados.¹⁴ Esto se puede explicar por los daños que se presentan en aparato de Golgi en las porciones *cis* y *trans* a la exposición crónica de etanol afectando las propiedades citoquímicas de este organelo. Esta exposición al etanol en hepatocitos fetales de ratas, altera los procesos de glicosilación que dependen íntegramente del sistema retículo endoplásmico-aparato de Golgi, afectando morfológica, estructural y funcionalmente este organelo. Así mismo también se ha evidenciado que algunas enzimas involucradas (transferasas) en el ensamblaje de carbohidratos también se encuentran afectadas.¹⁵ Este efecto se manifiesta con un decremento en el peso del hígado y las proteínas totales contenidas en la porción *trans* del aparato de Golgi de ratas alcoholizadas crónicamente.¹⁶ El alcohol también puede alterar el transporte de dichas glicoproteínas a sus destinos correspondientes alterando en particular la función del sitio donde debían de actuar.¹⁵

Se ha observado estrés oxidativo en hepatocitos de ratas fetales acompañado con un decremento celular en los niveles de ATP que indican daño bioquímico y morfológico en la mitocondria. Principalmente existe pérdida del potencial de membrana resultando en un decremento de las actividades de transporte de electrones y fosforilación oxidativa e inhibición en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial por un aumento en el oxígeno reactivo, provocando un decremento en el transporte de electrones.¹⁷ También se han reportado alteraciones ultraestructurales donde la mitocondria aparece ligeramente dilatada, con pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial, con un aumento evidente en la permeabilidad y con una disminución en el potencial de membrana.¹⁸ Es muy posible que el incremento del oxígeno reactivo producida en la mitocondria cause el mayor daño observado en alcohólicos crónicos.⁵³

Las células del sistema nervioso, en particular astrocitos y células gliales importantes para el desarrollo cerebral a través de moléculas de adhesión y factores de crecimiento, presentan alteraciones cuantitativas y cualitativas en algunos pasos del proceso de glicosilación de algunas glicoproteínas, hecho que se traduce en defectos en el desarrollo cerebral asociados a la exposición crónica al etanol,¹⁹ Sin embargo aunque se sabe que la exposición crónica al etanol produce alteraciones a estos niveles, existe evidencia reciente de que el etanol puede causar también diversas lesiones como neurodegeneración necrótica después de una ingesta de unos cuantos días provocando daño y muerte celular.²⁰

En estudios realizados en epidermis de la región occipitofrontal del cráneo de ratones alcoholizados se encontró adelgazamiento epidérmico acompañado con un decremento del grosor de todos los estratos celulares tratados, reportándose diferencias significativas en el número de células por mm² de superficie epitelial entre los dos grupos estudiados.⁵²

En las glándulas salivales se ha observado hipertrofia acinar, atrofia epitelial e hiperplasia ductal (incremento en el número de conductos), se ha propuesto que esos cambios estén asociados con modificaciones en la actividad transcripcional de regiones de organizadores nucleolares (NORs).⁴⁸

2.6 Consideraciones generales de la glándula salival

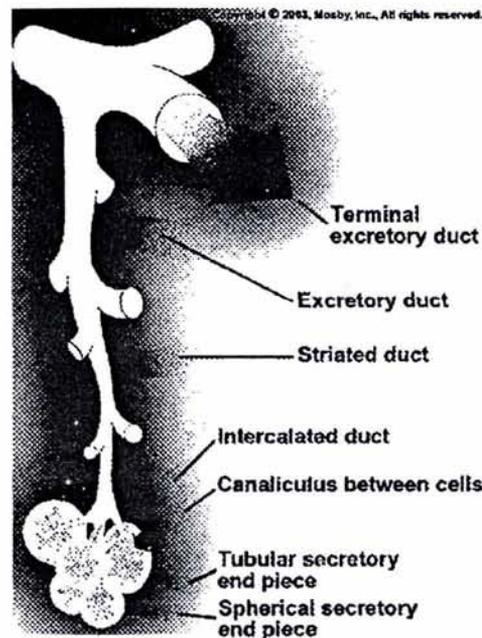
Las glándulas salivales son glándulas exocrinas que vierten su contenido en la cavidad bucal. Se clasifican de acuerdo a su tamaño en glándulas salivales mayores y menores. Tienen a su cargo la secreción de saliva, la cual humedece y protege la mucosa bucal. Además ejerce acciones anticariogénicas e inmunológicas y participa en la digestión de los alimentos y en la fonación.²¹

El parénquima deriva del epitelio bucal y está acompañado y sostenido por tejido conectivo que forma el *estroma*. En este se distribuyen los vasos sanguíneos y linfáticos, así como los nervios simpáticos y parasimpáticos que proporcionan irrigación y controlan la función glandular.²¹

El sistema ductal de las glándulas salivales de muchos mamíferos contienen ductos intercalados que vierten su producto a partir de las piezas terminales secretoras. Los ductos intercalados se vacían en los ductos estriados y los ductos estriados se vacían en los ductos excretores. Estos a su vez se unen para formar el ducto excretor principal (Fig. 1). En algunos roedores como rata y ratón existen ductos adicionales llamados ductos granulares interpuestos entre los intercalares y los ductos estriados de glándulas submandibulares.²²

Las glándulas mayores son las más voluminosas y constituyen verdaderos órganos secretores y se denominan respectivamente: parótidas, submandibulares y sublinguales.²¹ *La glándula submandibular* humana se sitúa en la parte posterior del piso de boca en la porción media de la mandíbula.²¹

Figura 1. Sistema Ductal de la glándula salival.



Ref 21

La glándula submandibular contiene acinos serosos y mucosos por lo que se le considera una glándula de secreción mixta.²¹

Las unidades secretoras de las glándulas salivales están representadas por acinos o adenómeros, los cuales vierten su secreción a la cavidad bucal por medio de un sistema de conductos secretores. Ambas estructuras, acinos y conductos constituyen el *parénquima* o porción funcional de las glándulas. Existe controversia sobre los tipos de células secretoras. El examen de secciones de estas células teñidas con hematoxilina y eosina muestra dos tipos de células secretoras, serosas y mucosas²³ sin embargo, cuando se usan métodos histoquímicos de glicoconjugados es posible identificar un tercer tipo de células, las seromucosas o acinos seromucosos. Tradicionalmente se consideraba que las células serosas secretan material protéico y contienen muy poco o nada de mucina. A través de histoquímica se ha podido observar que también contiene concentraciones considerables

de glicoconjugados neutro o ácidos, por tanto es difícil estimar que existan células estrictamente serosas.²²

El producto de las glándulas salivales *la saliva*, contiene un 99 % de agua con un pH. de 6.8 a 7.2.³¹ Es un fluido que puede contener mucinas, enzimas, inmunoglobulinas (que son secretadas por difusión pasiva al espacio crevicular gingival), factores de crecimiento nervioso y epidérmico (EGR y NGF), lípidos y glicoproteínas (tabla 1). Cerca del 26% de las proteínas salivales son mucinas. Las mucinas de la saliva humana son excelentes lubricantes que proveen una barrera contra la desecación de los tejidos bucales, limita la penetración de irritantes potenciales y toxinas, protege las membranas celulares mucosas contra proteasas generadas por microorganismos de la placa bacteriana y regula la colonización de la cavidad oral por virus y bacterias.¹⁴

Las glicoproteínas salivales tienen una importancia biológica muy amplia en la cavidad oral. Dentro de las principales glicoproteínas y sus funciones se encuentran: 1) *la lactoferrina* disminuye los niveles de hierro, nutriente esencial para el desarrollo bacteriano, 2) *la lisosoma* degrada la pared bacteriana, 3) *la lactoperoxidasa* actúa usando peróxido de hidrógeno para desestabilizar el sistema enzimático bacteriano, 4) *los anticuerpos secretados* actúan contra patógenos virales, 5) *las amilasas* son enzimas digestivas de carbohidratos 6) *factores de crecimiento* como epidérmico, nervioso, mesodérmico y hepatocítico y 7) *agentes de remineralización* como proteínas ricas en prolina que inhiben la precipitación de sales en la saliva y favorecen la remineralización en la superficie de los dientes.⁴⁶

