



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**“EFECTO DE LAS RADIACIONES LASER DE BAJA  
POTENCIA SOBRE GLANDULAS SALIVALES DE COBAYO:  
ESTUDIO ESTRUCTURAL, ULTRAESTRUCTURAL Y  
BIOQUIMICO”**

TESISTA:

**OD. LUIS MARIO PLAVNIK**

DIRECTOR:

**DRA. MARTA ELENA GONZÁLEZ DE CROSA**

**CÓRDOBA, 2000**



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-  
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

***“EFECTO DE LAS RADIACIONES LASER DE  
BAJA POTENCIA SOBRE GLANDULAS  
SALIVALES DE COBAYO: ESTUDIO  
ESTRUCTURAL, ULTRAESTRUCTURAL Y  
BIOQUÍMICO”.***

**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
DOCTOR EN ODONTOLOGÍA**

**ODONTOLOGO LUIS MARIO PLAVNIK**

**AÑO 2000**

T  
D622.1  
Pla 69  
8294



**DIRECTORA DE TESIS**

**DRA. MARTA ELENA GONZALEZ DE CROSA**

**PROFESORA TITULAR DE LA CÁTEDRA DE HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA "A"**

**FACULTAD DE ODONTOLÓGIA. UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**



## DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre quien con mucho amor, inspiró en mí el anhelo intenso por dar en la vida y la vocación por la docencia.

A mi madre que me transmitió con su ejemplo el valor de la honestidad y la rectitud.

A mis grandes maestros y motores mis amados hijos: Julia y Franco que dan luz al camino.

Al amor de mi vida, mi esposa Silvia, con quien aprendí la importancia de compartir la vida.

## AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Trabajo de Tesis Doctoral: Dra Marta Elena Gonzalez de Crosa, por ser mi maestra siempre, en la ciencia y en la vida.

A la comisión de Tesis: Profesora Dra María Elena Samar de Avila, Profesor Dr. José Atilio Palma, y Dr. José Luis Batellino, por su apoyo, comprensión y colaboración. -

A toda la "familia" por que incondicionalmente me acompañan y alientan.

A María Eugenia Umlandt (Suzuky), por su apoyo constante y pleno de amor.

A la Dra Alicia Malberti por su ayuda desinteresada, permanente, y llena de afecto.

A la Profesora Ana Chalabe por su trabajo de laboratorio histopatológico y por su amistad de tantos años.

A mis compañeros de la Cátedra de Histología "A": Dra. Rosita Lucero, Od. Ada Quinteros, Od. Daniel Olmedo, Od. Sebastián Fontana, Od. María Teresa Gait, Sra. Rosario Vicente, y Srta Marisa Carballo, con quienes no solo nos une el trabajo compartido sino el inmenso amor que por años hemos compartido.

A la Bioquímica Raquel Gallará, por su inestimable ayuda en el análisis bioquímico y por el afecto puesto en ella.

A los Bioquímicos Jorge Linares y Susana Casallino.

A la Dra Cristina Maldonado en el procesamiento del material de microscopía electrónica.

Al Dr. Otto Orsinger y al personal de la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.N.C.

Al Dr. Raul Grasso, un gran patólogo y amigo.

A la Profesora de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina del Hospital Nacional del Córdoba: Dra Gladis Martellotto y a

la Dra Mónica Bruno por su colaboración desinteresada en la obtención del material fotográfico para microscopía óptica.

A mis maestros mexicanos: Dr. Alberto Monroy García y Jorge Hernández.

A mis entrañables amigos mexicanos.

A mis amigos del "alma" por compartir incondicionalmente el camino.

A dos seres increíble por su desinterés, amor y bondad Javier Perez y Oscar Sema.

Al Sr. Poly Reinoso.

A la Sra. Lucía Artino de Guevara.

Al Sr. Raúl Astorga

A todos aquellos que de una u otra manera me alentaron y apoyaron para concretar este trabajo

**GRACIAS**





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
**\*ZARAGOZA\***  
UNIDAD DE INVESTIGACION EN  
DIFERENCIACION CELULAR Y CANCER  
*Laboratorio de Inmunobiología.*

A QUIEN CORRESPONDA.

Por este conducto certifico que el Od. Luis Mario Plavnik, ha realizado la separación de proteínas y glicoproteínas mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en el Laboratorio de Inmunobiología. Este trabajo forma parte de su proyecto de tesis doctoral titulada: "Efecto de las radiaciones laser de baja potencia sobre las glándulas salivales de cobayo: estudio estructural, ultraestructural y bioquímico".

A T E N T A M E N T E  
" LO HUMANO EJE DE NUESTRA REFLEXION"  
México Distrito Federal, a 29 de Junio de 1999.

Dr. Alberto Monroy García.  
Jefe del Laboratorio de Inmunobiología.



## Centro de Microscopía Electrónica

Universidad Nacional de Córdoba

Casilla de Correo 362

5000 Córdoba, Argentina

Tel y Fax: (3051) 4 333021

Córdoba, 6 de Diciembre de 2000

Por la presente certifico, que las fotografías de microscopía electrónica de transmisión que presenta el Odontólogo Luis Mario PLAVNIK en su trabajo para tesis doctoral, fueron obtenidas de materiales procesados en este Centro de Microscopía Electrónica.



Dra. CRISTINA MALDONADO  
PROF. ADJUNTA  
Centro de Microscopía Electrónica U. N. C.

Córdoba, .....

Es copia fiel del original que tengo  
ante mí. Conste

Prof. Dr. HECTOR GENELMAN  
SECRETARIO ACADEMICO  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA

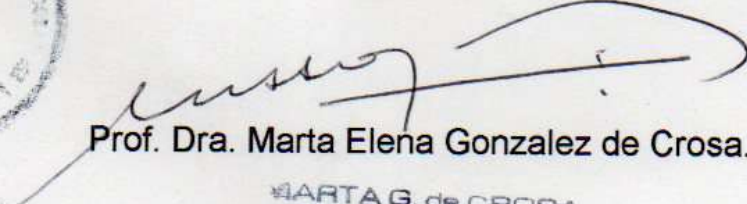


Córdoba, 13 de Diciembre de 2000.

La que suscribe certifica que el Odontólogo Luis Mario Plavnik, ha procesado el material para estudios estructurales pertenecientes a su Trabajo de Tesis Doctoral: "Efectos de las Radiaciones Laser de Baja Potencia sobre las Glándulas Salivales de Cobayo: Estudio Estructura, Ultraestructural y Bioquímico", en el laboratorio de Histopatología de la Cátedra a mi cargo.

Sin otro particular y a los fines que hubiese lugar se extiende el presente certificado.



  
Prof. Dra. Marta Elena Gonzalez de Crosa.

MARTA G. de CROSA  
PROFESORA TITULAR  
HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA

## INDICE

<u>CONTENIDO</u>	<u>FOLIO</u>
<b>Introducción</b>	1
Principios biofísicos del Laser	2
Propiedades termales de los tejidos	5
Características de las Radiaciones Laser de Baja Potencia (RLBP)	6
Glándulas Salivales	9
<b>Objetivos</b>	13
<b>Hipótesis</b>	13
<b>Materiales y Métodos</b>	14
Animales y Tratamiento	14
Procesamiento del material para estudios morfológicos	15
Procesamiento del material para determinaciones bioquímicas	17
Procesamiento estadístico	18
<b>Resultados</b>	19
Estudios Estructurales	19
Estudios Ultraestructurales	30
<b>Discusión</b>	50
<b>Conclusiones</b>	57
<b>Resumen</b>	58
<b>Abstract</b>	60
<b>Referencias Bibliográfica</b>	61



## INTRODUCCIÓN

Una revisión de la historia de la ciencia odontológica nos mostrará que sólo un pequeño número de innovaciones - quizás no más de doce- han influenciado significativamente la práctica dental en los últimos ciento cincuenta años. Estas incluyen (1) : óxido nitroso, (Horace Wells, 1844) ; vulcanita, (Goodyear, 1851) ; rayos X (Roentgen, 1895) ; amalgama (Black, 1895) ; novocaína (Einhorn, 1904), máquina de colados (Taggart, 1906); fluoración (desarrollada por MacKay y Black's, estudio "Colorado Stain", 1915); compuestos de agar-agar ( Poller 1925), rotor a aire (Borden, 1958), resinas compuestas, (Buonocore, 196); y el primer implante oral de titanio (Branenark, 1965).

Actualmente, muchos creen que el laser será (o ya lo es) el próximo avance de significativo impacto que afectará el modo de conducir la práctica odontológica.

El proceso de crear energía laser, conocido como emisión estimulada de energía, fue propuesto por primera vez por Einstein en 1917. Sin embargo no fue hasta los años cincuenta que dos físicos americanos, Schawlow y Townes (2),delinearon los primeros trabajos sobre los principios de L.A.S.E.R. (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation).

En 1960 otro físico americano, Maiman, observó por primera vez la acción de un laser de rubí sólido. Considerando las propiedades anestésicas (y por ende de confort) y el efecto de esterilización propuesto para las radiaciones laser, Stern y Sognnaes (3) comenzaron en 1964 una larga línea de trabajo sobre el uso de este tipo de radiaciones en odontología, investigando sus efectos sobre la permeabilidad a la desmineralización ácida del esmalte expuesto.

Adrian y col (4) hallaron que el laser de rubí producía una cantidad de calor significativo que dañaba la pulpa dental. Otras investigaciones (5 -11) mostraron el efecto de las radiaciones laser sobre los tejidos duros del diente.

Numerosos trabajos se han desarrollado para demostrar la utilidad del uso de las radiaciones laser sobre los tejidos orales blandos, ya sea comparando el efecto del laser con el del bisturí convencional sobre células epiteliales y conectivas (12-16), o los efectos histológicos del laser sobre la mucosa



bucal (17-19), o bien su utilización en el tratamiento de patologías de tejidos orales blandos (20-23). Walsh en 1997(24), estableció que los laser de baja potencia tenían efecto variable sobre las patologías orales.

Se ha establecido que la aplicación de radiaciones laser sería eficaz en la curación de heridas, en la regeneración neuronal, en las pulpotomías y en el tratamiento de las estomatitis aftosa y en la neuralgia post-herpética.

Se describen como tratamientos inciertos los relacionados con sinovitis, artritis, patologías de ATM, absceso periapical agudo, granulomas, dolor orofacial crónico, dolor post-extracción y regeneración ósea.

Een tanto resultan no beneficiosos los tratamientos de gingivitis, alveolitis, periodontitis, pericoronaritis, sinusitis aguda, y en la formación de placa

La abundante información sobre este tipo de radiaciones, posiblemente se deba a la multiplicidad de variables a tener en cuenta cuando son utilizados. Por lo tanto, es importante analizar exhaustivamente los principios biofísicos de las radiaciones láser y las características propias de los órganos sobre los cuales se los aplicará.

### **PRINCIPIOS BIOFISICOS DE LAS RADIACIONES LASER**

L.A.S.E.R. -light amplification by stimulated emission of radiation- significa amplificación de ondas por emisión estimulada de radiaciones.

Un átomo, una molécula o un ión, en su estado de reposo puede ser excitado a estados energéticos más elevados por absorción de energía térmica, óptica o eléctrica. Después que la energía es absorbida por la partícula, ésta retornará espontáneamente a su estado energético inicial por la liberación de la energía captada. Este proceso es conocido como **emisión de radiación espontánea**.

La **emisión de radiación estimulada** es un proceso por el cual un átomo en estado de excitación retorna su estado inicial después de la interacción con una onda incidente de una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de la energía de absorción. El resultado neto de tal interacción serán dos ondas de la misma longitud de onda que se desplazan en la misma dirección y están en la misma fase (2). Se forma



en un sistema atómico molecular adecuado mediante el proceso de emisión estimulada

A partir de este concepto se puede establecer claramente que el laser no es una aparatología, sino que implica un proceso de amplificación de la luz.

### **Componentes básicos del laser:**

1- Un **medio activo** representado por un conjunto de átomos susceptibles de ser estimulados. El anhídrido carbónico, el argón, el neodimio, el helio, el neón, etc. sirven como medio activo de distintos láseres.

2- **Cavidad óptica o resonador láser:** en los extremos del medio activo hay dos espejos paralelos que constituyen.

El espejo frontal está diseñado para reflejar solamente una porción de luz incidente y por lo tanto transmitir una fracción de la energía total. El espejo posterior o reflector total refleja el 100% de la energía de choque.

3- **Fuente de energía o bomba:** es el principal componente del sistema laser.

Esta puede ser de energía térmica, óptica o eléctrica y provee la energía que será absorbida por el medio activo.

Los fotones de luz originados por emisión espontánea, se irradian en todas direcciones, por lo que gran parte de esta energía se disipa en forma de calor. Un pequeño porcentaje de fotones se desplaza a lo largo del eje de la cavidad laser. Estos fotones colisionarán con átomos en estado excitado, estimulando por lo tanto la emisión de radiaciones. (24)

Cuanto más colisiones fotónicas ocurran, más átomos excitados habrá y por lo tanto mayor energía se desarrolla en el resonador.

La intensidad de esta energía intracavitaria es amplificada por reflexión entre los espejos. En el reflector frontal una parte de la energía se escapa de la cavidad formando un haz de luz intensa.

### **Características del rayo láser:**

**Coherente:** Todos los fotones de luz están en sincronía espacial y temporal.

**Monocromático:** Todos los fotones tienen una longitud de onda particular o un lugar en el espectro electromagnético, lo cual ayuda a diferenciarlos, por ejemplo el CO<sub>2</sub> y Nd YAG están en la región infrarroja del espectro y en consecuencia son invisibles, el argón en cambio está en el espectro visible y puede ser



observado a ojo desnudo, al igual que el de helio - neón.

Colimado: significa la no divergencia del rayo.

Estas tres características hacen posible una cuarta propiedad que es una gran brillantez.

El rayo laser puede ser focalizado a través de una lente para originar un rayo convergente, el cual aumenta en intensidad para formar un **punto focal o foco de calor**. Pasando este punto el rayo diverge y el poder disminuye.

Por lo tanto las radiaciones laser pueden usarse focalizadas o no focalizadas (24).

Cuando un rayo laser incide sobre una superficie tisular puede ser: reflejado, dispersado, absorbido, o transmitido.

Reflexión: la luz reflejada rebota fuera de la superficie tisular. Como la energía se disipa tan efectivamente, después de la reflexión hay cierto peligro de daño de otras partes de los tejidos. Se conoce que la reflexión limita la cantidad de energía que entra al tejido.

Dispersión: ocurre cuando la energía de luz rebota de molécula en molécula dentro del tejido, en forma inversamente proporcional al grado de absorción.

Distribuye la energía sobre un gran volumen de tejido disipando los efectos térmicos.

Absorción: ocurre después de una cantidad de dispersión particular para cada tejido y es responsable de los efectos térmicos dentro de los tejidos.

Transmisión: se describe como la energía de luz que viaja más allá de los límites de un tejido dado, irradiando tejidos circundantes. Puede ser cuantificada y es importante cuando se decide utilizar este tipo de terapia.

Otra característica importante para tener en cuenta al seleccionar el tipo de a usar es:

\* Longitud de extinción: es la profundidad sobre la cual el 90% de la energía incidente es absorbida.

Este parámetro se establece en el agua. Los tejidos no están constituidos por un 100% de agua, por lo que la absorción de energía laser en cualquier tejido es la suma de absorción de cada componente tisular.

Una vez que se decidió la utilización de la terapia laser para el tratamiento se deben considerar parámetros de exposición que incluyen:

\* Longitud de onda: es el determinante más importante respecto a cómo la energía laser afecta a los



tejidos. Determina el **tipo** de reacción entre el laser y el tejido mientras que la cantidad de energía depositada y las propiedades tisulares determinan la **extensión** de esta reacción.

\* Intensidad: se puede pensar como una medición instantánea de producción de energía.

ENERGIA (Joules) = INTENSIDAD (Wattios) x DURACION (Segundos)

\* Forma de la onda: describe la forma en la cual la intensidad producida por el laser varía con el tiempo.

Las formas de las ondas hasta ahora obtenidas para el uso dental son: onda continua, onda pulsada, etc.

Para determinar si la energía es absorbida las propiedades de los tejidos se combinan con la longitud de onda del laser utilizado. Si no se absorbe puede no producir ningún efecto. El color y la estructura tisular tienen un efecto mínimo sobre los 10.6  $\mu\text{m}$  de luz emitida por el CO<sub>2</sub> láser debido a que su longitud de onda es bien absorbida. Sin embargo estas características tisulares influyen significativamente sobre los 1.06  $\mu\text{m}$  de luz del Nd: YAG, ya que los tejidos pigmentados absorben más energía laser de Nd: YAG que los no pigmentados.

### **PROPIEDADES TERMALES DE LOS TEJIDOS**

La respuesta tisular a la energía térmica es un aspecto bastante complejo. (25)

Las propiedades térmicas varían entre los tejidos. Las que participan en las respuestas tisulares son:

Difusividad térmica: es la capacidad de los tejidos para conducir calor bajo una exposición a un gradiente de temperatura transitoria.

Coefficiente térmico de exposición: mide la expansión que ocurre en los materiales cuando son calentados.

Capacidad calórica: es la cantidad de energía calórica necesaria para aumentar 1°C la temperatura de 1 cm.<sup>3</sup> de material.

Fase de transformación de temperaturas: son las temperaturas de vaporización, fusión de los componentes tisulares.

Calor latente de transformación: es la cantidad de energía requerida para causar la transformación de un material sólido a líquido y luego un líquido a gas después que han alcanzado la fase de transformación de temperaturas.



## **TIPOS DE LASER DE USO MEDICO Y ODONTOLÓGICO** (25)

**Láseres blandos:** son los que tienen una fuente de energía baja o fría (atérmica), emitida en longitudes de onda pensadas para ayudar la regeneración tisular, en acelerar la curación de heridas, disminuir el dolor, reducir la inflamación y el edema. Los tipos de láseres blandos más utilizados son tres: helio- neón, arseniuro de galio y arseniuro de galio – aluminio.

**Láseres duros:** o térmicos, utilizados en cirugía, como fuente de energía para cortar, coagular y vaporizar. (27) Son aparatologías de alto costo, que desarrollan dentro de los tejidos gran cantidad de energía calórica. Los más utilizados son: de CO<sub>2</sub>, Neodinium Yag y Argón.