Por medios histoquímicos se ha detectado la presencia de cuatro isoamilasas y α -amilasa en glándulas parótidas por electroforesis e inmunofluorescencia respectivamente. Así mismo se han usado también medios histoquímicos para identificar factores de crecimiento nervioso (NGF), epidérmicos (EGF) presentes en glándulas salivales así

como la presencia de lactoferrina salival en ductos intercalados y ductos estriados de glándulas parótidas.⁴¹

Tabla 1. Glucoproteínas salivales

Proteína	Peso molecular (kDa)
Lactoferrina	75
Peroxidasa	75
Amilasa	60
Anhidrasa carbónica	38
Glicoproteínas ricas en prolina	35
Proteínas glicosiladas	20-28

Ref. 31

2.7 Glicosilación

Glicosilación es un proceso por medio del cual las proteínas son sintetizadas a partir del citosol por acción de los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RE) donde van a experimentar una transformación química; esta transformación no termina hasta que dichas moléculas, por acción de las vesículas de transferencia pasan al aparato de Golgi.²⁴ Aunque este sitio se ha considerado como un solo organelo, la porción *cis* y *trans* contienen diversas enzimas (transferasas) que inducen diferentes modificaciones a las proteínas,²⁵ tales como, la incorporación azúcares a la proteína para obtener proteínas glicosiladas. Esta incorporación de azúcares va a afectar la formación del polipéptido confiriéndole así diversas características como una mayor resistencia a la digestión proteolítica o a la

desnaturalización física; ²⁵ propiedades que aumentan la vida media de sustancias tales como la hormona luteinizante (HL) o la hormona gonadotropina corionica (hCG) y que dependen de la unión de sus cadenas terminales de azúcares con Gal, galactosa, NeuAc, ácido N-acetilneuraminico. ⁴⁵

Debido a que los oligosacaridos en la superficie de la célula y glicoproteínas son clasificadas por la naturaleza de su unión a la proteína, la glicosilación puede tener dos variantes que tienen que ver con el tipo de enlace que forman. Estos enlaces pueden ser tipo "O" y tipo "N" y corresponden a la *O-Glicosilación* y *N-Glicosilación* respectivamente.

O-Glicosilación (GalNAc-serina/threonina) sintetiza proteínas de alto peso molecular ($>10^6$) como las mucinas que se encuentran en un alto porcentaje en saliva y que van a dar propiedades viscoelásticas a las secreciones mucosas.

Las N-uniones surgen cuando bloques de 14 azucares son adheridos a los polipéptidos sintetizados en el retículo endoplásmico. La N-Glicosilación (N-acetilglucosamina-aspargina) forma cuatro clases de N-glicanos: oligomanosas, híbridos, bisectados y tipos complejos.²⁷ Las uniones N-glicosídicas tienen una función estructural en la pared celular y otras funciones en los organismos eucariontes. Varios reportes han mostrado que la presencia de N-Oligosacaridos es requerida para el correcto desdoblamiento de muchas glicoproteínas.²⁸

Todos los procesos de glicosilación tienen un papel importante en el tiempo de vida, síntesis, biodistribución, y secreción de glicoproteínas en suero.²⁸ Participan en el desarrollo embriológico de células gliales y neuronas en el cerebro,¹⁸ en los procesos para la síntesis de eritropoyetina; y , en el procesamiento de entre el 0.5 % y 1.0 % de los genes presentes en los vertebrados, además de otras funciones. ^{27,39}

Otros estudios han identificado cambios en lactoferrina sérica salival (entre otras glicoproteínas salivales) de glándulas parótidas de pacientes alcohólicos y con síndrome de Sjogren.²⁹

La glicosilación alterada participa de manera importante en el desarrollo de cáncer y metástasis, en particular con algunas interacciones célula-célula como: migración, invasión, diferenciación, angiogénesis e invasión en el sistema inmune, procesos en los cuales se va a requerir la glicosilación precisa de macromoléculas específicas para el crecimiento del tumor y metástasis.²⁷

2.8 Concepto y Aplicaciones De Las Lectinas

Las lectinas constituyen un importante grupo de proteínas de origen no inmune presentes en animales y vegetales que contienen dos o más sitios de unión reversibles y de alta especificidad para un azúcar determinado, ya sea libre o que forme parte de estructuras más complejas.³⁰ Esta afinidad por los azúcares es similar a la unión que tienen las enzimas con su sustrato o a la unión antígeno anticuerpo.³¹ Las lectinas al unirse con el carbohidrato pueden entrecruzar la membrana plasmática y participar en diferentes procesos biológicos como eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, control intracelular del tráfico de glicoproteínas, adhesión a agentes infecciosos pegados a células huésped, reclutamiento de leucocitos a sitios de inflamación y otras interacciones con el sistema inmune, así como para la caracterización de células cancerígenas en tumores. Características que hacen de las lectinas armas valiosas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología.³⁰

Dentro de sus funciones la mayor de ellas parece ser el reconocimiento celular,²⁵ esta característica está basada en su capacidad de reconocer

estructuras sacarídicas como parte de glicoconjugados: glucosa, manosa, galactosa, ácidos siálicos, fucosa y sus derivados más complejos.³²

Las lectinas han sido usadas para demostrar la naturaleza glicosídica de los receptores para hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, toxinas entre otros. Se han usado también para identificar grupos sanguíneos, como mitógenos, activadores linfocíticos y en el campo de la genética.¹¹

Los métodos histoquímicos con lectinas han sido ampliamente utilizados en histología y patología para la detección de residuos de azúcares específicos en el estudio de lesiones obstructivas, carcinomas de glándulas salivales, adenomas pleomorfos, entre otros.⁴¹

La unión de PNA (*Arachis hypogaea*, *peanut agglutinin*) a células mononucleares ha sido empleada para encontrar la correlación histológica en el curso de la enfermedad periodontal donde, existe relación proporcional entre la severidad de la inflamación y el marcaje de células unidas a PNA.⁴⁷

Otras lectinas se han aplicado para identificar proteínas glicosiladas con terminaciones GlcNAc, Gal y acetilactisamina como residuos de carbohidratos que parecen estar restringidos a glicoproteínas de membrana de bajo peso molecular presentes en fibroblastos gingivales humanos.⁴⁷

La unión de lectinas a azúcares residuales de glicoconjugados ha sido empleada en glándulas salivales. Se han usado para determinar ciertas diferencias normales y patológicas entre glándulas mayores y glándulas menores identificando azúcares terminal de glicoconjugados en células acinares, células ductales y células mioepiteliales que presentan ciertas diferencias en sus uniones a las lectinas y que al parecer están en relación con la presencia cuantitativa de manosa.²² Los glicoconjugados de los túbulos serosos de ambos se han marcado con lectina PNA (*Arachis hypogaea*, *peanut agglutinin*), que se une específicamente a β -D-galactosa \rightarrow (1-3)-D-N-acetilgalactosamina), y con RCA-1 (*Ricinus communis agglutinin*) que se une a β -D-Galactosa \rightarrow α -D-

galactosa.²² PNA fue usada en glándulas salivales submandibulares para detectar secciones pretratadas con amilasa, donde, los ductos intercalados aparecen mas marcados.⁴⁷

La unión del ácido siálico a diferentes glicoproteínas se ha estudiado usando MAA, (*Maackia amuranis agglutinin* específica a ácido siálico (α -2,3) y otro tipo de lectinas en glándulas parótidas donde más del 80% de las proteínas consisten en proteínas ricas en prolina.⁴¹ La glándula parótida por tener células excretoras serosas se había pensado que no secretaba glicoproteínas con O-uniones a cadenas de azúcares, sin embargo se ha demostrado por medio de las lectinas que estas células contienen proteínas secretadas que son O-glicosiladas.⁴⁷