## **CARACTERÍSTICAS DE RADIACIONES LASER DE BAJA POTENCIA (R.L.B.P.)**

En 1963 Mester y col (27) experimentando con animales sobre el posible efecto carcinogénico de las radiaciones láser, observaron que en la periferia de las zonas irradiadas, con dosis de 1 J/cm<sup>2</sup> estimulaba el crecimiento del pelo. Este fenómeno se inhibía hasta producir la pérdida del pelo cuando las dosis utilizadas se incrementaban.

Esto lo llevó a experimentar con láseres de baja intensidad y a estudiar sus efectos bioestimulantes principalmente en úlceras cutáneas crónicas resistentes a tratamientos clásicos (28- 29).

Muchos de los primeros reportes han sido realizados por varios grupos de Europa Oriental y la mayoría de ellos son anecdóticos y sin valor científico.

De importancia en el desarrollo de este tipo de radiaciones y de su posible aplicación fue la teoría del Bioplasma desarrollada por Inuyin y Chekerov que sostiene que la materia viva no sólo tiene una estructura material (bioquímica) si no que, además dispone de una estructura energética bien definida por su distribución espacial y disposición. (30)

### **Espectro:**

La radiofrecuencia y los agentes infrarrojos liberan más de cientos de watos y producen sus efectos



por gran calentamiento tisular que superan los 5° C.

Sin embargo los láseres blandos, tienen una producción de poder en orden de magnitud menores y una elevación de la temperatura asociada de  $\leq 0,5$  a  $0.75^{\circ}\text{C}$ .

Estos cambios térmicos tempranos son usualmente imperceptibles y demasiado bajos y localizados como para producir efectos fisiológicos importantes.

La terapia con laser blando implicó láseres con producción de poder de  $\leq 1\text{mW}$ .

Hoy los tratamientos son realizados con aparatología que tiene una producción de poder entre 10 y 90 mW (ocasionalmente algunos pocos están por encima de 100 mW).

Los tiempos de tratamiento, mientras tanto, se han acortado en la medida que las potencias aumentan. La exposición radiante liberada a los sitios tratados ha permanecido usualmente cerca de los niveles de 1-4 J/cm<sup>2</sup> establecido por los primeros investigadores.

Las longitudes de onda utilizadas por esta aparatología están en un espectro que se extiende de 600 a 1300 nm.

Los láseres de baja potencia más utilizados en la clínica son:

<u>LASER</u>	<u>LONGITUD DE ONDA (nm.)</u>
Helio-Neón	632,8 nm.
Arseniuro Galio Aluminio	820,830 nm.
Arseniuro de Galio	904 nm.

Strang y col (31) realizaron una revisión sobre el uso de los láseres de baja potencia en el campo dental y observaron que entre las comunicaciones publicadas hay diferencias en términos de métodos experimentales, métodos de registros, y condiciones de irradiación.

Sin embargo, existe coincidencia con respecto a los distintos efectos atribuidos a las radiaciones láseres de baja potencia (32). Estos efectos se clasifican en:

#### **a-EFECTOS DIRECTOS:**

##### **1- BIOQUIMICOS:**

- Aumento de los niveles de AMP cíclico.
- Aumento de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.



- Incremento de beta endorfinas.

- Liberación de sustancias preformadas, como acetil colina e histamina.

## 2- BIOELECTRICOS

- Cambios en los potenciales de membrana.

### **b- EFECTOS INDIRECTOS:**

- Estímulo de la microcirculación, Se produce una "parálisis" del esfínter precapilar con una vasodilatación persistente.

- Aumento del trofismo celular por estímulo de la capacidad de cicatrización del tejido conectivo y neoformación de vasos sanguíneos.

### **c- EFECTOS TERAPEUTICOS:**

#### 1- ACCION ANALGESICA:

- Aumento del umbral de percepción en los nociceptores, creando como consecuencia una acción analgésica.

- Estimula la producción de neurotransmisores endógenos tales como las beta endorfinas que bloquean el proceso enzimático a nivel de las membranas del nervio sensitivo aferente (33,34), regulando la información sensitiva por inhibición de la liberación de la sustancia "P" o de otros transmisores excitadores.

- Estabilización de la membrana celular por hiperpolarización disminuyendo el efecto algico de las bradiquininas y prostaglandinas a nivel de los receptores. Esta acción se realiza por obstrucción de los canales de potasio al reorientarse las lipoproteínas de la membrana, conduciendo a la célula a un estado refractario con una analgesia momentánea.

#### 2- ACCION ANTIINFLAMATORIA:

- A través de la aceleración de la microcirculación (35,36) originando cambios en la presión hidrostática del capilar con reabsorción del edema y eliminación de la acumulación de catabolitos intermediarios como los ácidos láctico y pirúvico.

- Al aumentar la renovación de la sangre se favorece el aporte de neutrófilos y monocitos para cumplir con las funciones de defensa.

### 3- ACCION BIOESTIMULATIVA Y TROFICA CELULAR:

Este efecto probablemente proviene de la sumatoria del efecto a nivel circulatorio con el efecto potenciador de la producción de energía disponible en la célula. (37).

-Producción de ATP por las mitocondrias después de la irradiación con láser. Este incremento ha sido estudiado y cuantificado, registrándose un incremento del 22 % de ATP

Estudios realizados sobre algunos tejidos en particular han demostrado:

-Aumento de la función de fibroblastos y como consecuencia aumento de las fibras colágenas.

- Regeneración de los vasos sanguíneos

-Aumento de la velocidad de crecimiento de nervios seccionados

- Incremento de la reepitelización a partir de estratos basales.

- Aumento del ritmo de división celular

Sin embargo, es sorprendente lo poco que se conoce del efecto de estas radiaciones sobre las glándulas salivales, a pesar de su gran importancia en la homeostasis oral. Por ello dedicamos la próxima sección a describir algunos aspectos de la estructura y función de estos órganos.

### GLANDULAS SALIVALES

Son órganos responsables de la producción de saliva.

Se dividen en dos grandes grupos:

Glándulas salivales mayores: son la parótida, submaxilar, sublingual y también se consideran en este grupo las glándulas infraorbital y bucal (o molar) de los carnívoros (38). Son de gran tamaño, la mayoría de localización extraoral y elaboran la mayor parte de la saliva. Secretan proteínas, glucoproteínas, glicosaminoglicanos, electrolitos y agua.

Glándulas salivales menores: se localizan en la submucosa o en la lámina propia de los tejidos que rodean la cavidad bucal. Se designan de acuerdo a su localización anatómica (por ejemplo: labiales, linguales, palatinas, e incluso genianas).

Lesson (39) propuso lo que hoy es generalmente aceptado como una descripción histológica de las glándulas salivales: "piezas terminales secretorias, con un sistema intralobulillar y uno extralobulillar



de conductos excretorios”.

Sin embargo, existe una gran variabilidad de células de piezas terminales secretorias, multiplicidad de las células de conductos y la organización de los componentes para formar las glándulas es también muy heterogénea.

La microscopía electrónica ha demostrado aún más la diversidad de estos órganos. Los gránulos secretorios poseen una gran heterogeneidad que fue bien demostrada por Tandler (40), Tandler y Mac Callum (41), Imai y col (42) e Ichikawa (43). Los métodos histoquímicos también ponen de manifiesto diferencias en los productos secretorios de las distintas glándulas salivales (44-46).

Además se han encontrado diferencias en el modo de secreción de las células mucosas y serosas y las células de los conductos (47-57.) y en la composición de la fracción glicoprotéica de la saliva (58-63).

Estas diferencias en estructura y función hace que no se pueda hablar de una glándula salival típica, y quizás esto se relacione con las grandes variaciones de su funcionalidad (por ejemplo, procesos de síntesis y secreción de proteínas) por acción de diferentes factores extrínsecos, algunos similares y otros diferentes para cada glándula.

Samar y col. (64,65) demostraron modificaciones estructurales y ultraestructurales del parénquima y estroma de glándulas submaxilar y sublingual de ratas adrenalectomizadas.

Abe y Dawes (66), y Abe y col (67,68) hallaron que las proteínas características (tipo  $\alpha$ ) eran secretadas por las glándulas salivales en respuesta a altas dosis de agonistas  $\alpha$  adrenérgicos; opuestamente a ellas las tipo  $\beta$  eran secretados por la acción de agonistas  $\beta$  adrenérgicos y agonistas colinérgicos y con bajas dosis de agonistas  $\alpha$  adrenérgicos.

Denny y Denny (69) demostraron que el uso crónico de isoproterenol produce en ratas jóvenes y maduras, cambios similares a los del desarrollo.

Gresik y Azmitia (70), Gesik y col en (71) y Gresik y col. (72) demostraron una declinación por la edad en el factor de crecimiento epidermal (EFG) y disminución en el ARNm para EFG en glándula submandibular de ratas.

Mehansho y Carlson (73) demostraron que el isoproterenol en glándula



submandibular y parótida de rata actúan sobre la expresión genética de estos tejidos secretorios.

Crosa y col (74) demostraron que el isoproterenol induce cambios en el trazado electroforético de proteínas y glicoproteínas en glándula parótida de cobayos.

Levy y col (75) demostraron que ratas sometidas a diferentes tipos de dietas presentaron distintos grados de modificaciones estructurales y funcionales del parénquima de submaxilar y sublingual .

Crosa y col (76) encontraron también modificaciones citoquímicas y ultraestructurales en glándulas salivales de ratas sometidas a una dieta láctea.

Crosa y col (78) y Malberti y col (77, 79-82) describieron modificaciones estructurales y ultraestructurales producidas en glándula parótida de cobayos sometidos a diferentes tiempos de ayunos. Estos autores han descritos variaciones en el comportamiento de la amilasa salival y de proteínas solubles en glándulas salivales sometidas a diferentes condiciones experimentales.

Malberti y Crosa (80) y Malberti (83) encontraron que una gran dosis de colchicina produce alteraciones del citoesqueleto que por otra parte modifica los procesos de síntesis y secreción en glándula parótida de cobayo.

Se conoce que el ciclo secretorio de las glándulas salivales requieren entre 12 y 18 horas para que las proteínas secretorias se acumulen nuevamente después de una secreción. (84,85).

Crosa y Malberti (78,86) desarrollaron un modelo experimental en glándulas parótida de cobayos que permitió estudiar algunos aspectos del proceso secretorio y de la síntesis de amilasa, principal proteína secretada por esta glándula, y establecieron que entre las 10 y 12 h. de ayuno se produce el pico máximo de concentración de proteínas solubles y de actividad de amilasa lo que coincide con la máxima acumulación de gránulos secretorios en el citoplasma. Este modelo es utilizado para el estudio de los procesos de síntesis y secreción de proteínas debido a la posibilidad de transferir los resultados a humanos.

Se conoce que diferentes tipos de radiaciones o formas de energía pueden ser aplicadas tanto en la clínica como en el campo experimental. Sin embargo debe señalarse que no todas las radiaciones producen o inducen cambios similares en las estructuras titulares.

La bibliografía describe que radiaciones tales como la luz ultravioleta y los rayos X son capaces de



producir mutaciones genéticas en los tejidos (25).

Los efectos de las radiaciones láser sobre los tejidos dependen de la longitud de onda, de la potencia administrada por unidad de área y del tiempo de exposición. Los láseres blandos tienen predominantemente un efecto foto-químico.

Los láseres duros tienen un efecto principalmente térmico, induciendo coagulación, vaporización y carbonización.

Los trabajos de Juri y col (87) confirmaron estos hallazgos cuando trataron glándulas submandibular de cobayos con laser de Nd: Yag.

Samar y col (88) demostraron que la irradiación de laseres blandos sobre glándulas salivales de pollo recién nacidos producen alteraciones en el parénquima glandular a diferentes tiempos post-irradiación.

Si bien los resultados de los trabajos publicados sobre la aplicación de radiaciones laser de baja potencia encuentran una clara evidencia de alteraciones tisulares, esta interacción laser- tejido no ha sido suficientemente aclarada.

Karu Ti (89) demostró que los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial se modifican según la frecuencia del laser, constituyendo esto la base de algunos de los efectos que los láseres blandos podrían tener.

Se ha descrito que las radiaciones laser de baja energía pueden aumentar o disminuir la síntesis de proteínas (90,91) y la diferenciación y crecimiento celular (92,93).

Otros autores, (94-99) han postulado que cuando los láseres de baja energía se aplican sobre diferentes tejidos hay un aumento de la motilidad celular, del potencial de membrana y de su afinidad por ligandos, de la secreción de neurotransmisores, de la fagocitosis, la síntesis de ATP y prostaglandinas. Se conoce que diferentes tipos de radiaciones o formas de energía pueden ser aplicadas tanto en la clínica como en el campo experimental. Sin embargo debe señalarse que no todas las radiaciones producen o inducen cambios similares en las estructuras tisulares.

Considerando que las radiaciones laser de baja potencia por su potencial efecto bioestimulante serían

de gran utilidad en el tratamiento de patologías que afectan el proceso secretorio de las glándulas salivales, y como no se conoce con certeza el efecto de las mismas sobre estos órganos es que nos propusimos la investigación cuyos resultados se exponen y analizan según los siguiente objetivos:

### **OBJETIVOS GENERALES**

Estudiar los efectos de las radiaciones laser de Helio-Neon (He-Ne) sobre las glándulas submandibulares de cobayos adultos.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1- Estudiar las posibles modificaciones estructurales y ultraestructurales (TEM) de las glándulas submandibulares de cobayos adultos irradiadas con laser de He-Ne.
- 2- Estudiar mediante la aplicación de métodos bioquímicos las posibles modificaciones en el contenido de proteínas y glicoproteínas de las glándulas submandibulares de cobayos adultos irradiadas con laser de He-Ne.

La **HIPÓTESIS** de trabajo es que:

Las radiaciones laser de baja potencia modifican el proceso de síntesis y secreción de proteínas de las glándulas salivales de cobayo.



## MATERIALES Y METODOS

### Animales

Se utilizaron 144 cobayos machos adultos de  $150 \pm 30$  g de peso corporal.

Los experimentos fueron realizados según las normas internacionales para la investigación biomédica con animales. (Declaración de Helsinki)

Los animales fueron divididos en dos grupos: controles (animales ayunados) y experimentales (animales irradiados más ayuno). Cada grupo se subdividió en seis subgrupos de doce animales cada uno, según el siguiente diseño experimental:

CONTROLES	PROBLEMAS
animales recién comidos	animales recién comido + laser
animales con ayuno de 2 h.	Laser más ayuno de 2 h.
animales con ayuno de 4 h.	Laser más ayuno de 4 h
animales con ayuno de 8 h.	Laser más ayuno de 8 h
animales con ayuno de 10 h	Laser más ayuno de 10 h.
animales con ayuno de 12 h.	Laser más ayuno de 12 h.

### Tratamiento:

Todos los animales fueron anestesiados con una solución de hidrato de cloral al 16% (con una dosis de 400 mg de hidrato de cloral/ Kg de peso corporal) Se les desinfectó la piel y se rasuró la zona comprendida entre el maxilar inferior y el esternón. A los animales problemas, se les realizó una sola incisión en la línea media a través de la piel, desde la altura del maxilar inferior hasta el esternón. Posteriormente se retrajo la piel a derecha e izquierda quedando así expuesta la fascia muscular subcutánea la que se cortó y retrajo a ambos lados dejando entonces expuestos los paquetes glandulares submaxilar y sublingual (foto 1)

Posteriormente, ambas glándulas derecha e izquierda fueron irradiadas con laser de He-Ne con una potencia máxima de 7 mW, un spot de 0.75 mm. , de modalidad pulso continuo durante dos minutos en una sola sesión de exposición. (foto 2).



Se aplicó una densidad de energía de 10.8 Joul/cm<sup>2</sup>. La zona irradiada se marcó con tinta indeleble. Finalizada la exposición a la radiación se suturó la piel y los animales fueron mantenidos en jaulas individuales excepto los animales recién comidos, a los cuales se les extirparon ambas glándulas submandibulares inmediatamente después de la irradiación.

Los restantes subgrupos fueron ayunados durante 2, 4, 8, 10 y 12 h. post irradiación tiempo después del cual con un punch de 5 mm de diámetro se tomaron biopsias de la zona irradiada. Luego realizó el mismo procedimiento con la glándula contralateral. Posteriormente se sacrificó el animal con inhalación de una sobredosis de éter.

En los animales controles se les realizó una operación simulada (incisión más sutura). Ambas glándulas submandibulares se extirparon a los mismos tiempos que los animales problemas correspondientes. En todos los casos la glándula submandibular derecha se utilizó para los estudios morfológicos y la izquierda para determinaciones bioquímicas.

### **PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARA ESTUDIOS MORFOLOGICOS**

#### **a-MICROSCOPIA OPTICA:**

Las glándulas se fijaron en solución de Bouin durante  $\pm$  24 h., posteriormente fueron deshidratadas en alcoholes de graduación creciente e incluidas en parafina según las técnicas de rutina. Se realizaron cortes seriados los que fueron coloreados con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H/E).

#### **b- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)**

Para los estudios ultraestructurales las glándulas fueron fijadas en Karnovsky buffer cacodilato pH 7,2 durante 4 a 6 horas a temperatura ambiente y post fijadas en tetróxido de osmio al 1% dos horas como mínimo y 12 horas como máximo. Las muestras se deshidrataron en acetonas de graduaciones crecientes y se incluyeron en Araldita.

Los cortes ultrafinos se colorearon con citrato de plomo y acetato de uranilo y fueron analizados en un microscopio electrónico de transmisión SIEMENS EMILSKOP 101.



**FOTO 1 – Paquetes glandulares expuestos**



**FOTO 2- Irradiación de la glándula submandibular con laser de He-Ne**





## **PROCESAMIENTO DEL MATERIAL PARA DETERMINACIONES BIOQUIMICAS**

Las glándulas submaxilares izquierdas fueron disecadas, decapsuladas, pesadas, homogeneizadas y ultracentrifugadas durante 30 minutos a 14000 g a temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ .

Alícuotas del sobrenadante se utilizaron para la determinación de proteínas solubles según la técnica de Lowry (100), y se expresaron los resultados en miligramos de proteínas/ gramo de glándula (peso fresco).

Del mismo sobrenadante se utilizaron alícuotas para realizar separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-page). Se prepararon geles con una concentración acrilamida – bisacrilamida del 12.5% de acuerdo al método de Johnson y Alvares (101).

Realizadas las determinaciones de proteína solubles anteriormente para cada caso, se obtuvo una cantidad de sobrenadante correspondiente a una concentración de 20  $\mu\text{g}$  de proteínas y se colocaron en un tubo Eppendorf. Posteriormente se agregó 7.5  $\mu\text{l}$  de Buffer Laemli, se centrifugó para obtener una solución homogénea y se llenaron los pozos con ellas, colocando siempre en el primer pozo proteínas marcadoras de varios pesos moleculares conocidos (Fosforilasa B 98 kDa; Albúmina Bovina 66 kDa; Ovoalbúmina 43 kDa; Anhidrasa carbónica 30 kDa; Inhibidor de Tripsina, 20kDa; y Citocromo C 14 kDa) . La separación electroforética se desarrolló durante 2.30 h- a 65 voltios, utilizando una cámara de corrida vertical Mighty Small II SE 250 (Hoefer Scientific Instruments) y una fuente de poder HSI PS 1500 DC Power Supply (Hoefer Scientific Instruments).

Una vez terminado el tiempo estipulado, los geles fueron separados y colocados en solución colorante azul brillante de Coomassie Blue R –250 durante 1 h.

Posteriormente se desechó el colorante y se agregó la solución decolorante (5% de metanol, 7% de ácido acético y 88% de agua), para que actuara toda la noche. Los geles fueron retirados de la solución decolorante, colocados sobre un papel de filtro de tamaño similar al de los geles y secados con una secadora de geles Dreyer Gel SDG 4050 (SAVANT) durante 90 minutos.

Con los geles montados en el papel de filtro se obtuvieron datos de densidad óptica y peso moleculares de las bandas.



### Densidad Óptica

La imagen fotográfica del gel se digitalizó y la intensidad de cada banda se determinó mediante la utilización de un programa de análisis y procesamiento de imágenes llamado UTHSCSA *Image Tool*, desarrollado en el *Department of Dental Diagnostic Science* del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas, San Antonio, Texas, U.S.A.

### Peso Molecular

La imagen del gel sucesivamente se convirtió, normalizó y luego se analizó utilizando el programa *GelCompar 4.1*, diseñado para el estudio y análisis comparativo de perfiles electroforéticos, y desarrollado por *Applied Maths, Kortrijk, Belgium*. El peso molecular de cada una de las bandas se determinó, utilizando como referencia las proteínas marcadoras de peso molecular conocido, corrido simultáneamente con las muestras.

### **PROCESAMIENTO ESTADISTICO**

Los resultados de las determinaciones bioquímicas fueron procesados estadísticamente por medio del test t Student...Para las comparaciones intergrupos se utilizó el método ANOVA

# **RESULTADOS**

## **ESTUDIOS ESTRUCTURALES**

El estudio de las preparaciones histológicas demostró los siguientes resultados:

### **Casos controles**

#### **Recién comidos:**

Se observaron dos zonas muy marcadas: una angosta, periférica y menos basófila y otra central muy ancha intensamente basófila.

En el interior de algunos conductos, en especial los interlobulillares, se encontró una secreción coloidal acidófila. (foto 3)

#### **2 horas:**

Se observaron las dos zonas anteriormente descritas , vasodilatación, aumento del MALT (tejido linfoide asociado a mucosas) periductal y escasa secreción en la luz de los conductos, y vacuolización de las células ductales ( fotos 4 y 5 ) .

#### **4 horas:**

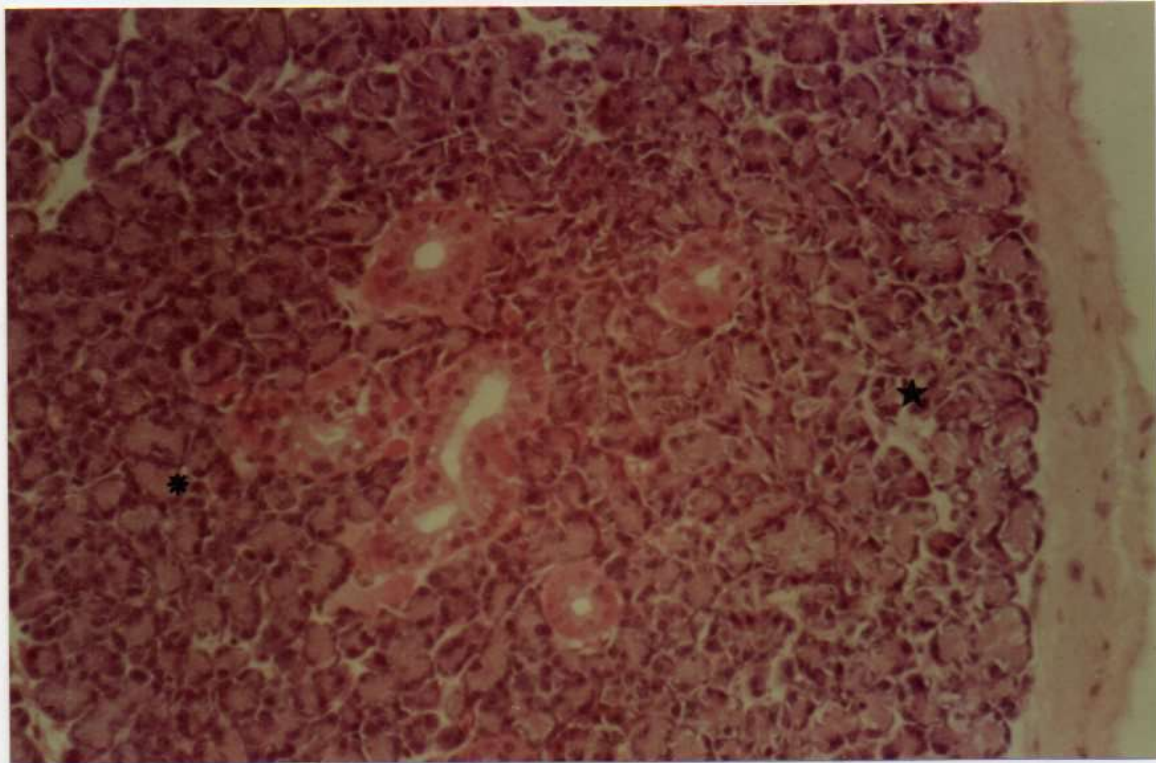
Se observó vacuolización citoplasmática en las células ductales, escasa secreción en la luz de los conductos, los que aparentaban ser más pequeños con respecto a los de los tiempos anteriores. (foto 6)

Las células acinares presentaron núcleos con nucleolos evidentes, e intensa basofilia en el polo basal.(foto 6)

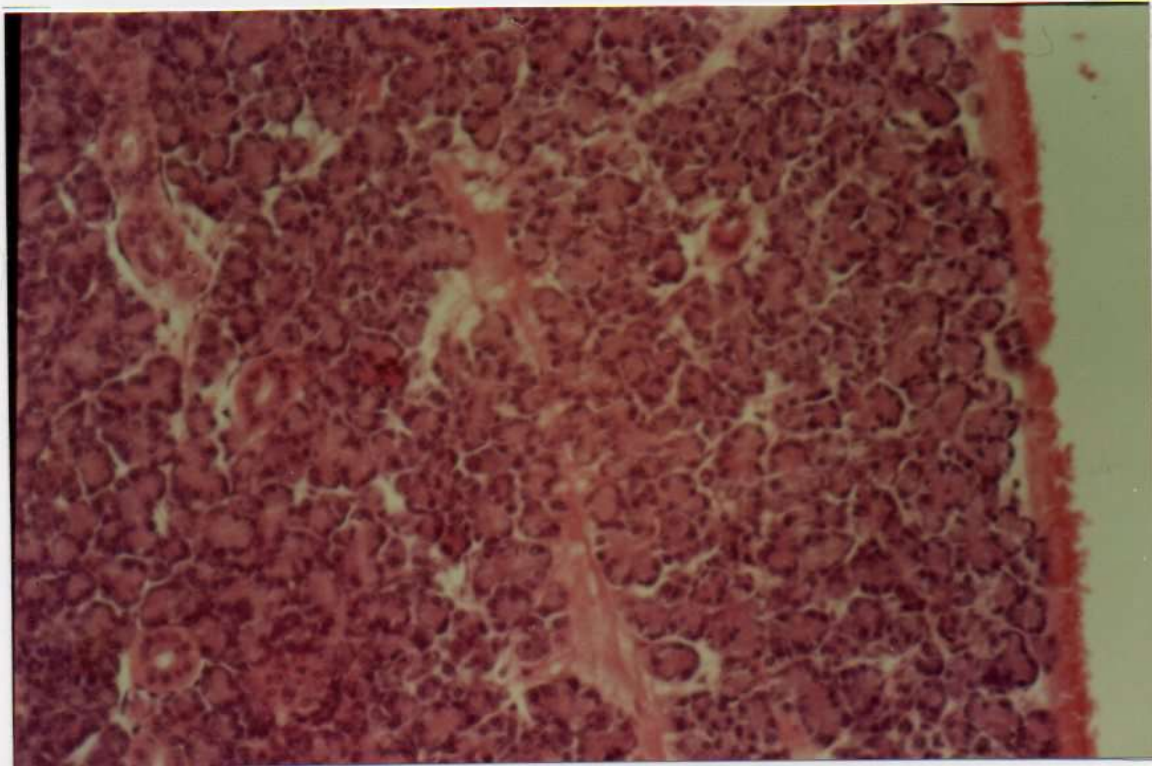
#### **8 horas:**

El aspecto general de la preparación fue muy similar al tiempo anterior, pero con menor vacuolización de las células ductales y rastros de secreción en la luz de los conductos (foto 7).



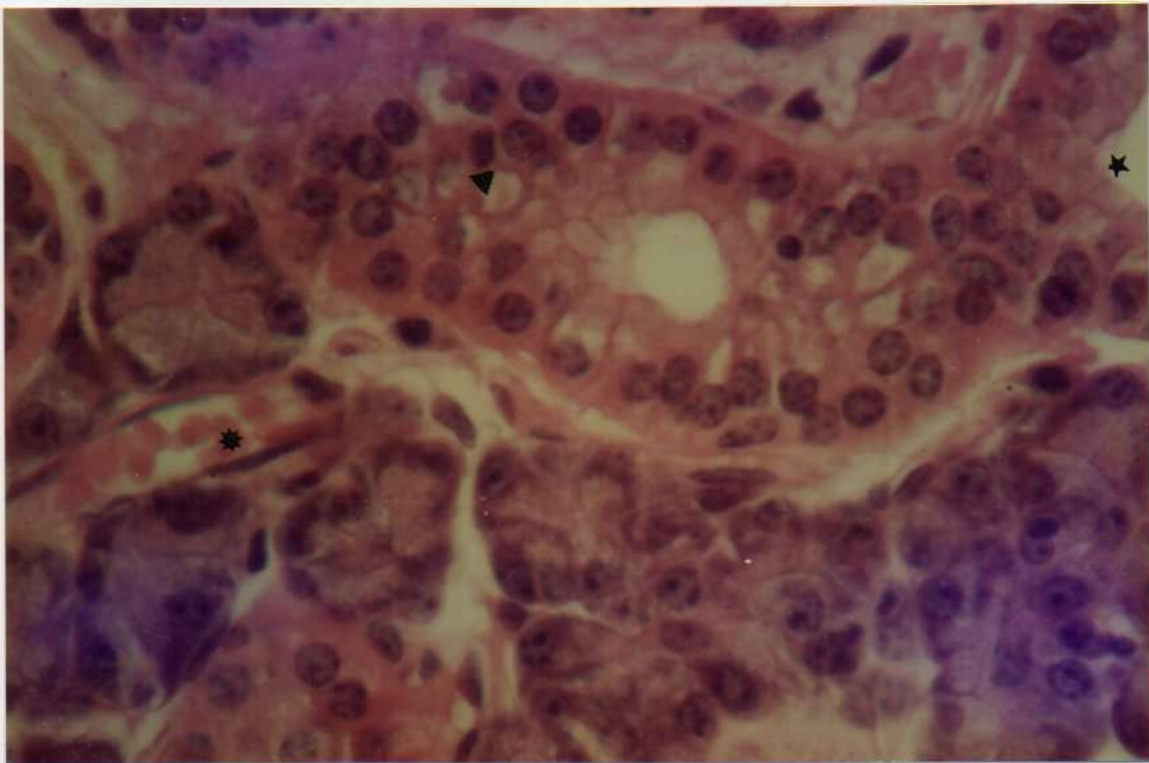


**FOTO 3- Microfotografía control recién comido donde se observan dos zonas: central muy basófila (★), y otra periférica central menos basófila (\*). Hematoxilina - Eosina x 100..**

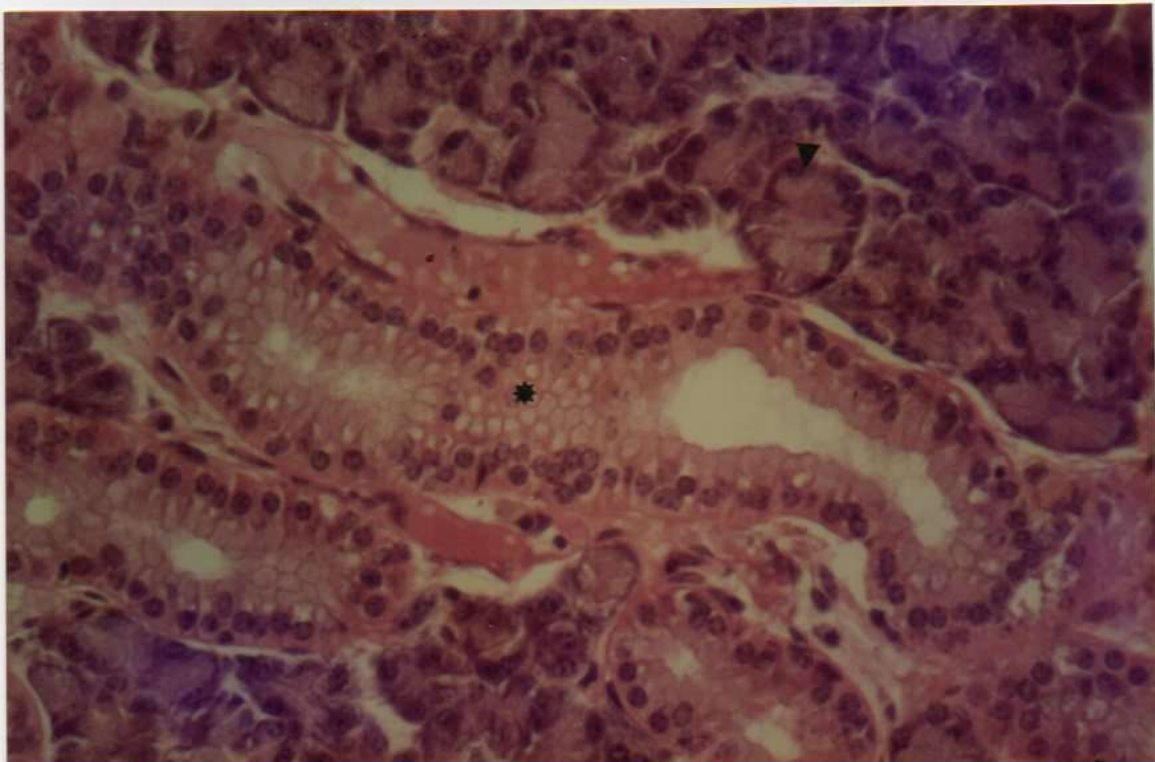


**FOTO 4- Microfotografía control 2 horas, se puede visualizar vasodilatación. Hematoxilina- Eosina. X 100.**





**FOTO 5- Microfotografía control 2 horas, que muestra vacuolización de las células ductales (▼), escasa secreción en la luz de los conductos (\*) y vasodilatación (\*). . Hematoxilina-Eosina. x 400**



**FOTO 6- Microfotografía control 4 horas, observamos vacuolización de las células ductales (\*) y células acinares con basofilia basal (▼) Hematoxilina-Eosina. X400**

A las 10 y 12 horas no se encontraron modificaciones estructurales con relación al tiempo anterior, excepto por menor vacuolización del citoplasma de las células ductales y ausencia de secreción en la luz de los conductos (fotos 8 y 9).

### **Casos problemas**

#### **Recién comidos**

En algunos conductos interlobulillares se observó abundante secreción coloidal ( y en otros material secretorio de aspecto filamento. Los vasos eran congestivos. (foto 10).

#### **2 horas**

En la zona irradiada se observó claramente vasodilatación importante, ligero infiltrado linfocitario alrededor de algunos conductos y vasos. Los conductos excretorios presentaban vacuolización citoplasmática y escaso contenido de un material secretorio de aspecto granular .(fotos 11 y 12 ).

El rasgo más notorio en este tiempo fue la aparición de vasos linfáticos con evidente dilatación. ( foto 13).

#### **4 horas**

Los acinos glandulares presentaban un contenido granular intensamente basófila. Se encontró congestión vascular e infiltrado perivascular . La mayoría de los conductos presentaron secreción en su luz.. (foto 14)

#### **8 horas**

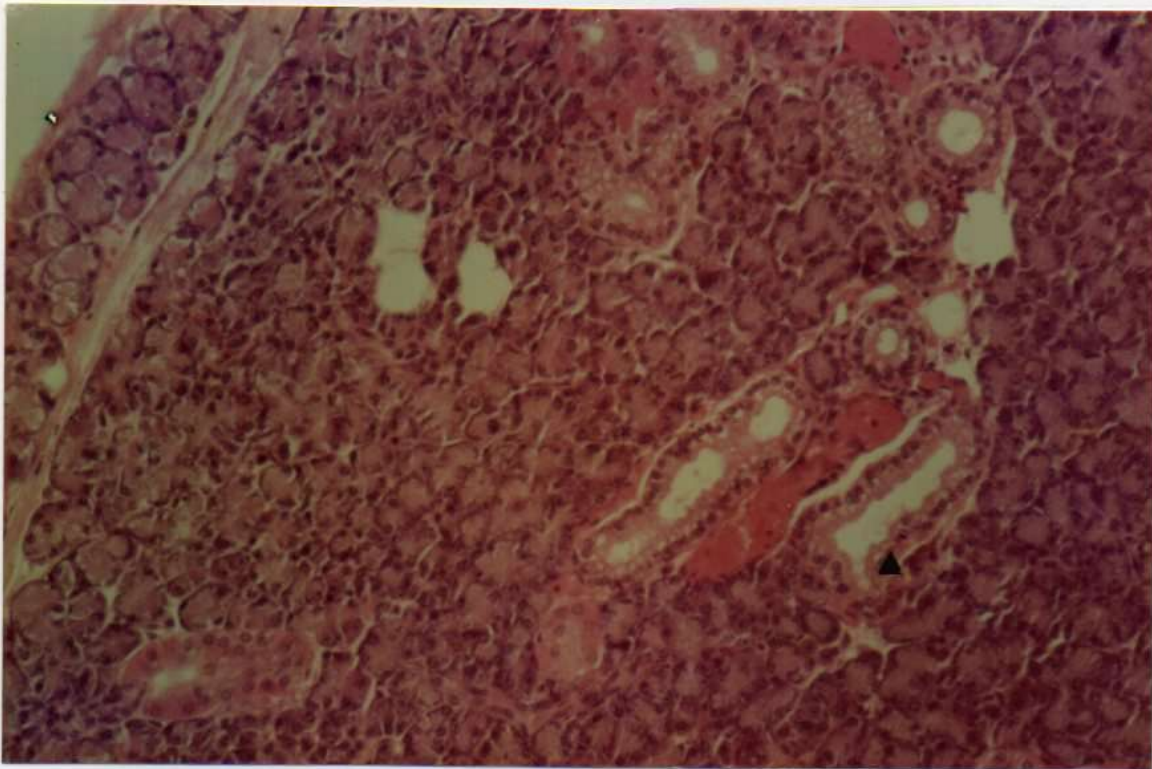
Se observó aumento del cuadro congestivo vascular y secreción ductal filamentosa. (foto 15).