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo crónico de alcohol ocasiona diversas alteraciones y es un factor predisponente para un gran número de enfermedades como hipertensión, problemas hepáticos, gota, malestar estomacal hasta problemas de estrés, ansiedad y depresiones graves; así como alteraciones premalignas y malignas con una incidencia tres veces mayor al de una persona que no tiene el hábito de beber alcohol.³⁵

Se ha reportado la influencia del alcohol sobre las glándulas salivales encontrando que existen alteraciones en cuanto la cantidad y calidad de la saliva secretada, lo cual repercute directamente sobre las estructuras orales ocasionando un mal lubricado y como consecuencia la aparición de inflamaciones de la mucosa, ulceraciones graves hasta el desarrollo de diferentes tipos de neoplasias, así como incremento el desarrollo de caries.³⁵ Otros estudios reportan que la exposición crónica al alcohol altera el proceso de glicosilación (en hígado y células nerviosas) y el transporte de moléculas protéicas a sus sitios de acción.^{19, 25} Si este efecto es observado en la glándula salival de alcohólicos, se podrían explicar los cambios en la cantidad y calidad de la saliva producida y los efectos que en el ambiente oral se han observado en estos pacientes.

4. JUSTIFICACIÓN

Numerosos estudios han comprobado que el abuso del alcohol asociado a otros factores de riesgo inherentes a cada persona y su medio ambiente, son capaces de producir alteraciones importantes en el organismo y particularmente en la cavidad oral.

Estudios histoquímicos han demostrado que las glándulas salivales submandibulares presentan alteraciones importantes a nivel de marcadores específicos epiteliales para factores de crecimiento como EGF-R tipo 1 y 2 en ratones alcoholizados.¹²

Dado que las lectinas reconocen estructuras de tipo sacarídico, son utilizadas en este estudio para detectar alteraciones en las estructuras sacarificas producidas en la glándula salival submandibular y que podrían ser indicativo de daño celular, principalmente en los organelos involucrados en este proceso (aparato de Golgi y retículo endoplásmico) y/o en las moléculas que participan en el proceso de glicosilación.

5.HIPÓTESIS

El consumo crónico de alcohol altera el patrón histológico glandular y el patrón de expresión de moléculas glicosiladas en la glándula salival submandibular de ratón.

6.OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los cambios en el patrón de expresión de estructuras sacaridicas de tipo galactosa y ácido siálico en la glándula salival submandibular de ratones alcoholizados crónicamente.

Objetivo específico

Correlacionar los cambios histopatológicos de la glándula salival de ratón alcoholizado crónicamente respecto a los cambios en la expresión de azúcares específicos.

7. METODOLOGÍA

Se utilizaron 15 bloques incluidos en parafina provenientes de 15 ratones hembras de la cepa Balb/c de 48 semanas de edad. Se dividieron en dos grupos experimentales (10 bloques) y uno control (5 bloques). Los grupos experimentales comprendieron 5 bloques de hembras alcoholizadas crónicamente al 15 % y 5 bloques de hembras al 24 %. El grupo control comprendió 5 bloques.

Procedimiento general

1. Obtención de 5 cortes por bloques embebidos en parafina (5 micras).
2. Tinción con HyE.
3. Procesamiento histoquímico para lectinas PNA, MAA Y LPA
4. Análisis microscópico.
5. Obtención de resultados

Histoquímica Para Lectinas, (Técnica de Peroxidasa)

1. Procesamiento histoquímico: xilol, xilol, alcohol-xilol, alcohol 100%, alcohol 96%, alcohol 70%, agua destilada.
2. Lavado en PBS 0.1 M.
3. Bloqueo de actividad de peroxidasa endógena (3% H₂O₂).
4. Incubado en PBS-Albúmina 0.2%.
5. Lavado en PBS-Tritón 0.2%.
6. Incubado con lectinas (PNA, LPA, MAA) durante 2 horas.

Lectina	Carbohidrato que reconoce
MAA* (<i>Maackia amurensis</i>)	Ácido siálico α (2-3) galactosa
LPA* (<i>Limulus polyphemus</i>)	(ácido siálico) α (2,3) y α (2,6)
PNA* (<i>Arachis hipogaea</i>)	β -galactosa

* EY Laboratorios, Inc.

Ref 39

7. Incubado con extravidin-peroxidasa durante 1 hora.
8. Revelado con diaminobencidina (DAB).

9. Deshidratación y contratinción:
 - Lavado de laminillas con agua corriente
 - Contraste con hematoxilina de Gill
 - Lavado en agua destilada.
 - Deshidratación: alcohol 96%, alcohol 96 %, alcohol 100 %, alcohol 100 %, xilol/alcohol, xilol, xilol.

8. RESULTADOS

HISTOPATOLOGIA

Para determinar la ingesta crónica de alcohol se analizó el hígado encontrándose: arquitectura hepática conservada en el grupo control (Fig. 1). En los grupos experimentales al 15% y 24% se observó desorganización lobulillar difusa, nódulos de regeneración hepática con eosinofilia y fragmentación citoplasmática (degeneración balonizante), nucleomegalia, núcleos picnóticos y zonas de necrosis celular (Fig. 2).

El análisis de las glándulas salivales submandibulares reveló en el caso de los controles una arquitectura glandular conservada tanto en acinos serosos como en acinos mucosos, así como en el sistema de conductos glandulares (Fig. 3). Nuestros resultados histopatológicos revelaron cambios degenerativos en el parénquima glandular específicamente seroso (Fig. 4). Las células serosas mostraron cambios de tipo granular dentro del citoplasma que podría sugerir alteraciones a nivel de membrana celular. El sistema de conductos mostró cambios menores respecto a la arquitectura glandular. El principal hallazgo histológico fue la nucleomegalia como indicativo de un fenómeno reparativo asociado a daño tóxico. No obstante, se observaron también numerosas células anucleadas o con núcleos picnóticos indicativo de un proceso de lisis celular. Algunas zonas de necrosis celular también fueron evidentes.

Se observó infiltrado inflamatorio difuso predominantemente crónico en el espacio intersticial, lo cual nos puede dar una apariencia histológica de sialoadenitis; desarreglo en el parénquima glandular con pleomorfismo nuclear focalizado. En algunos especímenes se encontró binucleación y cambios necróticos de manera individual y difusa.

Los ganglios linfáticos mostraron hiperplasia sinusoidal con infiltrado de tipo crónico. También se observó hemorragia sinusoidal (hemosiderófagos).

El análisis histoquímico se presenta en las siguientes tablas:

***Limulus polyphemus* (LPA)**

GRUPO DE TRATAMIENTO	ESTRUCTURA	Negativo	-
		Leve	+
		Moderado	++
		Intenso	+++
		Muy intenso	++++
Células mucosas Control	Conducto estriado	++	
	Conductos intralobulillares	++	
	Conductos interlobulillares	++	
	Conductos intercalados	++	
	Citoplasma acinar	++	
Células serosas Control	Conducto estriado	++	
	Conductos intralobulillares	++	
	Conductos interlobulillares	++	
	Conductos intercalados	++	
	Citoplasma acinar	++	
Células mucosas Grupo experimental al 15% de etanol	Conducto estriado	++	
	Conductos intralobulillares	++	
	Conductos interlobulillares	++	
	Conductos intercalados	++	
	Citoplasma acinar	+	
Células serosas Grupo experimental al 15% de etanol	Conducto estriado	++	
	Conductos intralobulillares	++	
	Conductos interlobulillares	++	
	Conductos intercalados	++	
	Citoplasma acinar	++	
Células mucosas Grupo experimental al 24% de etanol	Conducto estriado	++	
	Conductos intralobulillares	++	
	Conductos interlobulillares	++	
	Conductos intercalados	++	
	Citoplasma acinar	+	
Células serosas Grupo experimental al 24% de etanol	Conducto estriado	++	
	Conductos intralobulillares	++	
	Conductos interlobulillares	++	
	Conductos intercalados	+/-	
	Citoplasma acinar	+/-	