#### **10 horas**

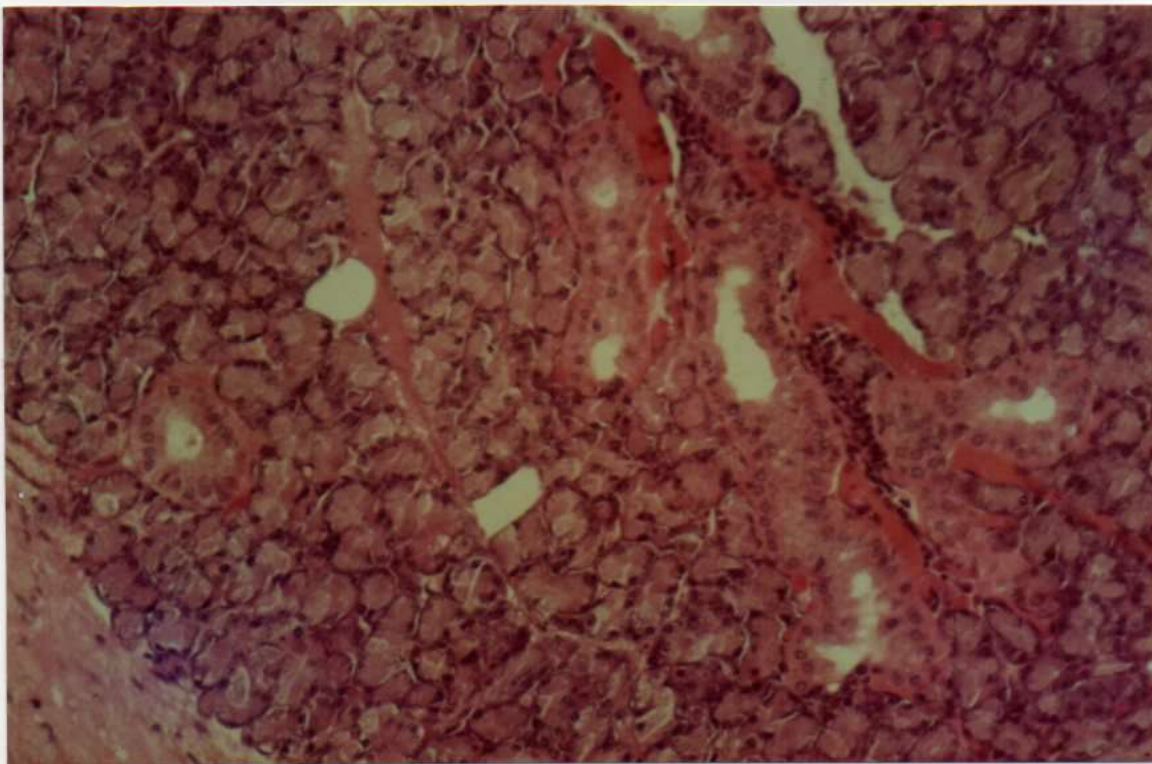
El análisis morfológico demostró intensa vasodilatación con extravasación de elementos figurados: hemorragia intersticial (que deja como secuela la cicatrización fibrosa) respuesta responsable de la necrosis acinar (fotos 16,17, y 18 ).

En la zona de irradiación se observó necrosis celular en "migaja" producida por efecto de la radiación. (fotos 19 y 20)



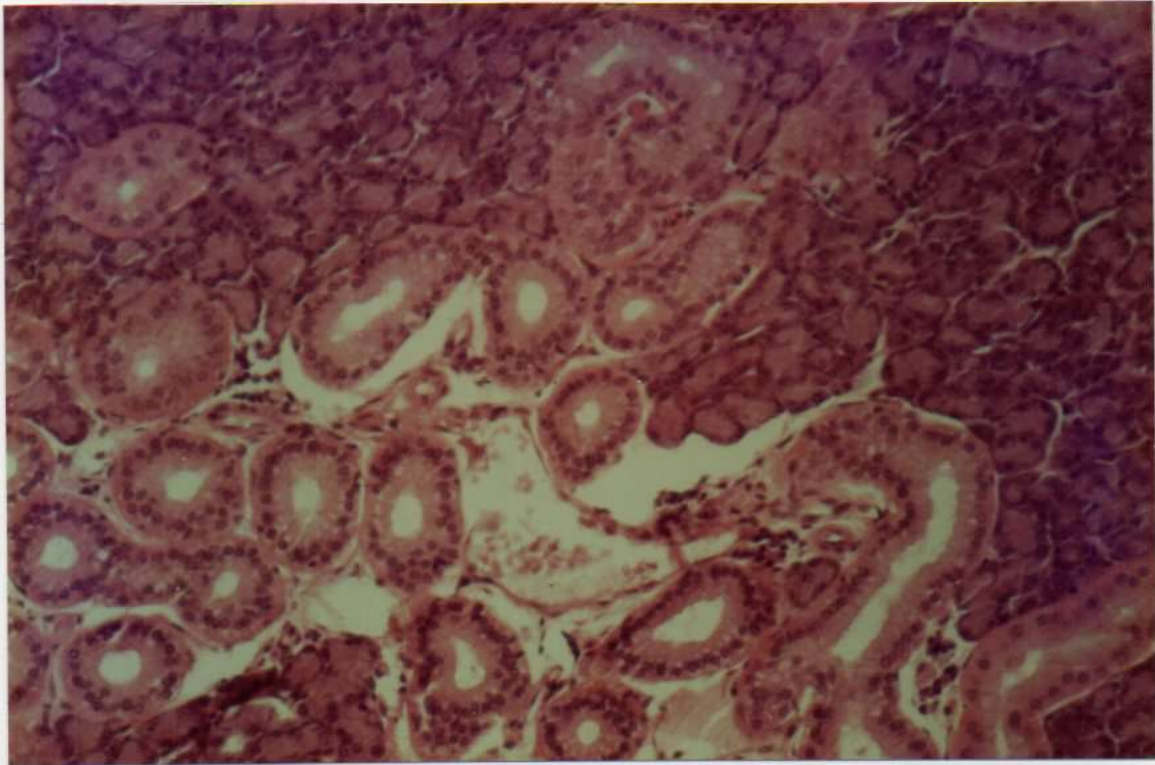


**FOTO 7- Microfotografía control 8 horas, es visible menor vacuolización de las células ductales (▲). Hematoxilina-Eosina. X 100**

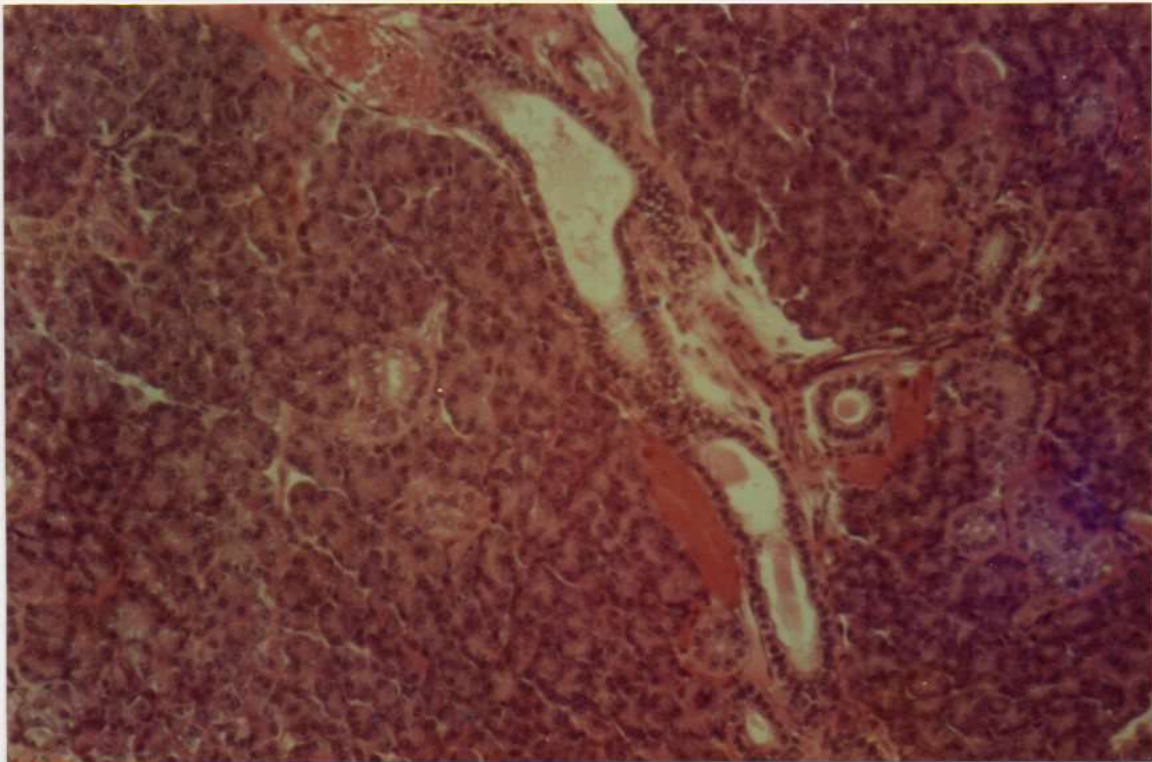


**FOTO 8- Microfotografía control 10 horas, prácticamente no observamos vacuolización de células ductales ni secreción en los conductos. Hematoxilina-Eosina. X100**



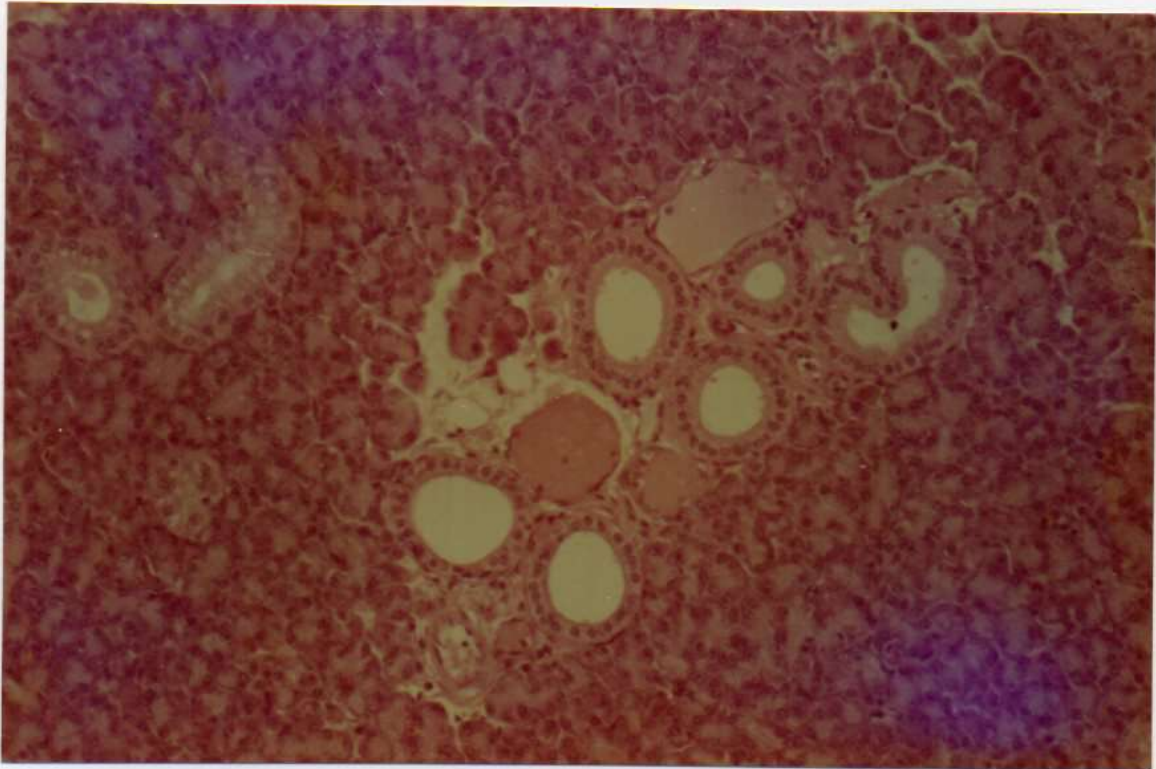


**FOTO 9- Microfotografía control 12 horas prácticamente no se observa vacuolización de células ductales ni secreción en los conductos. Hematoxilina-Eosina. X100**

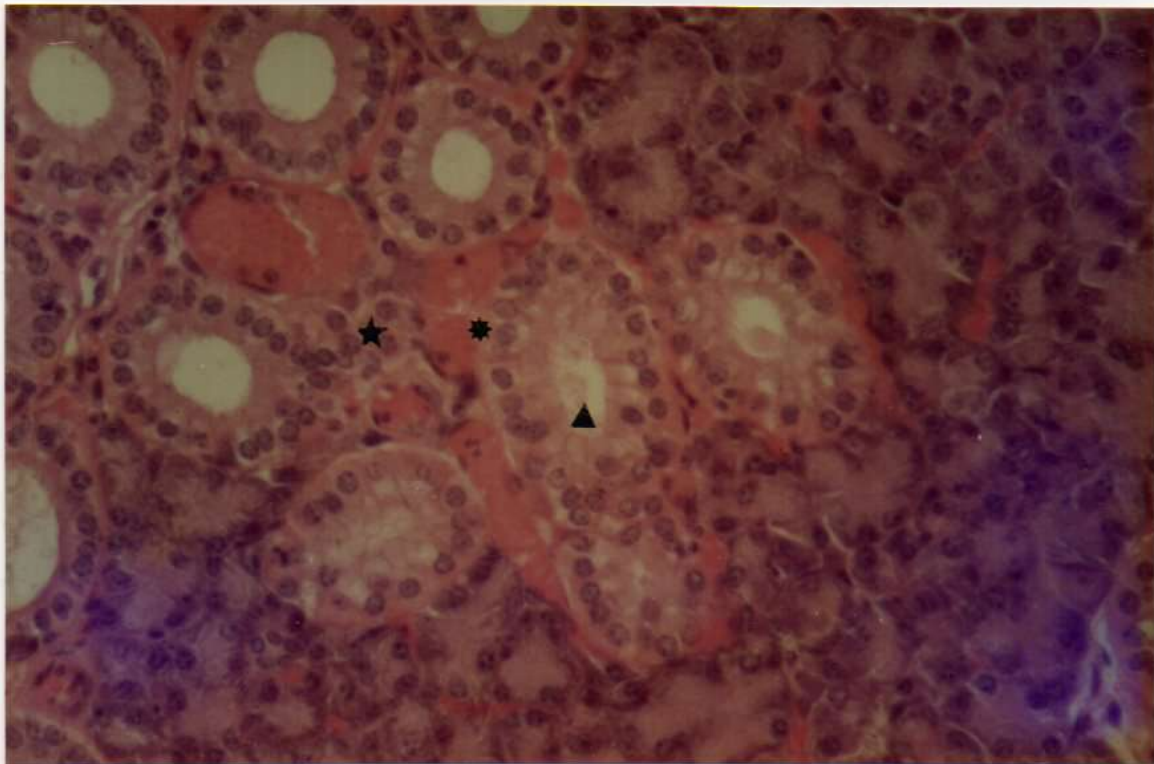


**FOTO 10- Microfotografía problema recién comido, se visualizan vasos congestivos y en algunos conductos secreción coloidal y en otros filamentosa. Hematoxilina-Eosina. X100**





**FOTO 11- Microfotografía control problema 2 horas donde se observa dilatación de vasos sanguíneos y linfáticos. Hematoxilina-Eosina. X 100.**

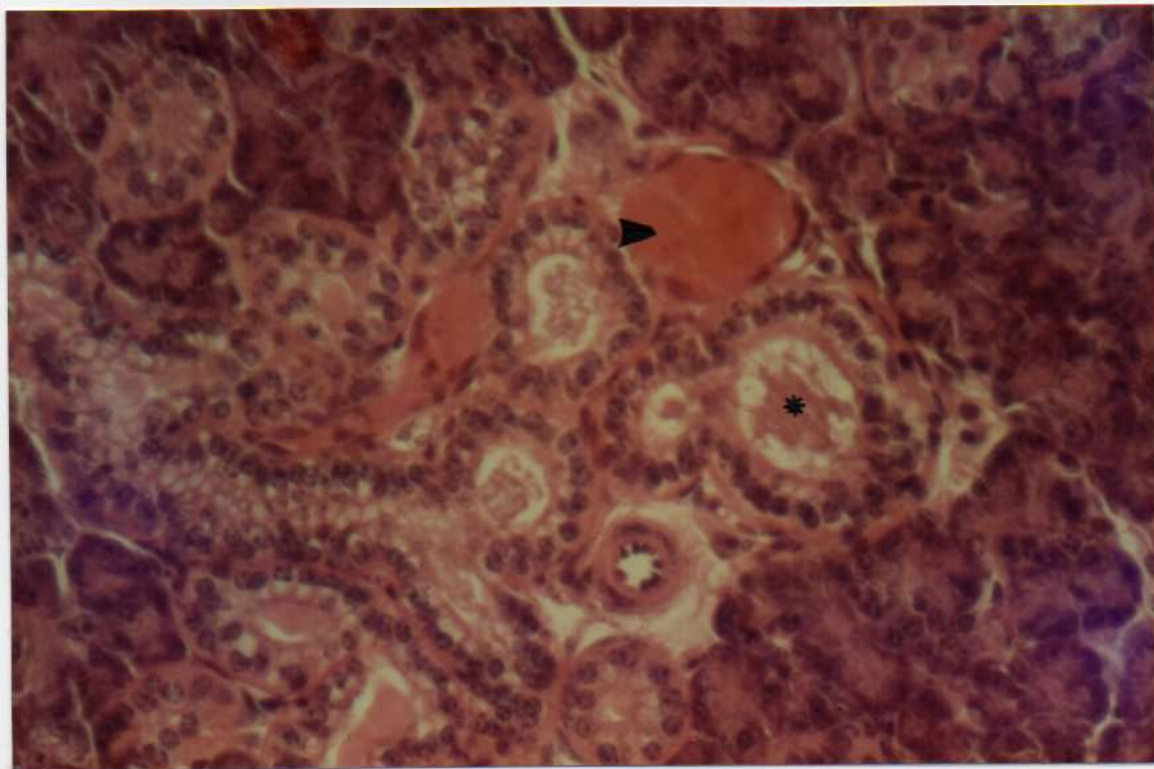


**FOTO 12- Microfotografía problema 2 horas, en la cual visualizamos intensa vasodilatación (★ ), ligero infiltrado perivascular y periductal (✱ ) y escasa secreción granular en algunos conductos (▲). Hematoxilina-Eosina. X 200**



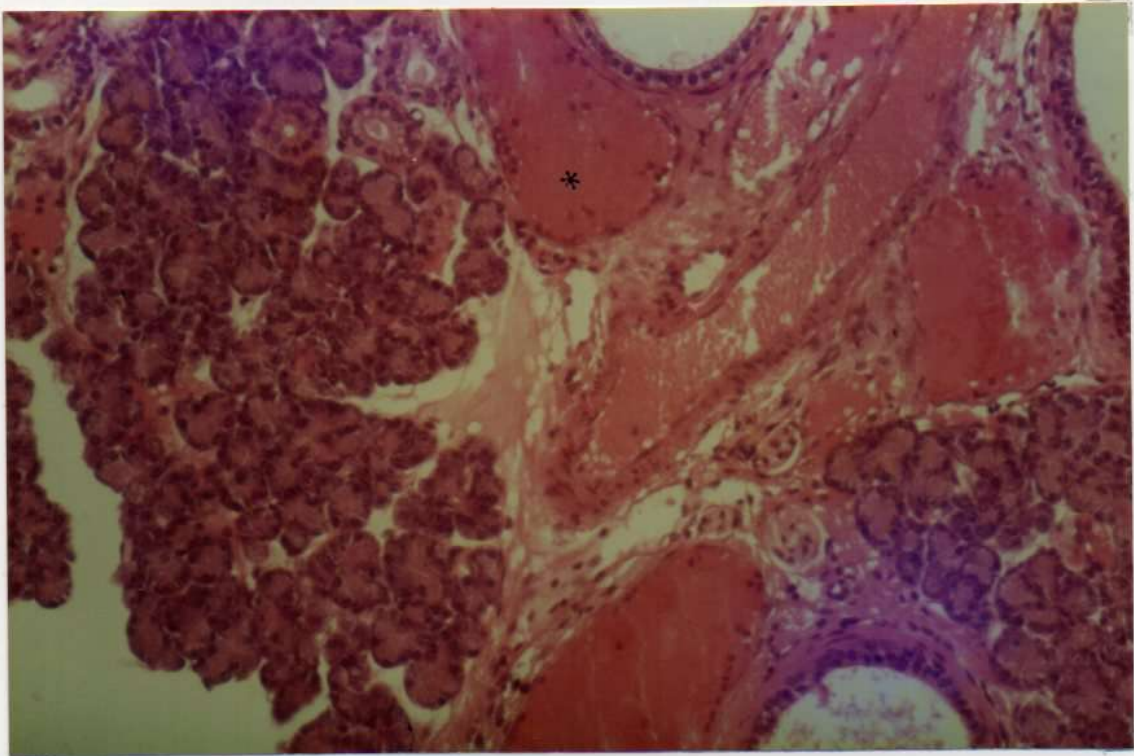


**FOTO 13- Microfotografía problema 2 horas, donde observamos vasodilatación linfática. Hematoxilina-Eosina. X 400**

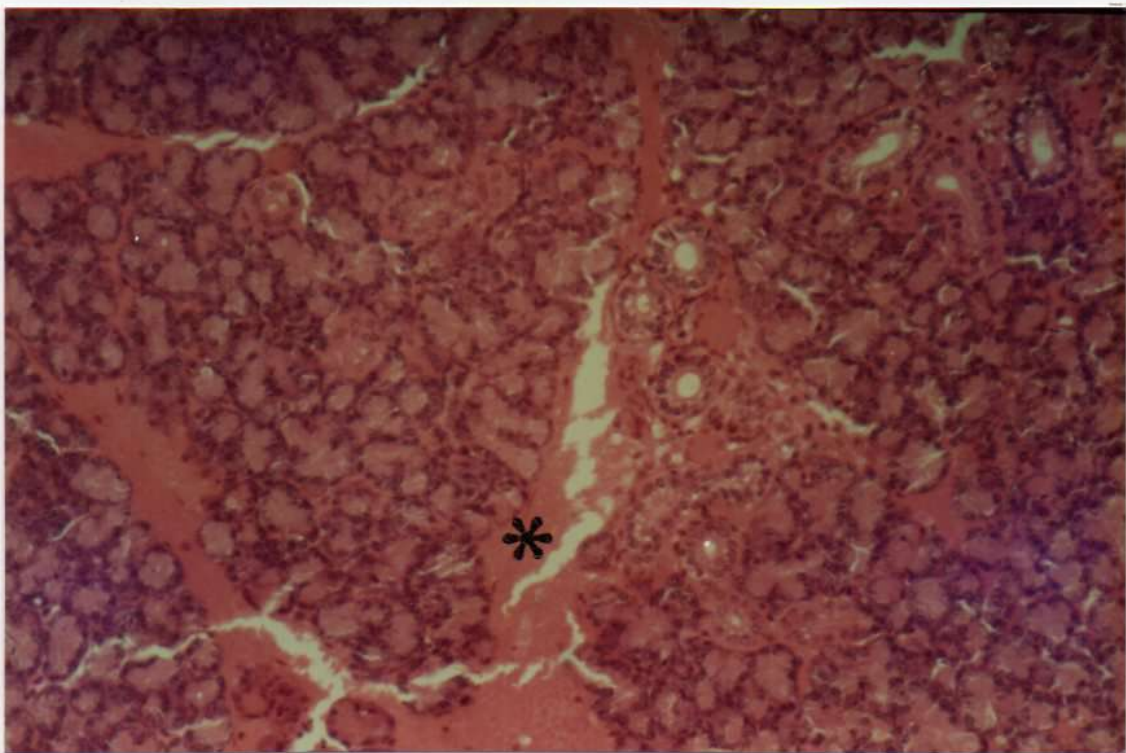


**FOTO 14- Microfotografía problema 4 horas, se observa, material secretorio basófilo en la luz de los conductos ( \* ) y congestión vascular ( ▲ ) . Hematoxilina-Eosina. X 100**





**FOTO 15- Microfotografía problema 8 horas, en la cual se observa mayor congestión vascular ( \* ) y secreción en los conductos de tipo filamentosa. Hematoxilina-Eosina. X 100**



**FOTO 16- Microfotografía problema 10 horas, en la que visualizamos extravasación sanguínea al espacio interlobulillar (\*). Hematoxilina-Eosina. X 100**



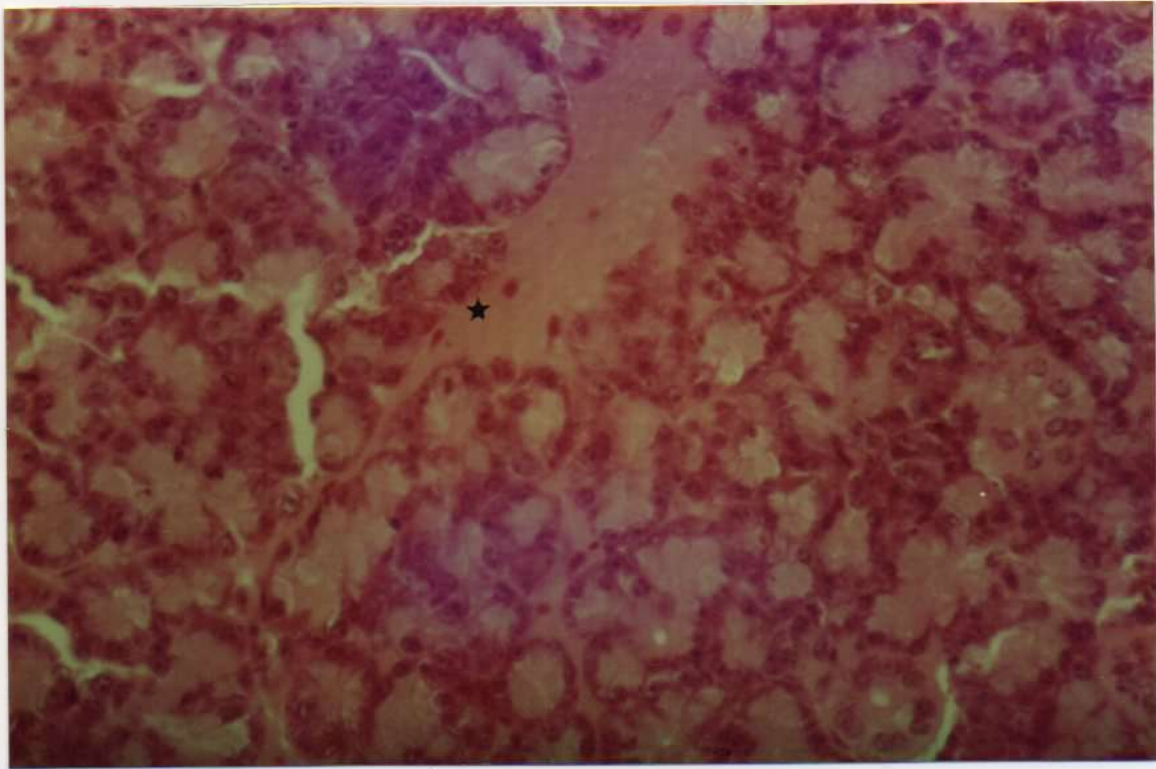


FOTO 17- Microfotografía problema 10 horas, en la que observamos hemorragia intersticial (★). Hematoxilina-Eosina. X 200

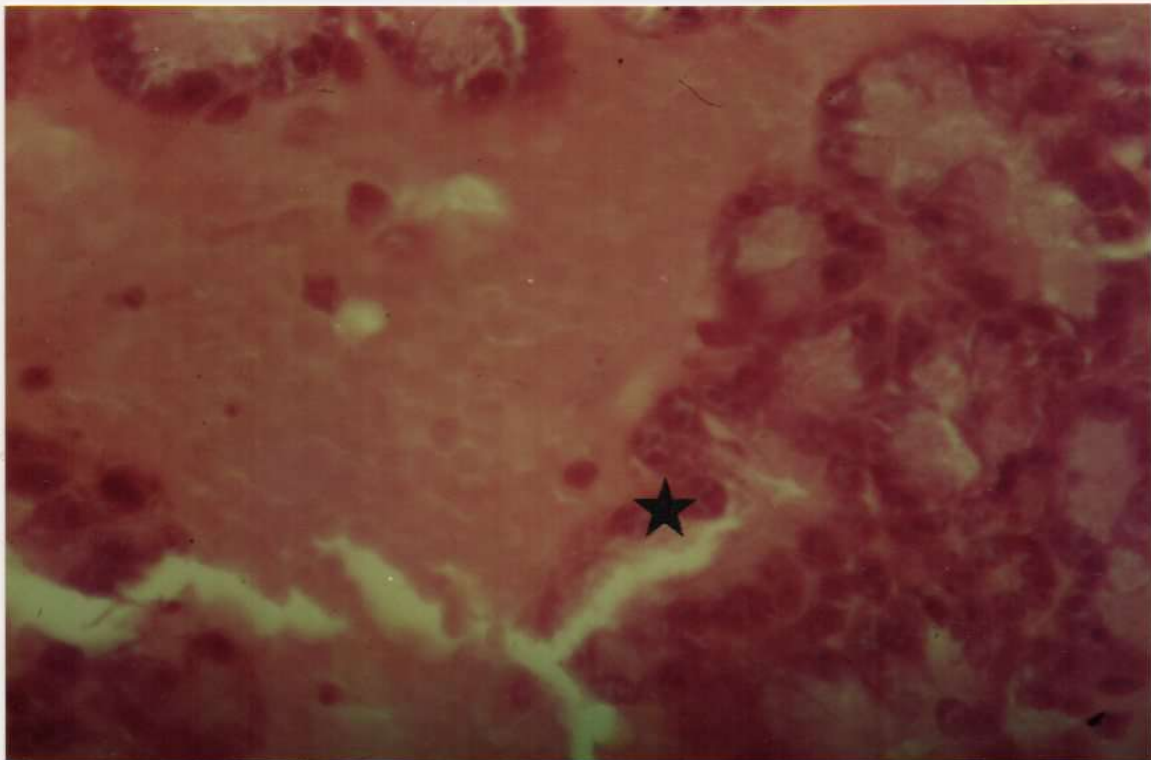
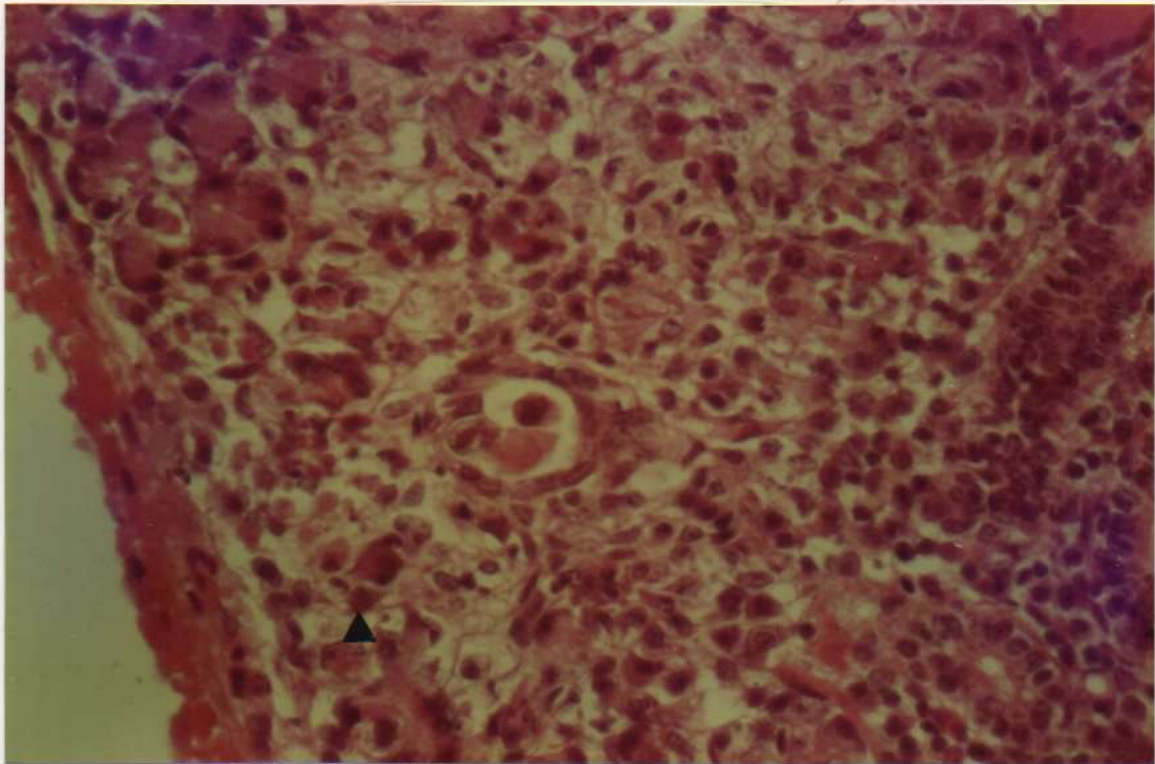
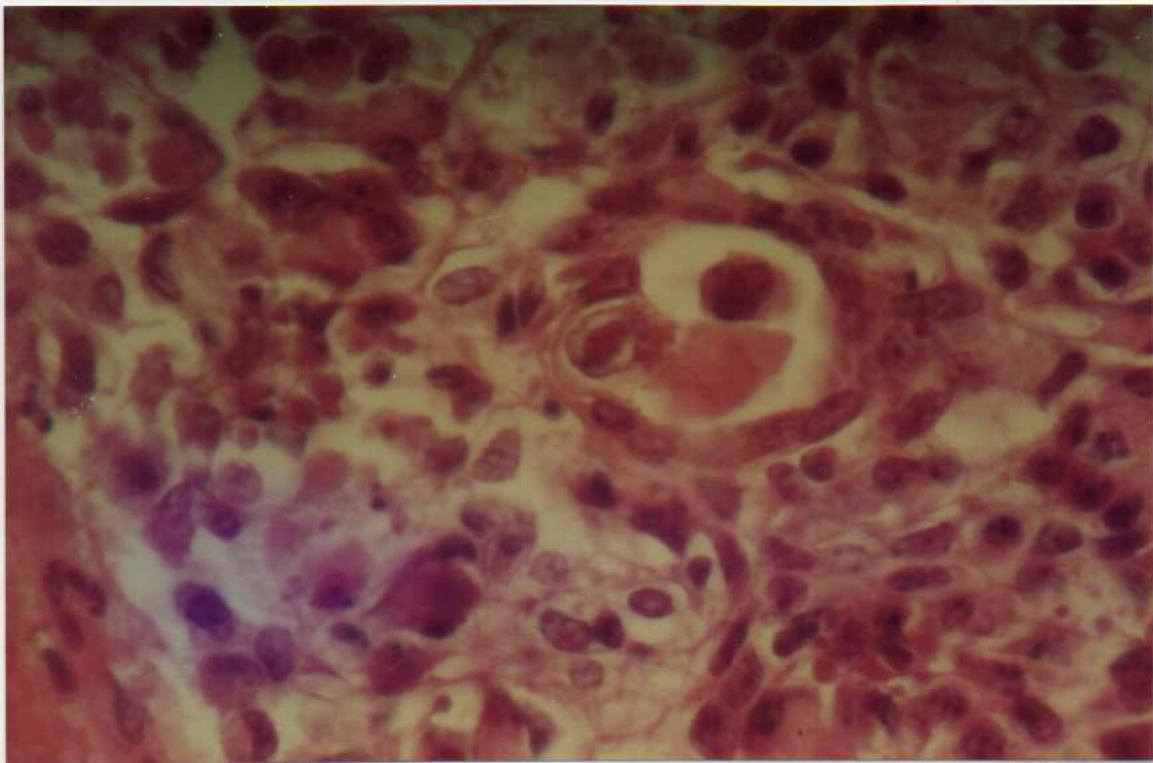


FOTO 18- Microfotografía problema 10 horas, en la que visualizamos necrosis acinar por hemorragia intersticial (★). Hematoxilina-Eosina. X 400.