Maackia amurensis (MAA)

GRUPO DE TRATAMIENTO	ESTRUCTURA	Negativo	-
		Difuso	+/-
		leve	+
		Moderado	++
		Intenso	+++
		Muy intenso	++++
Células mucosas Control	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar	+/- +/- +/- +/- +	
Células serosas Control	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar	+/- + + +/- +++	
Células mucosas Grupo experimental al 15% de etanol	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar	++ ++ ++ ++ +	
Células serosas Grupo experimental al 15% de etanol	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar	++ ++ ++ ++ +++	
Células mucosas Grupo experimental al 24% de etanol	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar	++ ++ ++ ++ ++	
Células serosas Grupo experimental al 24% de etanol	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar	++ ++ ++ ++ ++++	

Arachis hypogaea (PNA)

GRUPO DE TRATAMIENTO	ESTRUCTURA	Negativo - Difuso +/- leve + Moderado ++ Intenso +++ Muy intenso ++++
Células mucosas Control	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma	+/- ++ ++ +/- +++
Células serosas Control	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar	+++ +++ +++ +++ +
Células mucosas Grupo experimental al 15% de etanol	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar	+/- + ++ + +
Células serosas Grupo experimental al 15% de etanol	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar	+++ ++ ++ ++ +
Células mucosas Grupo experimental al 24% de etanol	Conducto estriado (porción basal) Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar (porción basal)	++ ++ ++ ++ -
Células serosas Grupo experimental al 24% de etanol	Conducto estriado Conductos intralobulillares Conductos interlobulillares Conductos intercalados Citoplasma acinar	++ ++ ++ ++ +/-

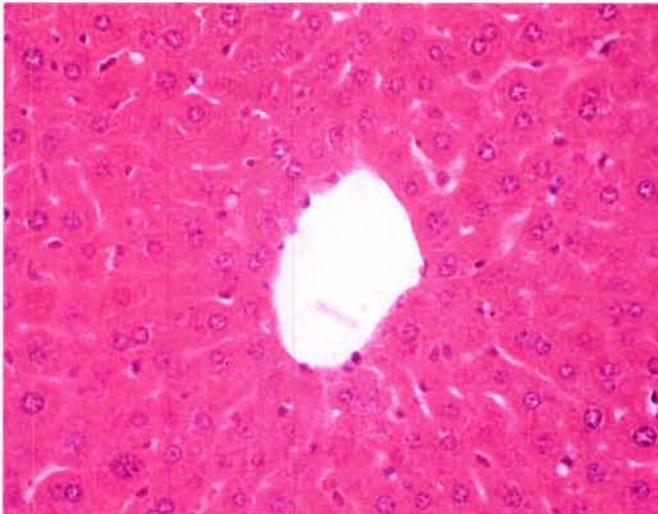


Fig. 1. Hígado de ratón (control). Arquitectura celular conservada. (20X).

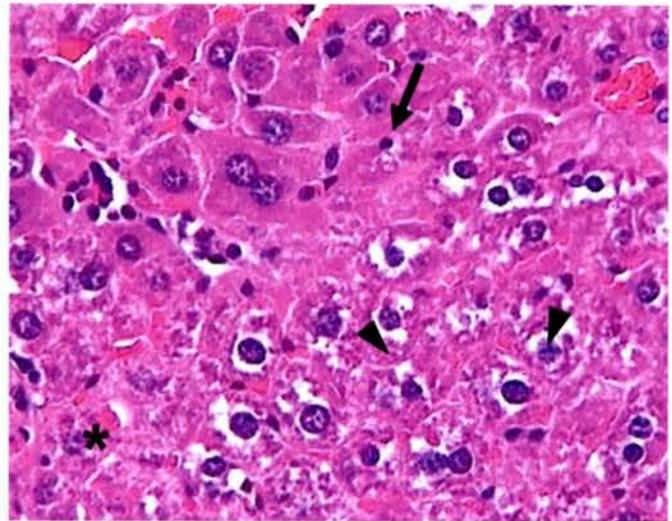


Fig. 2. Hígado de ratón (etanol 24%). Hiper cromatismo nuclear, núcleos picnóticos (flecha), pérdida de límites celulares y zonas lisis celular (punta de flecha) y necrosis focal (asterisco) (20X).

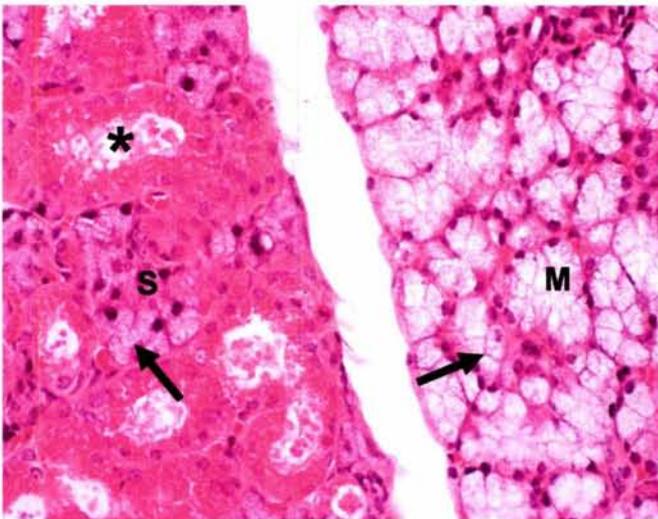


Fig. 3. Glándula salival porción serosa (S) y mucosa (M) (control). Arquitectura acinar (flecha) y ductal (asterisco) conservada. (20X)

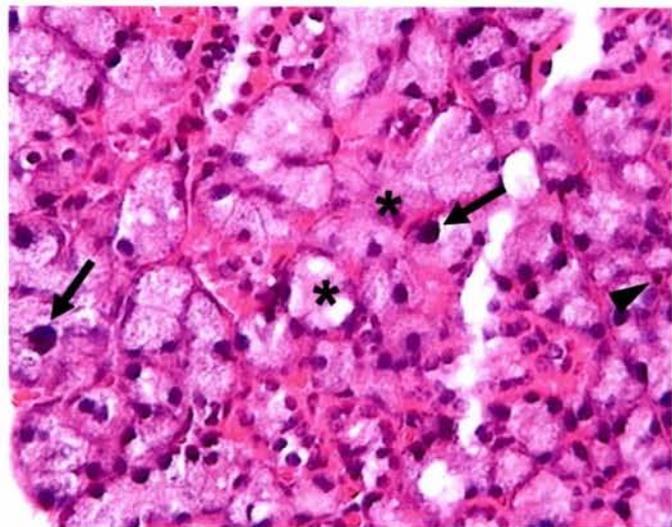


Fig. 4. Glándula salival porción serosa (etanol 24%) que mostrò cambios histológicos significativos. Hiper cromatismo nuclear y nucleomegalia (flecha), núcleos picnóticos y cariólisis (punta de flecha) y pérdida de arquitectura acinar con ausencia de núcleos (asterisco). (20X)

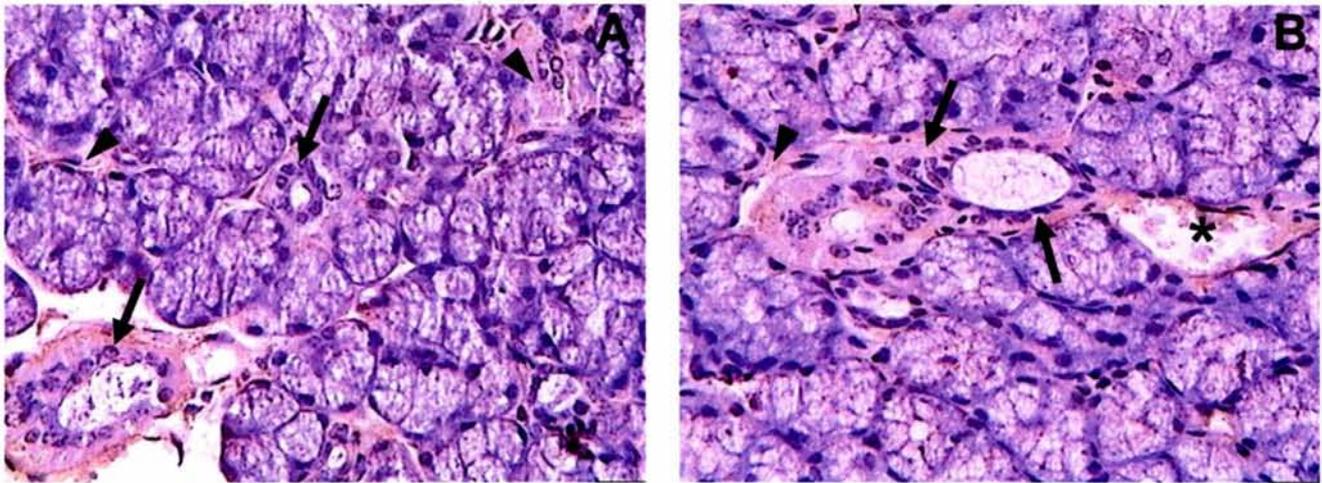


Fig. 5 Histoquímica con LPA (*Limulus polyphemus*) en glándula salival mucosa. **A. (Control)** Nótese la reacción positiva moderada (++) en conductos salivales (flecha) y tejido conectivo de sostén de acinos glandulares (punta de flecha). Reacción difusa en el citoplasma acinar. **B. Grupo experimental de etanol al 24%.** Reconocimiento del carbohidrato similar al control. Epitelio vascular positivo (asterisco). (Magnificación 20x).

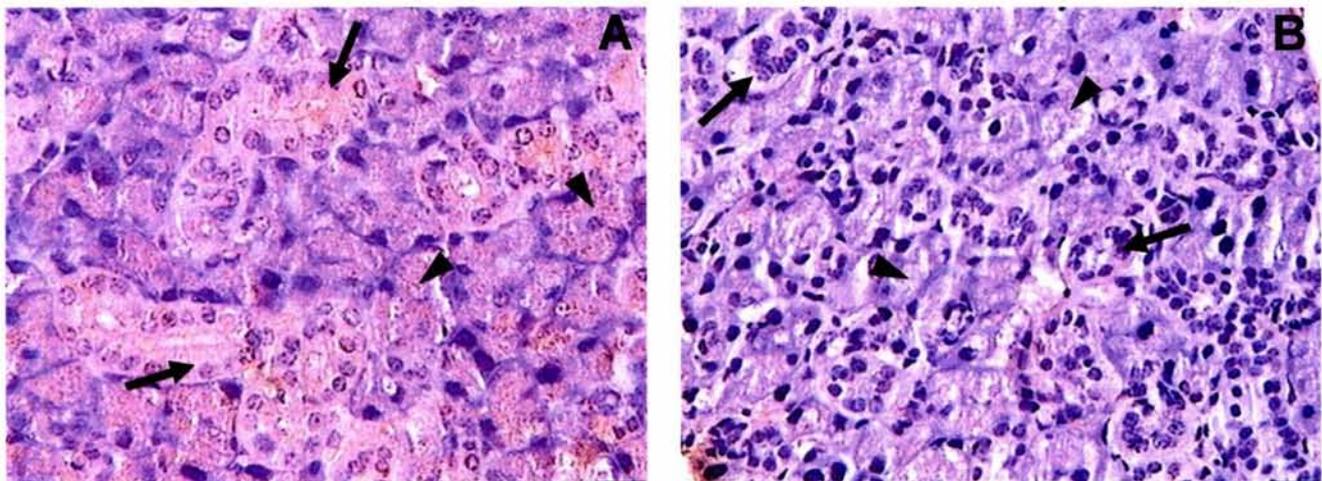


Fig. 6 Histoquímica con LPA (*Limulus polyphemus*) en glándula salival serosa. **A. (Control)** Nótese la reacción positiva moderada (++) en conductos salivales (flecha) y citoplasma acinar (punta de flecha). **B. Grupo experimental de etanol al 24%.** Reactividad difusa en conductos glandulares (flecha) y citoplasma de células acinares (punta de flecha). (Magnificación 20x).

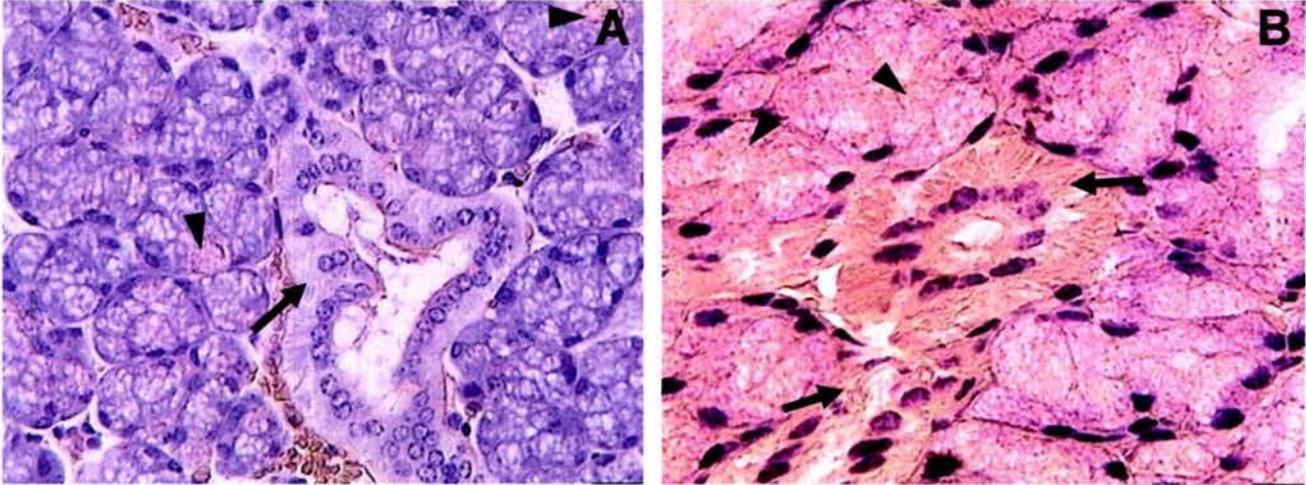


Fig. 7 Histoquímica con MAA (*Maackia amurensis*) en glándula salival mucosa. **A. (Control)** Reacción positiva difusa (+/-) en conductos salivales (flecha) y leve reconocimiento en el citoplasma de algunas células acinares (punta de flecha). Reacción difusa en el citoplasma acinar. **B. Grupo experimental de etanol al 24%.** Incremento en la reactividad en conductos glandulares (flecha), así como en citoplasma de células acinares. (Magnificación 20x).