**FOTO 19- Microfotografía problema 10 horas, en la que observamos en la zona irradiada "necrosis en migaja" ( ▲ ). Hematoxilina-Eosina. X 100**



**FOTO 20- Microfotografía problema 10 horas, que es una imagen a mayor aumento del campo anterior. Hematoxilina-Eosina. X 400**



## 12 horas

En la zona irradiada se observaron importantes modificaciones del estroma, con abundante plasma y elementos formes de la sangre extravasados. (fotos 21 y 22)

Algunos acinos cercanos a la zona irradiada estaban vacuolizados y otros necrosados, no así los alejados a la zona de incidencia de la radiación. (fotos 23)

Se encontró vacuolización del citoplasma de las células ductales y ausencia de secreción en la luz.

## **ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES**

Como los resultados estructurales y bioquímicos fueron consistentes solo se procesaron material para microscopía electrónica de transmisión de los tiempos con cambios más notorios.

### Controles 4 horas:

Las células acinares presentaron gran desarrollo de cisternas del retículo endoplásmico rugoso.

Existió abundante acumulación intracitoplasmática de gránulos de secreción de distinta electrodensidad y tamaño (foto 24).

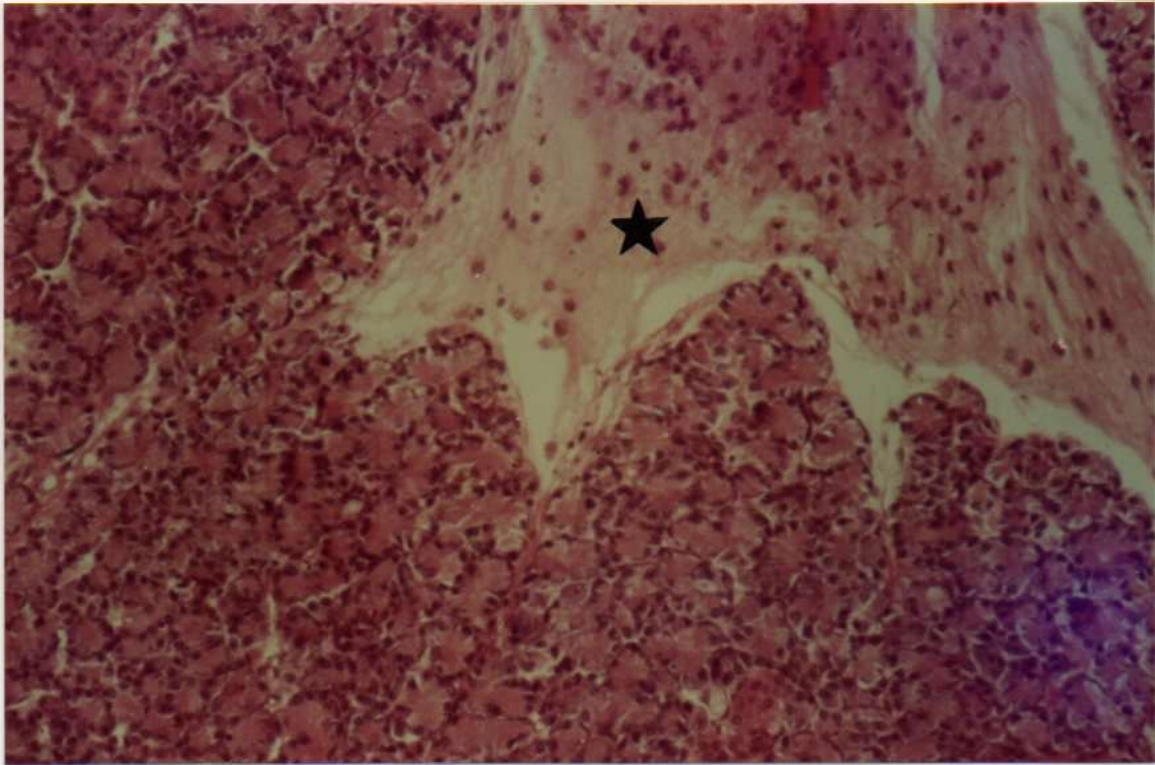
Las microvellosidades de la luz acinar estaban conservadas indicando un proceso secretorio activo. Las células de los conductos intercalares presentaban aspecto normal. (foto 25)

### Experimentales 2 horas:

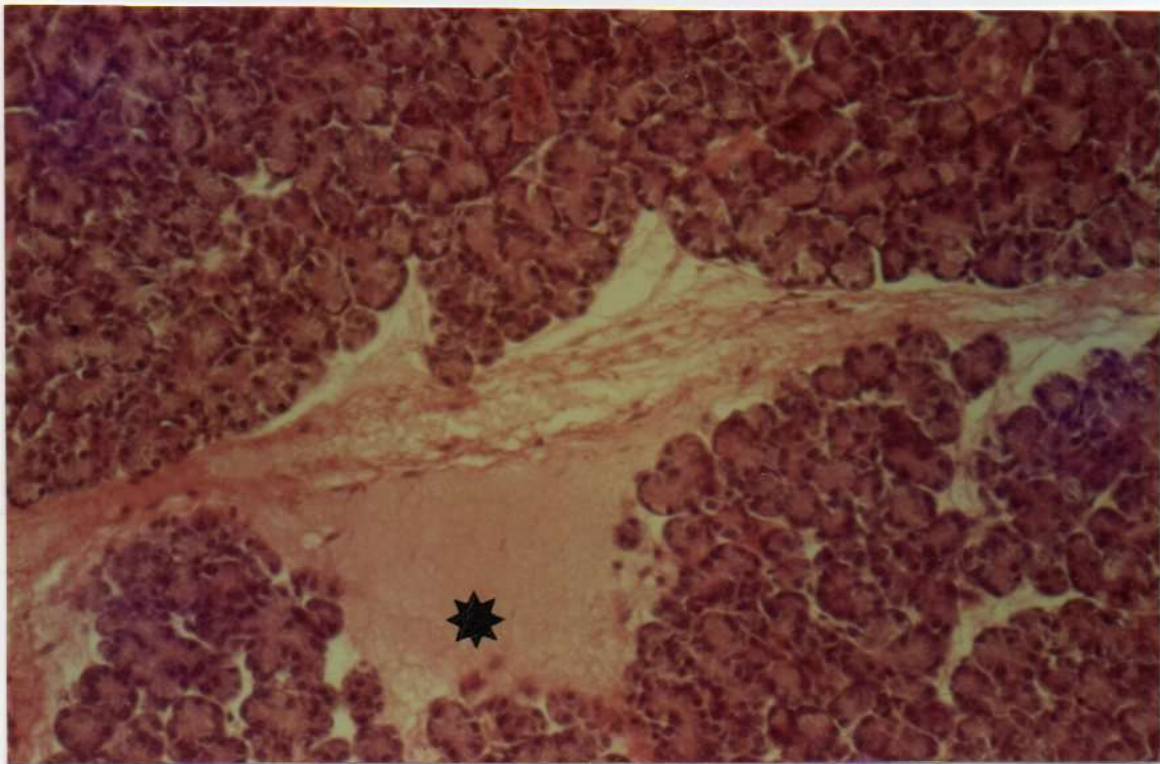
Se observaron células acinares con un núcleo prominente, nucléolos bien manifiestos y cromatina dispersa y de baja densidad electrónica (foto 26). El citoplasma presenta gran cantidad y heterogeneidad del contenido gránular: algunos gránulos son electrodensos con material amorfo homogéneo y una o varias partículas electrodensas en su interior, otros poseían el mismo material que los anteriores pero sin partículas internas y otros eran electrolúcidos con un material filamentoso. Aparecían imágenes de fusión de gránulos (foto 27).

En general los gránulos electrolúcidos con o sin partículas electrodensas ocupaban el polo apical de las células asociados a un complejo de Golgi muy activo y cercanos a la luz con gran desarrollo de microvellosidades (fotos 27 y 28). Llamó la atención la presencia de espacios intercelulares amplios con abundante microvellosidad. (fotos 29 y 30)



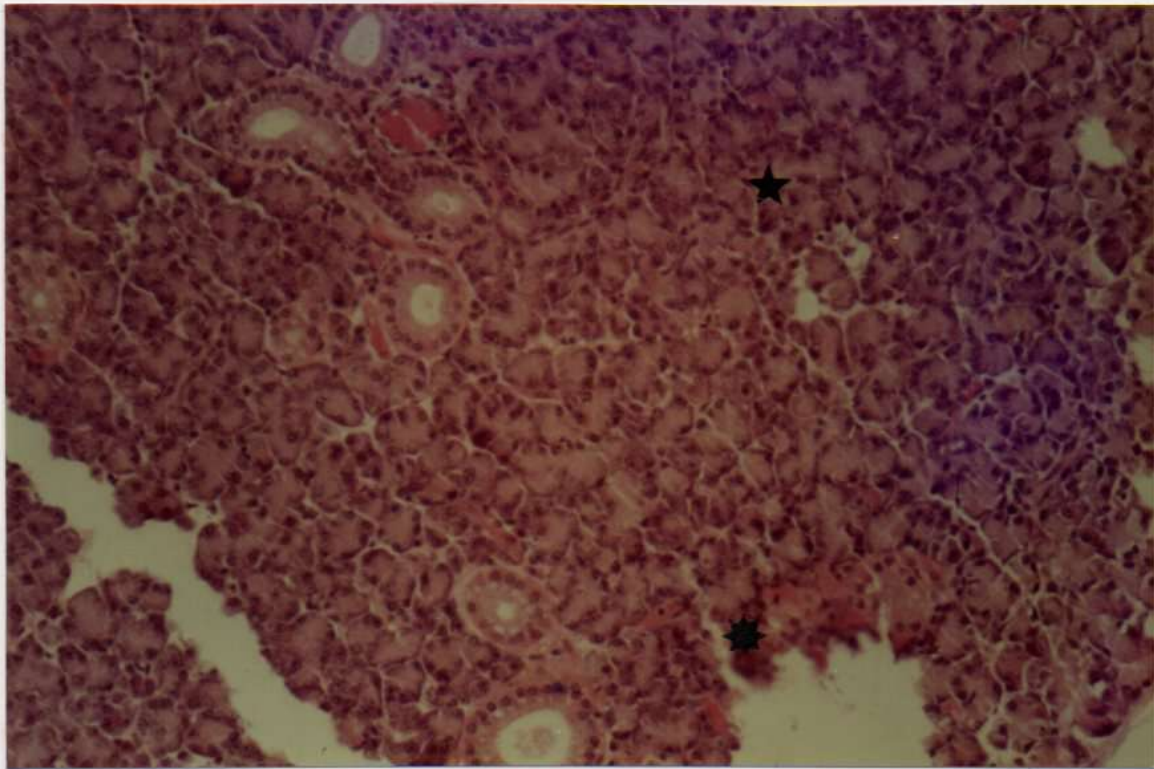


**FOTO 21- Microfotografía problema 12 horas, en la que observamos modificaciones estroma por extravasación sanguínea ( ★ ). Hematoxilina-Eosina. X 100**

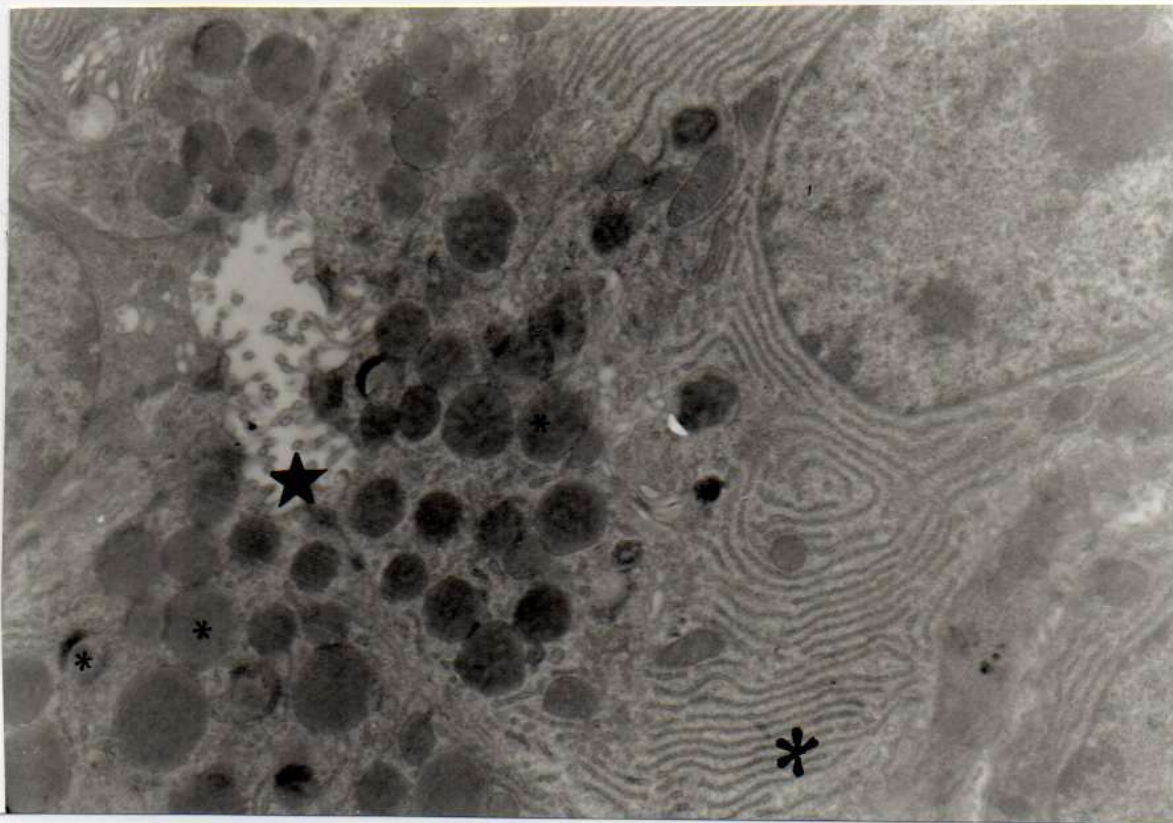


**FOTO 22- Microfotografía problema 12 horas, en la que visualizamos modificaciones estroma por extravasación sanguínea, ( ★ ). Hematoxilina-Eosina. X 100**

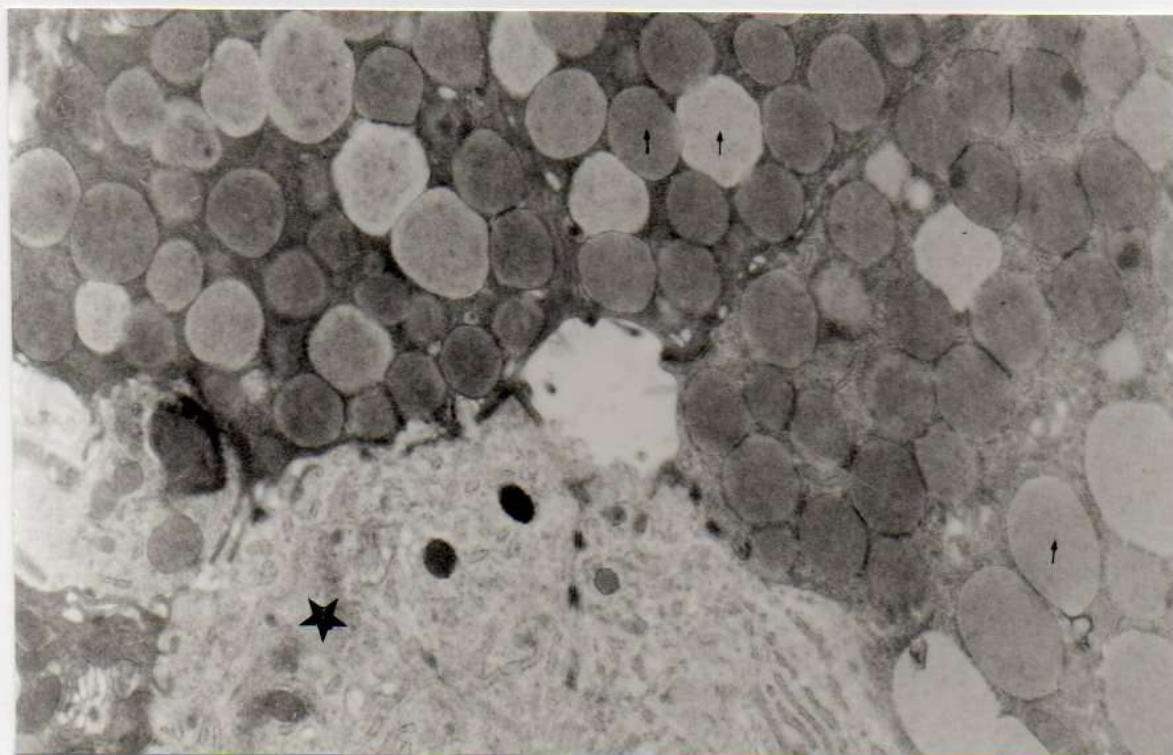




**FOTO 23- Microfotografía problema 12 horas, donde observamos en la zona irradiada necrosis acinar (★), mientras que los más alejados están normales (★). Hematoxilina-Eosina. X 100**

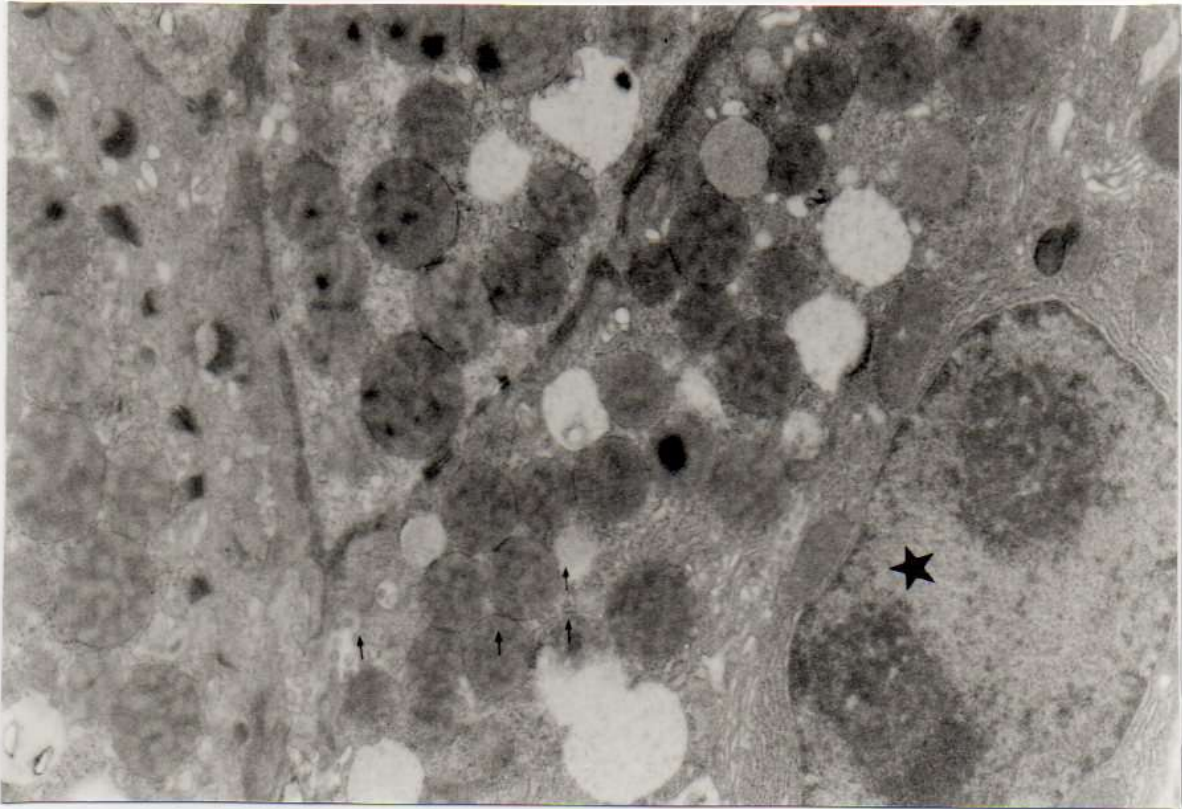


**FOTO 24- Microfotografía electrónica control 4 horas, donde visualizamos gran desarrollo del Rer (\*), gránulos intracitoplasmáticos de gran heterogeneidad (\* ) y gran desarrollo de microvellosidades apicales. (★)7500 x.**

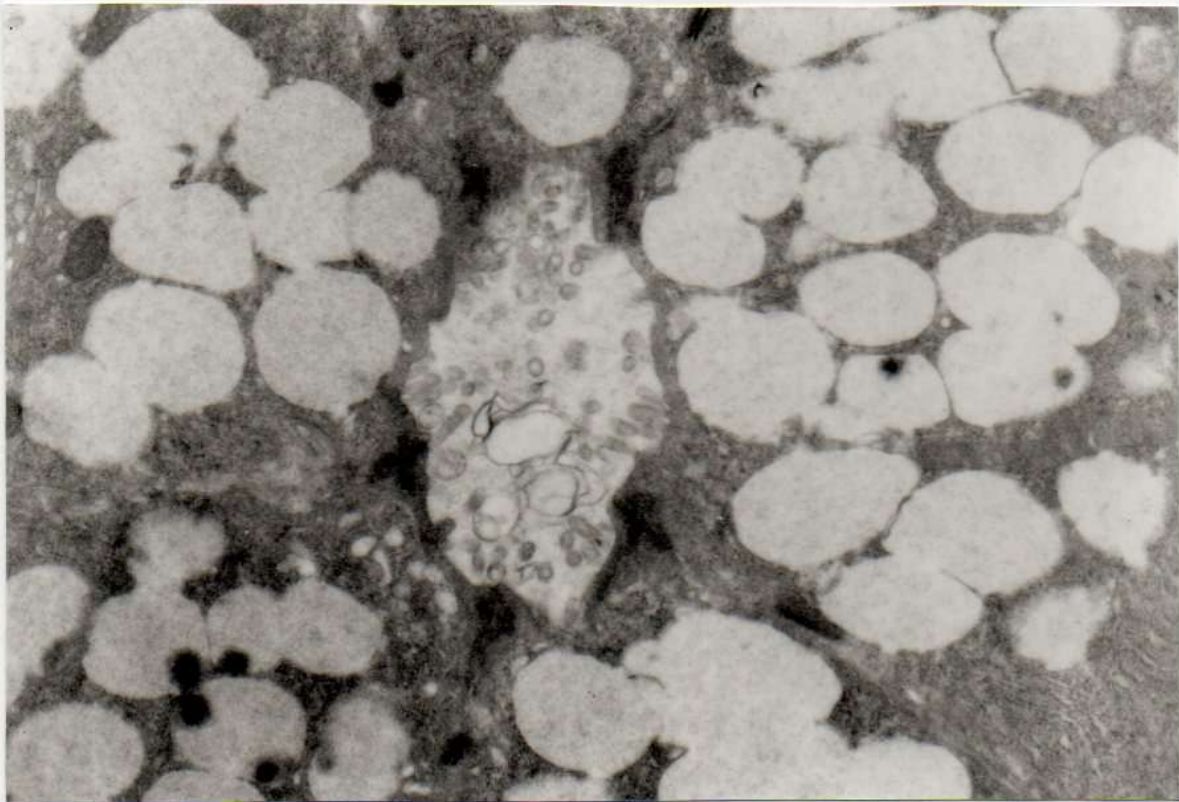


**FOTO 25- Microfotografía electrónica control 4 horas, en la que observamos gran variedad de gránulos secretorios (↑), y células ductales de aspecto normales (★). 8000 x.**



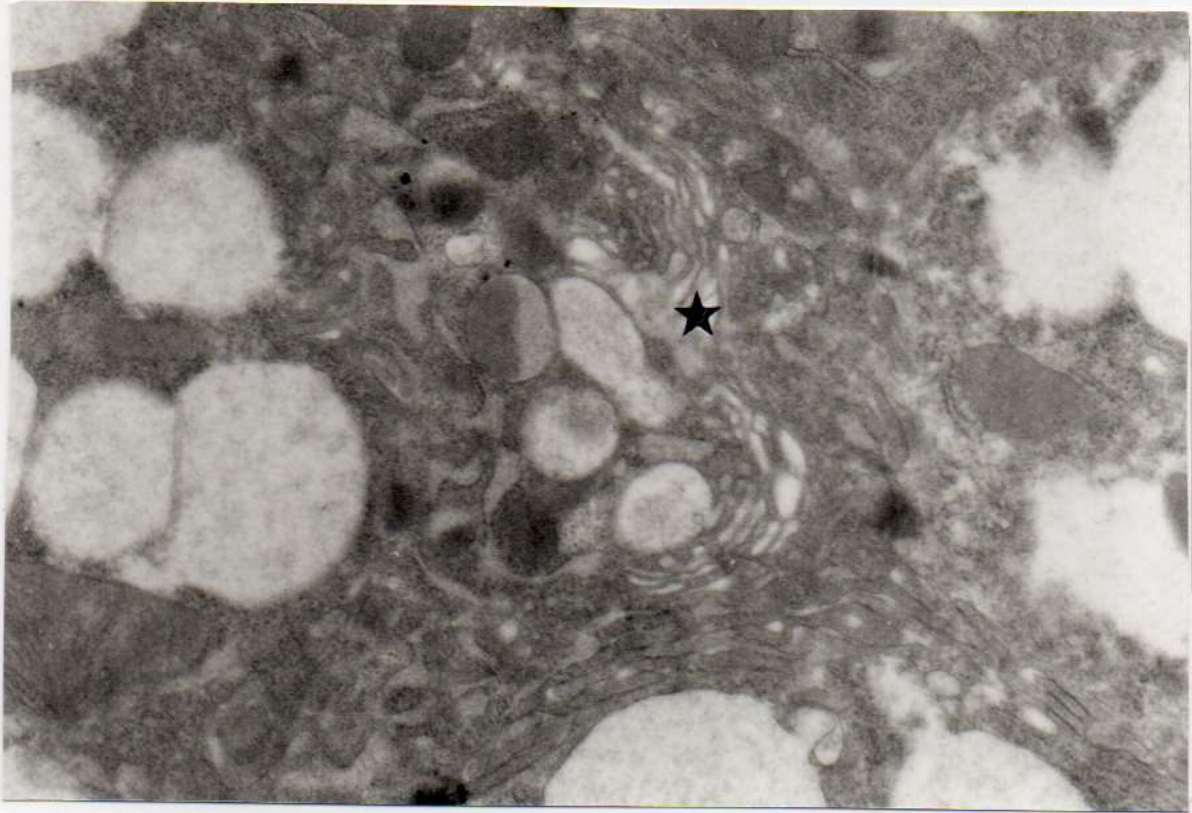


**FOTO 26- Microfotografía electrónica problema 2 horas, en la que observamos núcleos con nucleolos evidentes y cromatina de aspecto laxa ( ★ ) y gran heterogeneidad de gránulos secretorios ( † ).10000 x**

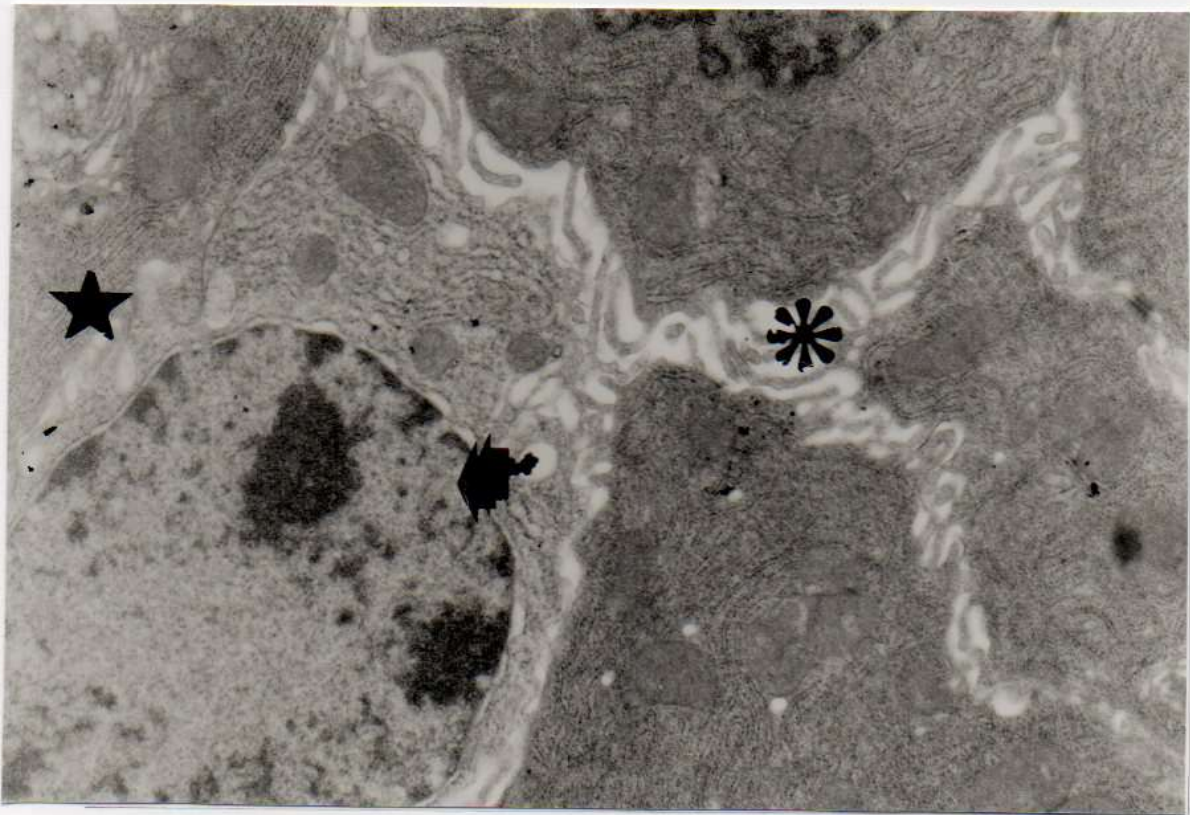


**FOTO 27- Microfotografía electrónica problema 2 horas, en la cual visualizamos gránulos electrolúcidos apicales,cercanos a la luz que presenta microvellosidades desarrolladas. 1200 x**



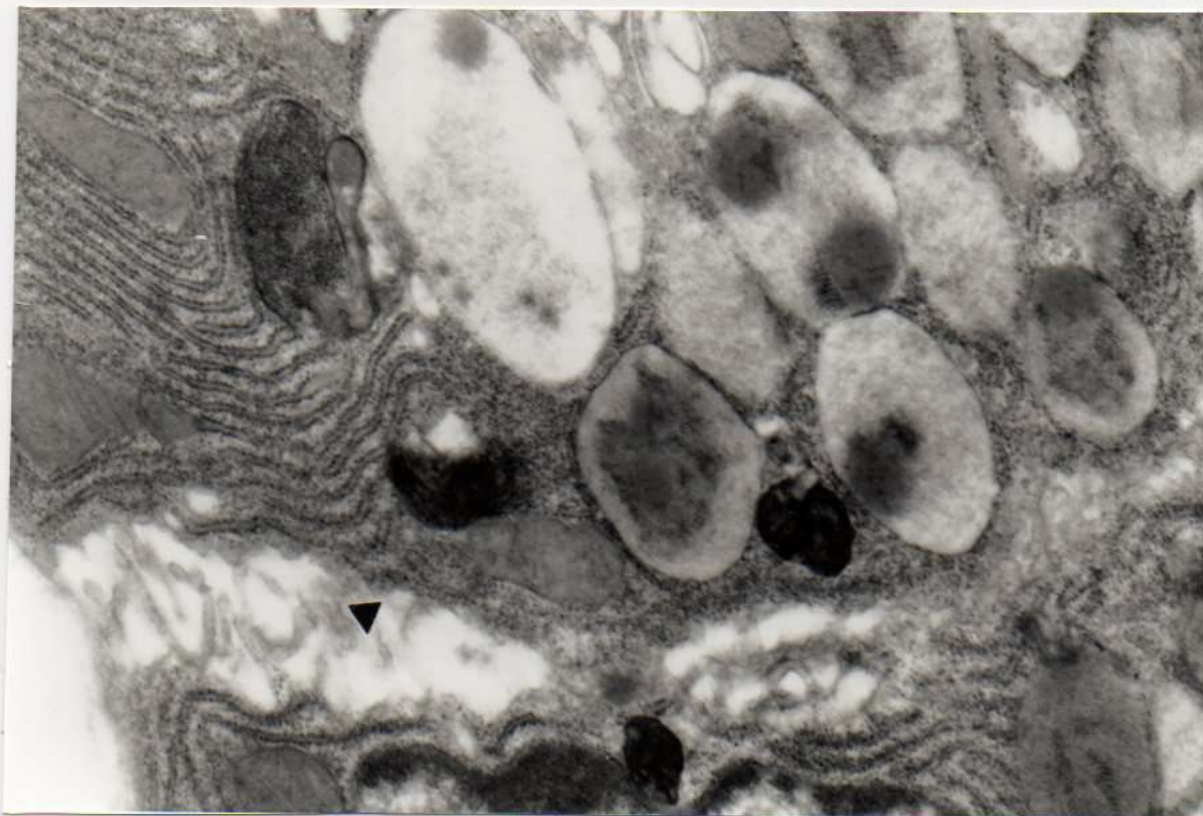


**FOTO 28- Microfotografía electrónica problema 2 horas , en el que observamos gran desarrollo del complejo de Golgi ( ★ ) 17000 x.**

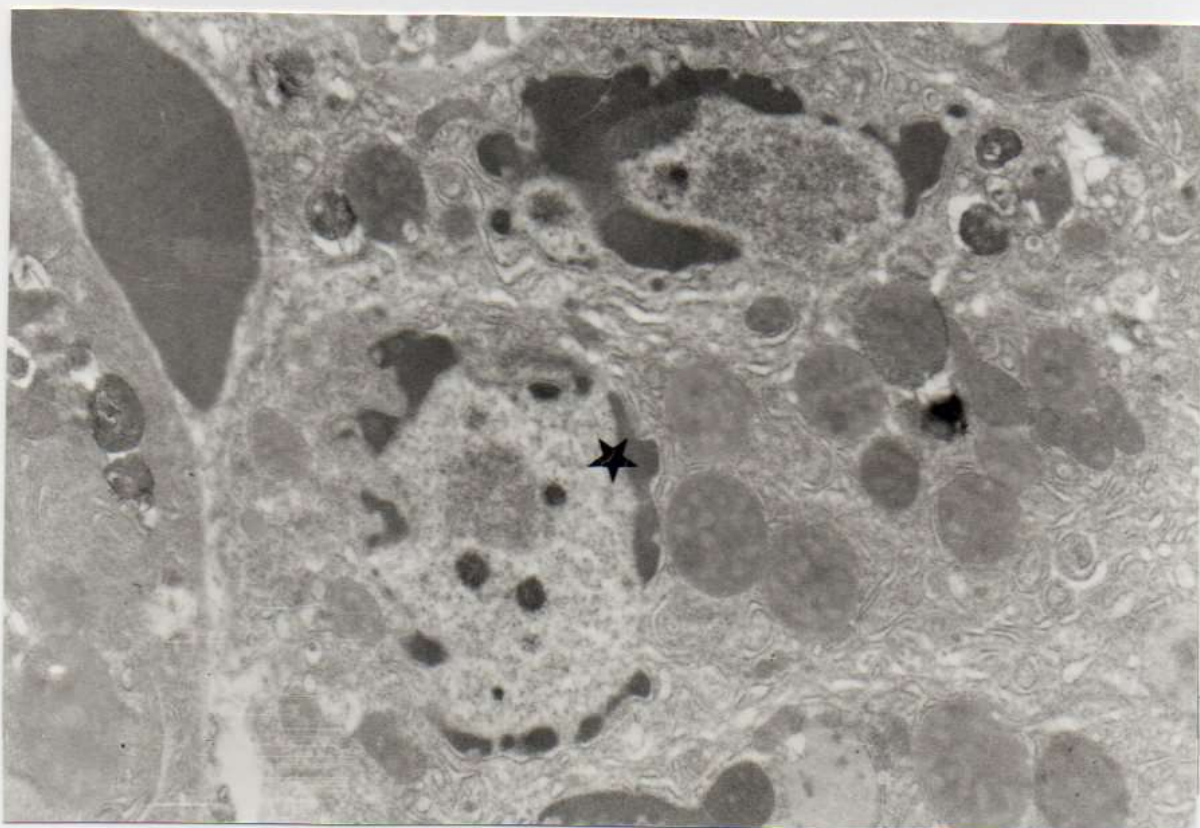


**FOTO 29- Microfotografía electrónica problema 2 hs. Núcleos con su doble envoltura normal ( ◆ ) desarrollo del Rer ( ★ ) y espacios intercelulares dilatados y con microvellosidades ( \* ) 12000 x.**





**FOTO 30- Microfotografía electrónica problema 2 horas. Visualizamos a un mayor aumento los espacios intercelulares dilatados (▼) 18500 x.**



**FOTO 31- Microfotografía electrónica problema 10 horas donde observamos núcleos apoptóticos con cromatina condensada y fragmentada (★). 18500 x**



### Experimentales 10 horas:

El hallazgo más sobresaliente fue la presencia de núcleos apoptóticos en diversos estadios: cromatina condensada en anillo y, cromatina condensada y fragmentada. (fotos 31,32 y 33)

El retículo endoplásmico rugoso presentó manifiesta dilatación y pérdida de sus ribosomas. (fotos 34 y 35)

En otras zonas era claramente visible la extravasación de elementos formes de la sangre y plasma, que en su avance compresivo destruían primero las membranas basales y luego la integridad de las células acinares. (fotos 36,37,y 38)

## **ESTUDIOS BIOQUÍMICOS**

### CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES (Figura 1)

A pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas, cuando se compararon los grupos controles entre sí, se observó que la máxima acumulación de proteínas solubles se produjo a las 4 h. de ayuno. La curva de proteínas disminuyó luego en forma abrupta y a las 12 h. de ayuno, se observó una recuperación por encima de los valores observados al iniciar el ayuno, no siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre estos dos últimos valores.