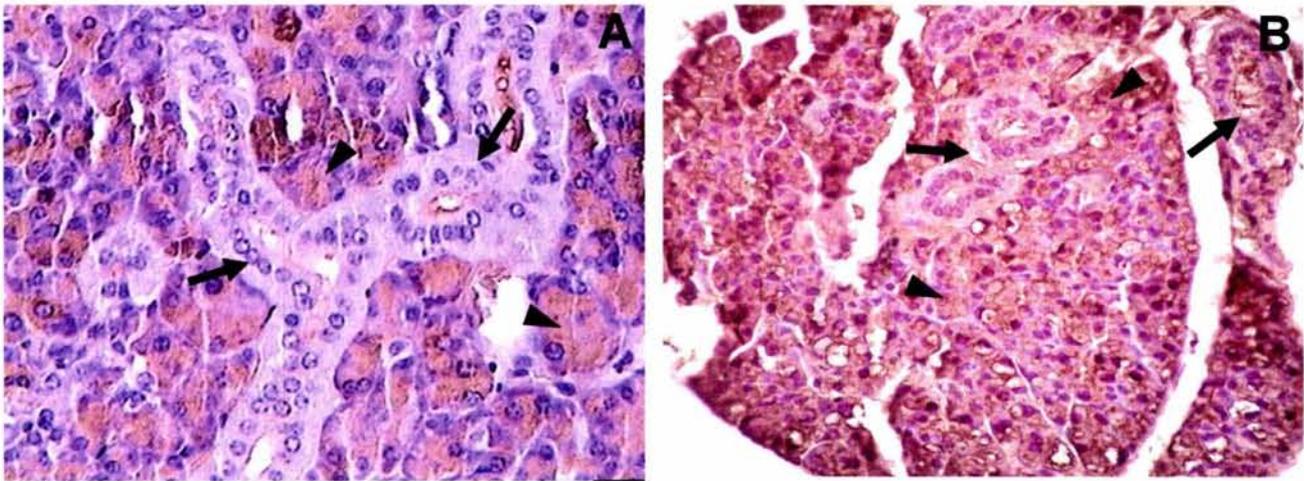


Fig. 8 Histoquímica con MAA (*Maackia amurensis*) en glándula salival serosa. **A. (Control)** Intensa reactividad (+++) en células acinares (punta de flecha) y reconocimiento difuso (+/-) en conductos glandulares (flecha). **B. Grupo experimental de etanol al 24%.** Reactividad incrementada en citoplasma de células acinares (punta de flecha) y conductos glandulares (flecha). (Magnificación 20x).

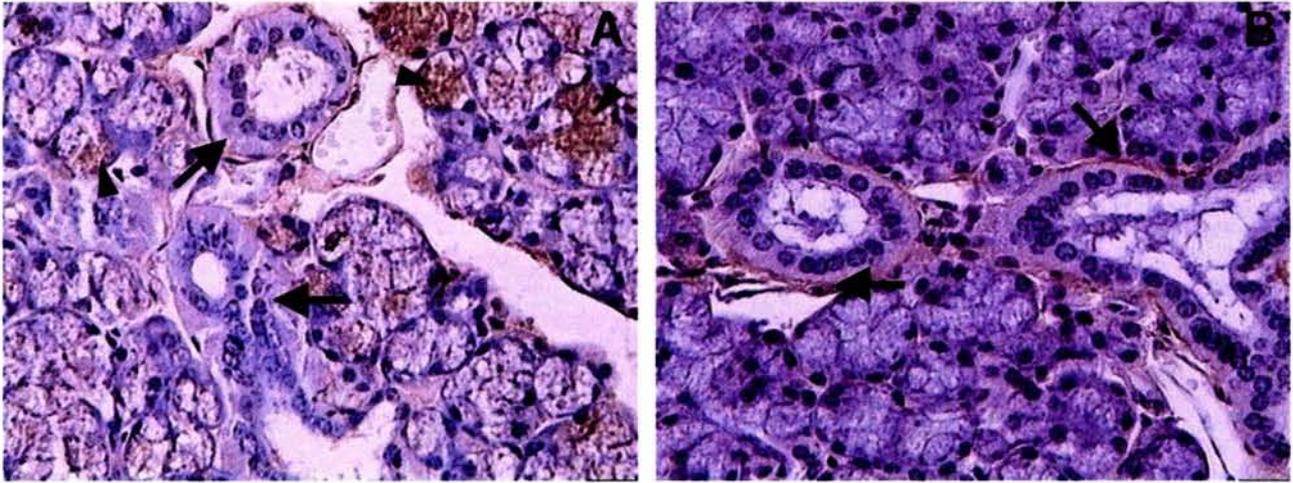


Fig. 9 Histoquímica con PNA (*Arachis hypogaea*) en glándula salival mucosa. **A. (Control)** Reactividad difusa en conductos glandulares (+/-) (flecha) e intenso reconocimiento en el citoplasma de algunas células acinares (+++++) (punta de flecha). **B. Grupo experimental de etanol al 24%.** Reactividad incrementada en conductos glandulares –porción basal- (flecha). Citoplasma de células acinares negativo (-). (Magnificación 20x).

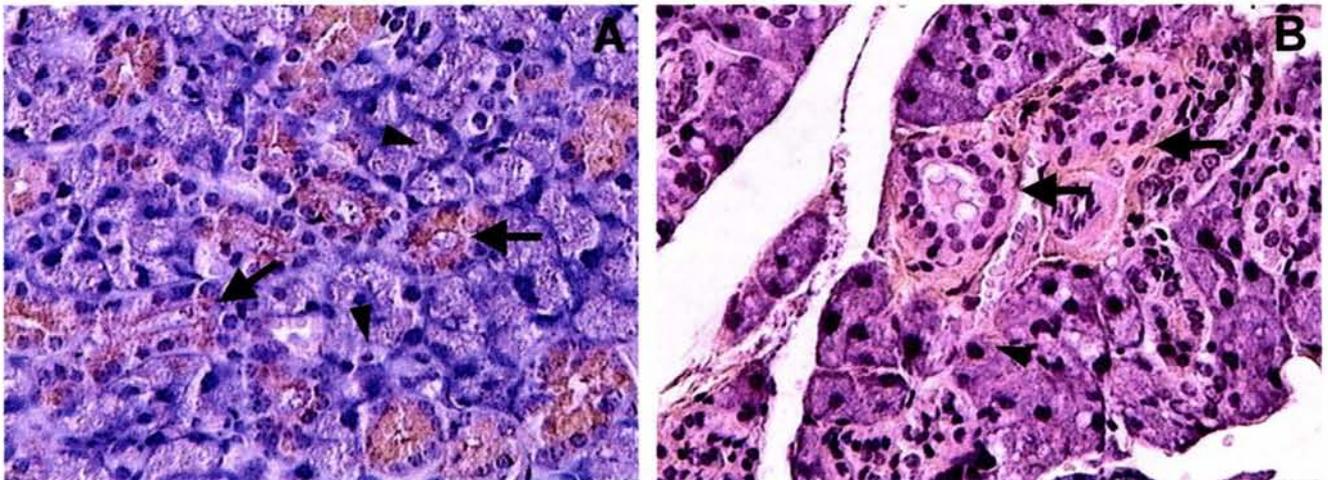


Fig. 10 Histoquímica con PNA (*Arachis hypogaea*) en glándula salival serosa. **A. (Control)** Intensa reactividad en conductos glandulares (+++) (flecha) y reacción leve (+) en el citoplasma de células acinares (punta de flecha). **B. Grupo experimental de etanol al 24%.** Reactividad moderada en conductos glandulares (flecha). Citoplasma de células acinares difuso (+/-). (Magnificación 20x).

DISCUSIÓN

Los principales hallazgos histopatológicos se observaron en la porción serosa, coincidiendo con los hallazgos previos de sialosis y sialoadenitis que señalan los principales daños en glándulas parótidas (que son predominantemente serosas) y en un menor grado en las glándulas submandibulares.^{48, 54}

Los cambios histológicos al 15% y 24% fueron muy similares, incrementando sólo el número de células con nucleomegalia.

La granulación citoplasmática encontrada puede ser consecuencia de alteraciones en la síntesis de mucopolisacáridos, provocando acumulo dentro la célula tal y como ha sido previamente reportado por otros autores.⁵⁵ La desorganización en la arquitectura celular, la pérdida en la relación núcleo-citoplasma (nucleomegalia y núcleos anfófilicos) y la hiper cromasia nuclear concuerda con lo reportado en investigaciones previas que relacionan el daño tóxico por el etanol a nivel celular⁵⁴, que en el caso específico de la nucleomegalia sería indicativo de un intento de la célula por recuperarse. No obstante es evidente el daño celular irreversible dada la disminución del tamaño nuclear, la ausencia de núcleos y las zonas de lisis observadas en este estudio.

La producción y síntesis de proteínas es esencial en las membranas para el transporte intra y extracelular. La pérdida de los límites celulares acinares podría favorecer un incremento en la permeabilidad celular, con efectos sobre la presión celular y el entorno intracitoplasmático.^{55, 56} De hecho esta desregulación podría así mismo estar generando agregaciones dentro de la célula (aspecto granular citoplasmático observado en este estudio).

La función de las glándulas salivales es la producción de saliva a través de sus acinos serosos y mucosos (saliva primaria), mientras que el sistema de conductos no solo actúa como transportador de la misma, sino participa

activamente al incorporar nuevas moléculas a la saliva (saliva secundaria).²² La saliva cumple con varias funciones dentro de la cavidad oral: protección, digestión, defensa antimicrobiana además de que participa de manera importante en el gusto y fonación²¹. La mayor parte de los componentes salivales son glicoproteínas (mucinas, inmunoglobulinas y factores de crecimiento) que son sintetizados y primariamente modificados en el retículo endoplásmico y terminan su maduración como moléculas glicosiladas en el aparato de Golgi.^{15,16}

El metabolismo normal y la enfermedad son orquestados por modificaciones a las proteínas y lípidos celulares. Dos formas comunes y abundantes de modificaciones de proteínas y lípidos ocurren por fosforilación y glicosilación. En el caso de la glicosilación involucra la adición de residuos de azúcar (estructuras simples o complejas de carbohidratos) a las proteínas y lípidos que están unidos a la superficie celular y compartimento extracelular. Los glicanos son los más abundantes y diversos biopolímeros producidos en la naturaleza en comparación a los ácidos nucleicos y proteínas.

Durante la embriogénesis, la vida adulta y, en diversos estadios de la enfermedad, la aparición de estructuras glicano alteradas en las superficies celulares ocurre en patrones específicos como resultado de una expresión de genes alterados que involucran glicosiltransferasas y glicosidasas.

La importancia de las estructuras sacarídicas en los lípidos o proteínas tiene diversas funciones, entre ellas conferir resistencia a la lisis de la molécula en presencia de enzimas específicas, favoreciendo el tráfico intracelular y extracelular, así como la comunicación celular, incluso la sobrevivencia de la célula .

La presencia de cambios celulares y bioquímicos en la glándula salival nos permite suponer alteraciones directas en la calidad y cantidad de la saliva

vertida hacia la cavidad oral. En el alcoholismo crónico han sido identificados diversos cambios en la cavidad bucal, que en muchos casos podrían explicarse por la calidad y cantidad de fluido salival producido.

Las alteraciones a nivel celular y en la glicosilación que observamos por el consumo de alcohol podrían ser explicadas por diversos mecanismos: (1) se ha evidenciado que el acetaldehído, el principal producto del metabolismo del alcohol altera las membranas celulares respecto a su fluidez, dado que altera las estructuras lipídicas y protéicas membranales, (2) se ha identificado que el etanol puede directamente inhibir la actividad de las transferasas con un efecto directo sobre las moléculas glicosiladas en formación, (3) se ha observado que el consumo crónico de alcohol puede alterar el aparato de Golgi lo que podría explicar que las moléculas que se están terminando en su interior no sean completadas adecuadamente³⁴; 4) se ha observado que en algunos modelos celulares como astrocitos y hepatocitos el alcohol puede inducir cambios de tipo necrótico y apoptótico, debido a la generación de radicales libres; 5) El alcohol puede alterar la síntesis de proteínas¹⁶. Si consideramos que uno de los requerimientos esenciales para la adición de moléculas sacarídicas es la síntesis protéica adecuada, así como el plegamiento funcional de la proteína en el retículo endoplásmico rugoso, que servirá como señal para las enzimas y chaperonas involucradas en el proceso, no es difícil suponer que ante moléculas inadecuadas se agregará o se restará la adición de azúcares. En términos generales las proteínas que fallan en su proceso de desdoblamiento inicial son retenidas en el retículo endoplásmico y eventualmente transportadas al citosol donde son degradadas proteolíticamente. Este mecanismo de control de calidad falla en ocasiones por lo que glicoproteínas que no han sido adecuadamente sintetizadas y terminadas pueden llegar a ser transportadas a su correcta localización celular, no obstante su alterada función biológica.

En nuestros resultados se encontró que en condiciones de alcoholización al 24%, con LPA las células serosas presentaron una reducción en la expresión de moléculas con terminal ácido siálico $\alpha(2-3)$ y $(2-6)$, sin embargo al utilizar MAA la expresión se encontraba incrementada específicamente en conductos estriados e intercalados. Debido a la especificidad de MAA para reconocer $\alpha(2-3)$ galactosa se puede pensar que incrementaron las moléculas con terminal ácido siálico $\alpha(2-3)$, mientras que las moléculas con terminal ácido siálico $\alpha(2-6)$ disminuyeron. Es importante considerar que el citoplasma de las células serosas en el caso de LPA mostraron una significativa reducción en el reconocimiento, sin embargo MAA mostró cambios incrementados en este tipo celular, lo que sugiere que los cambios en las moléculas glicosiladas se presentan especialmente en las células acinares.

En el caso de PNA el patrón de reconocimiento de galactosa se incrementó considerablemente en los conductos glandulares, mientras que en el citoplasma de las células serosas y mucosas fue menor el reconocimiento.

Es importante considerar que la evidencia histológica reveló cambios de tipo degenerativo específicamente en el patrón seroso, con una casi conservada arquitectura del sistema de conductos.

El valor que ofrece el análisis de moléculas a través de lectinas, permite sugerir cambios en el metabolismo celular, específicamente a nivel de retículo endoplásmico y aparato de Golgi que son las estructuras directamente relacionadas con la modificación cotraduccional y postraduccional de las proteínas. En este sentido, no obstante que la evidencia histológica no reveló cambios importantes en el sistema de conductos, la producción de moléculas glicosiladas a partir del epitelio ductal, al parecer se encuentra alterado. En el caso de las células serosas se observaron cambios en la expresión de glicoconjugados con terminales galactosa y ácido siálico. No obstante las células mucosas sólo mostraron cambios en el patrón de expresión de moléculas con terminales galactosa. Los cambios en la expresión de moléculas

sialiladas y con terminales galactosa se observaron especialmente relacionados al grupo experimental de alcohol al 24%.

CONCLUSIONES

La importancia fisiológica de la saliva respecto a sus componentes orgánicos (lípidos, proteínas y glicoconjugados) e inorgánicos se demuestra dramáticamente en situaciones donde su producción es alterada por diversos procesos patológicos.

En el caso del consumo crónico de alcohol donde se observan cambios degenerativos en el parénquima glandular y en el patrón de expresión de moléculas glicosiladas, es evidente suponer cambios en la calidad de la saliva.

Considerando la importancia de las moléculas glicosiladas en los procesos de comunicación celular glandular, será importante evaluar los cambios ultraestructurales que evidencien daño en el complejo retículo endoplásmico-aparato de Golgi en su interacción con otras estructuras celulares y su función. De igual manera, será importante realizar el análisis bioquímico de las enzimas directamente relacionadas con los procesos de modificación postraduccionales.

De acuerdo con nuestros resultados, se puede concluir que en este estudio el consumo crónico de etanol ocasionó cambios degenerativos en el parénquima glandular salival así como alteraciones en el patrón de moléculas glicosiladas (con terminales galactosa y ácido siálico). Estos efectos podrían estar alterando la cantidad y calidad del producto salival final afectando así la fisiología bucal y la calidad de vida de los individuos que beben, al incrementarse el riesgo de daño mecánico, infecciones, problemas digestivos y la aparición de neoplasias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sevilla. El alcohol en el organismo [serial online]. 2003 Mar. [3 screens] Aviable from:HTLM:<http://www.institutobitacora>
2. Bevan JH. Principios de Farmacología. 9th ed. México: Interamericana, 1996;103-108
3. Isselbacher B. Principios de medicina interna. 13th ed. México: Interamericana, 2000;2793-2808.
4. Comunicado de Prensa de la Organización Mundial de la Salud, (2003 Ene 31) Aviable from:<http://WWW.latinsalud.com>
5. Estes NJ. Alcoholismo. Desarrollo consecuencias. 3th ed. España: Interamericana, 1989:97-210
6. Calderón G. Organización mundial de la salud. Segundo informe del subcomité de alcoholismo. 2002;48: 239 –252.
7. Abel EL. Procedural considerations in evaluating prenatal effects of alcohol in animals. Neuobehav Toxicol 1980;2:167-164.
8. Hanlon JJ. Principles of public health administration. Mosby, 1988:571.
9. Rose I, Donald K. Medicina interna en odontología. 2th ed. México: Salvat, 1997:1428,1429.
10. Anden C. Dentistry and the alcoholic patient. Dental clinics of north America:27(2):345-361
11. Halina L. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. Chem Rev 1998;98:637-674.
12. Jiménez D, Ruiz K, Hernández JC. Effects off chronic alcohol consumption a mice submandibulary glands. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 2003.
13. Renau J, Miragall F, Guerri C. Prenatal exposure to ethanol alters lateral plasma membranes and gap junctions of newborn rat

- hepatocytes as revealed by freeze-fracture. *J Submicrosc Cytology* 1987;19(3): 397-404.
14. Guasch R, Renau J. Chronic ethanol consumption induces accumulation of proteins in the liver Golgi apparatus and decrease galactosyltransferase activity. *Alcoholism: Clin Exp Res* 1992;16(5): 942-947.
 15. Renau J, Guash R. Prenatal alcohol exposure Affects Galactosyltransferase activity and glycoconjugates in the Golgi apparatus of fetal rats hepatocytes. *J Hepatol* 1997;25(2): 343-350.
 16. Renau J, Sancho M. Prenatal exposure to ethanol alters the synthesis and glycosylation of proteins in fetal hepatocytes. *Alcoholism: Clin Exp Res* 1989;13(6): 817-823.
 17. Bheemappa G, Devi GI, Henderson. Effect of ethanol on rat fetal hepatocytes: Studies on cell replication, lipid peroxidation and glutathione. *Hepatol* 1993;18(3): 648-659.
 18. Devi BG, Henderson GI. Effect of acute ethanol exposure on cultured fetal rat hepatocytes: Relation to mitochondrial Function. *Alcoholism: Clin exp res* 1994;18(6):1436-1443.
 19. Tomás M, Fomas E, Piqueras J. Ethanol impairs monosacharide up taken and glycosilation in cultures rat astrocytes. *J Neurochem* 2002;83: 601-612.
 20. Obernier JA. Binge etanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcoholism: Clin Exp Res* 2002;26(4):547-557.
 21. Gómez F, Campos M. *Histología y embriología bucodental*. 1a ed. España: Panamericana, 2002:152-186.
 22. Debrosielski, Vergona K. *Biology of the salivary glands*. 1st ed. CRC, 2000: 2-38
 23. Ten Cate. AR. *Oral Histology. Development, structure and function*. Fifth edition. Mosby, 1998: 315-344.
 24. Cormack D. *Histología de HAM*. 2th ed. Harla, México: 112-113

25. Lodish HD. Baltimore. Molecular cell biology. 5th ed. USA: Beck, 2004:953-970.
26. Gioranni Ruiz. El alcohol. La ventana [serial on line] 2004 Feb [3 screens] Aviable from:URL:[http://www.la.ventana. Info/articulo.php](http://www.la.ventana.Info/articulo.php).
27. James WD, Granovsky M, Warren C. Protein glycosilation in development and disease. *BioEssays* 1999; 21:412-421.
28. Parody A. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochemical society. J Biochem* 2000;348: 1-13.
29. Guy H, Carpenter CL. Lectin binding studies of parotid salivary glycoproteins in Sjögren Syndrome. *Electrophoresis* 1999;20:2124-2132.
30. Hernández P. Aplicaciones de las lectinas. *Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999;15(2):91-5.
31. Sheeler P. *Biología celular*. 3rd ed. Limusa ,1998:555
32. Peumans W, Van Damme E. Plants lectins: Specifics tools for the identification, isolation, and characterization of O-Linked glycans. *Critical Rev Biochem Mol* 1998;33(3):209-258.
33. Eros K. Alcohol en alimentos. Afecta al organismo mas de lo que creemos. *Consumer* [serial on line] 2002; Dec. 61(1) (4 screens) Aviable from:URL:<http://www.revista.consumers.es/web/es>.
34. Holthofer H. Lectin binding sites in Kidney. *J Histochem Cytochem* 1983 ;31(4): 531-537.
35. Tolson ND, Daley TD. Lectin probes of glicoconjugates in human salivary glands. *J Oral Pathol* 1985;14(523):
36. Renau J, Miragall F, Guerra C. Prenatal exposure to alcohol alters the Golgi apparatus of newborn rat hepatocytes: A cytochemical study. *J Histochem Cytochem* 1987;35(2):221-228.

37. Becerra L, Soares R. Patterns of secretion of mucins and non-mucins glycoproteins in human mandible/sublingual secretion. Arch. Oral Biol 2003;48:147-154.
38. Zalewska A, Krzysztof Z. Structure and biosynthesis of human salivary mucins. Acta Bioquímica Polonica 2000;47(4):1067-1079.
39. Yamaguchi K, Akai K. Effects of site-directed removal of N-Glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties. J Boil Chem 1991; 266:2043-2049.
40. Maier H, Born IA. The effect of chronic ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. Alcoholism. Clin Exp Res 1986;10(4):425-427
41. Masahiko M. Histochemistry of the salivary glands. 1st ed. CRS press, 2000;235-269
42. Alberts B, Johnson A, Molecular biology of the cell. 4th ed. Garland Science, 1999:735-736.
43. Abel EL. Procedural considerations in evaluating prenatal effects of alcohol in animals. Neuobehav Toxicol 1980;2:167-174.
44. Rhoda H, Chen JJ. Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain. Alcoholism: Clin Exp Res 1997;21(6):1063-1071.
45. Rasmussen J. Effect of glycosylation on protein function. Current Biology 1992;2:682-686.
46. Garant PR. Oral cells and tissues. 1st ed. Canada. Quintessence books, 2003:239-264.
47. Kocourek J, Freed JL. Lectins: Biology, biochemistry and clinical biochemistry. 1st ed. USA. Ed Sigma 1990:353-409
48. Severgnini M, Ferraris E, Carranza M. Nucleolar organizer regions (NORs) evaluation of lingual salivary glands of chronic alcoholics. J Oral Pathol med 2002;31:585-589.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

49. Mandel L, Hamele-Bena D. Sialoadenitis parotidea alcohólica. JADA 1998;2:45-49.
50. Scott J, Burns J. Histologic analysis of parotid and submandibular glands in chronic abuse: a necropsy study. J clinical Pathol 1998;41:837-40.
51. Ortega A, Hernández M. Efectos histológicos de la aplicación tópica del alcohol sobre la mucosa palatina y lingual del ratón. Rev Fac Odontol Univ Chile 1993;11:31-7.
52. Lucélia RG, Caputo D, Iunes J, Wagner R. Ethanol effects on the epidermis of rat fetuses. Morphologic and Morphometric study . Rev Chil Anat 1997;15(2)
53. Cahill A, Carol C. Effects of alcohol and oxidative stress on liver Pathology: The role of the mitochondrion. Alcoholism: Clin Exp Res 2002; 26(6):907-915.
54. Banderas JA, Gaitán LA. Effects of chronic ethanol consumption on the rat parotid gland. Arch Oral Biol 1992;37(1):69-72.
55. Triana MH. Alteraciones metabólicas en el alcoholismo. Revista Cubana Aliment Nutr 1996;10(1):1-8.
56. Christopher A. Squier, Mary J. Kremer, Philip W. Wertz. Effect of ethanol on lipid metabolism and epithelial permeability barrier of skin and oral mucosa in the rat. J Oral Pathol & Med 2003; 32 (10):595