La comparación de los valores de los grupos problemas entre sí nos permitió establecer que a las 2 h. de ayuno se produjo la máxima acumulación de proteínas soluble en glándula, siendo a este tiempo las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con relación a los otros tiempos estudiados. La curva decayó a las 4h. y se mantuvo en esa situación hasta las 10 h. Hacia las 12 h. se observa un descenso aún más marcado.

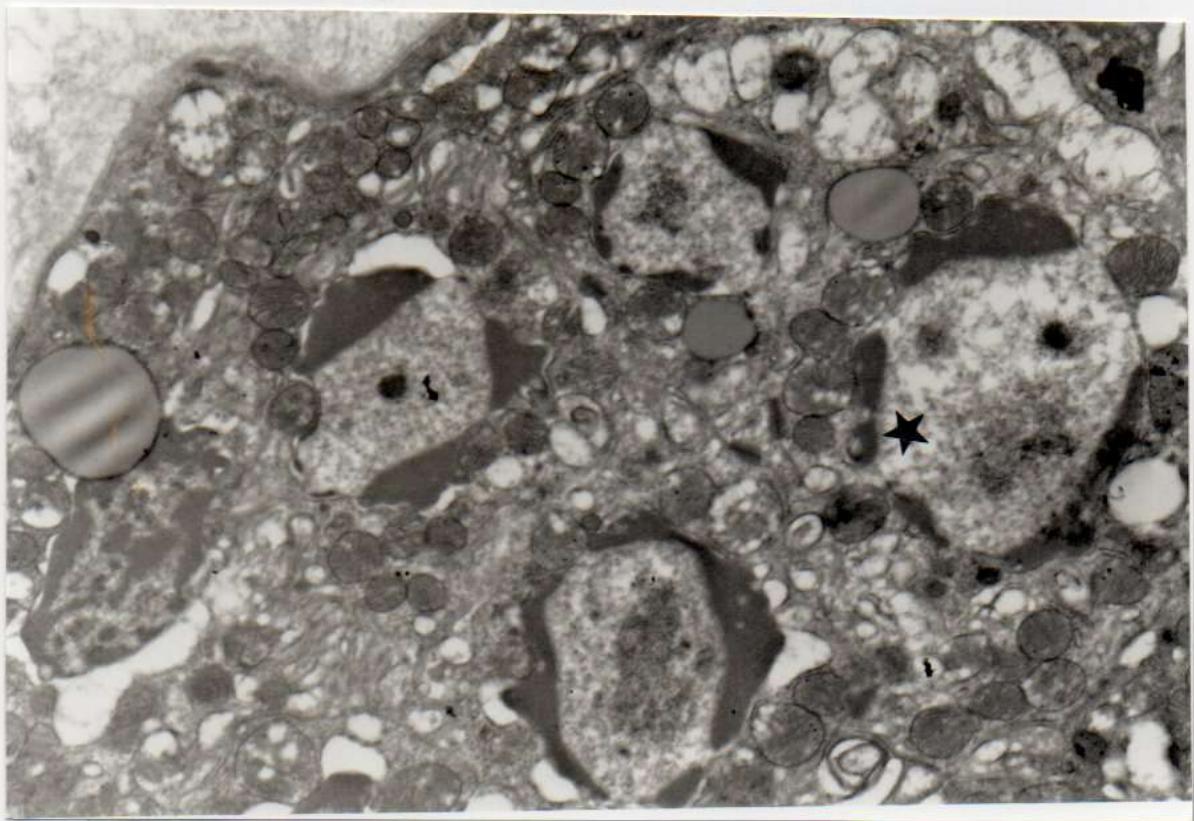
Cuando se compararon los grupos problemas con sus respectivos controles sólo se encontraron diferencias significativas a la 2 h. ( $p < 0.05$ ).





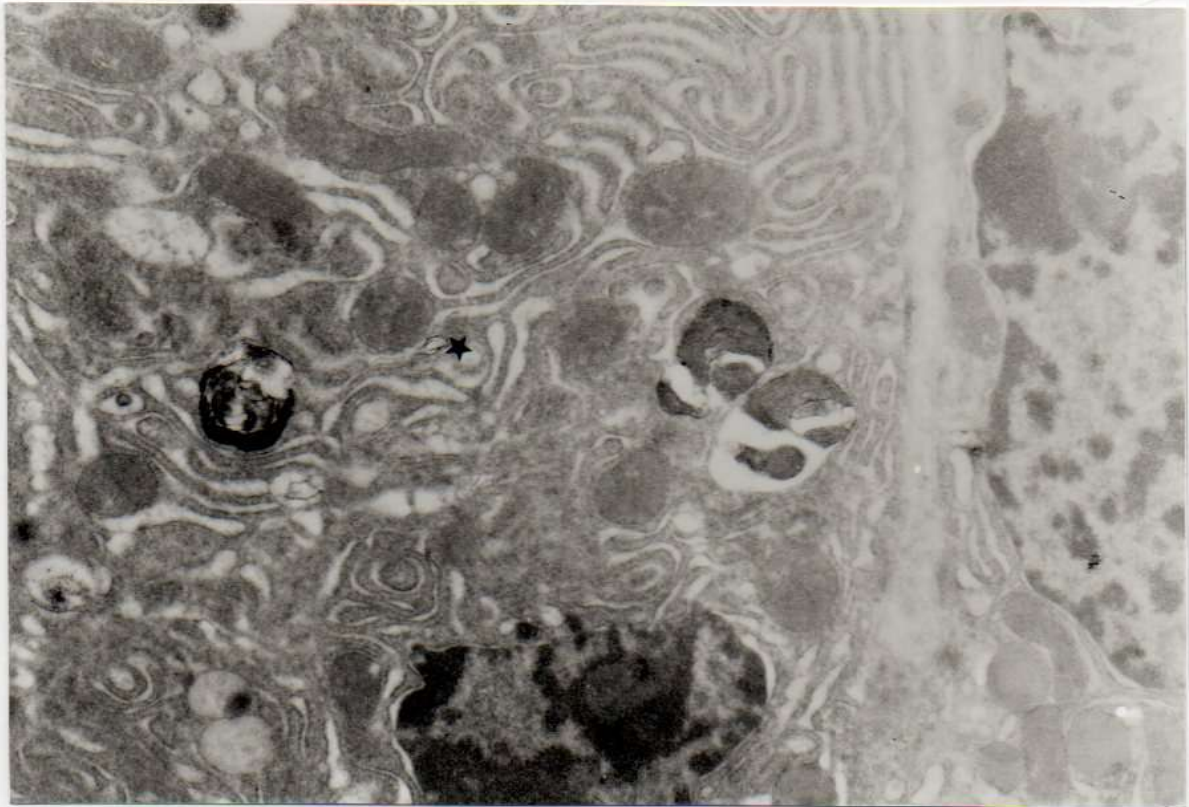


**FOTO 32- Microfotografía electrónica problema 10 horas, se observan núcleos apoptóticos con cromatina condensada y fragmentada ( ★ ). X16000**

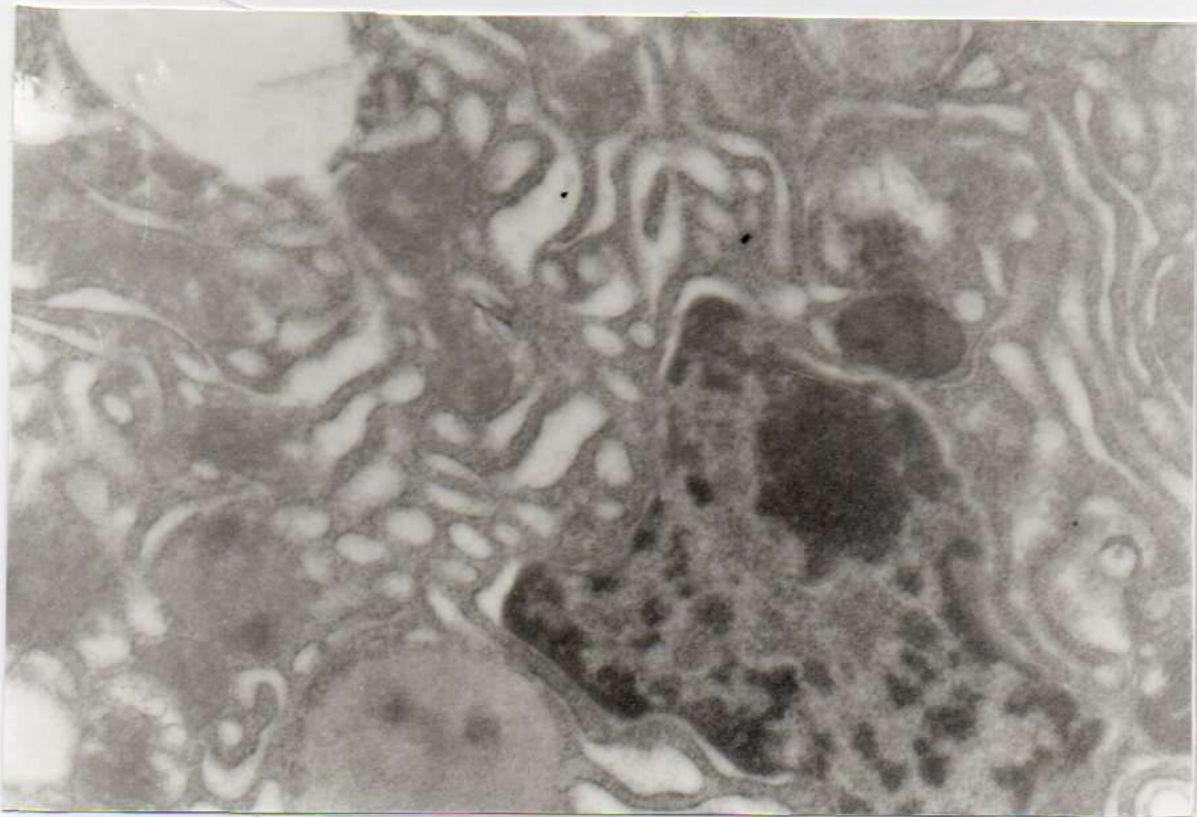


**FOTO 33- Microfotografía electrónica problema 10 horas donde observamos núcleos picnóticos con cromatina en anillo ( ★ ). X 8000.**



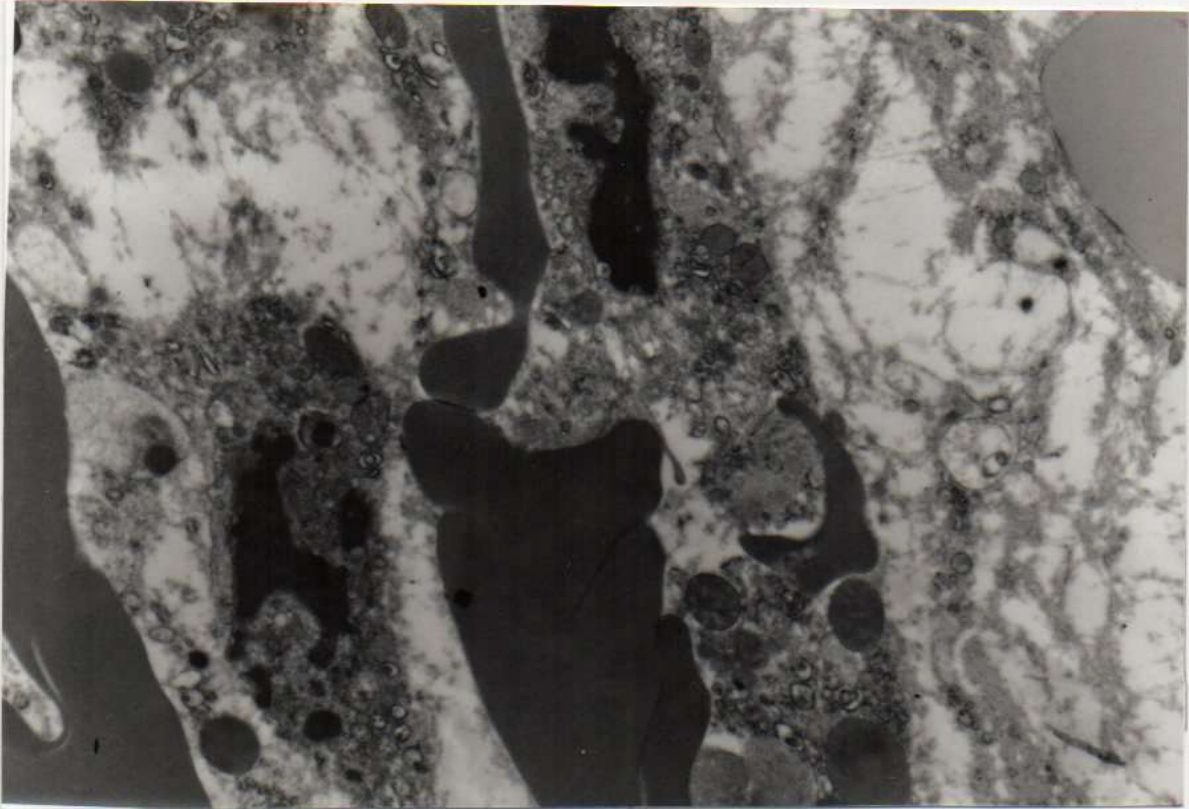


**FOTO 34- Microfotografía electrónica problema 10 horas, observamos dilataciones del Retículo Endoplásmico Rugoso y con pérdida de sus ribosomas ( ✱ ). x 8000 .**

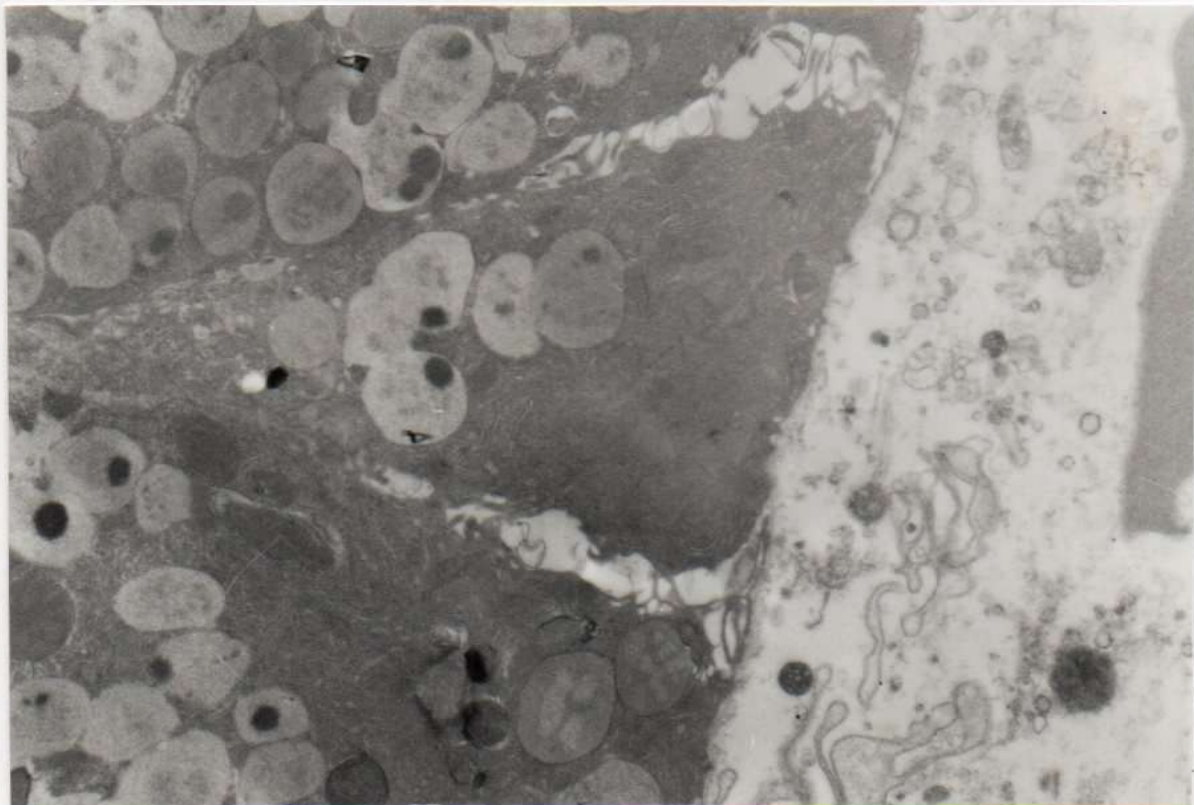


**FOTO 35- Microfotografía electrónica problema 10 horas. Imagen similar a la anterior a mayor aumento. x 12000.**

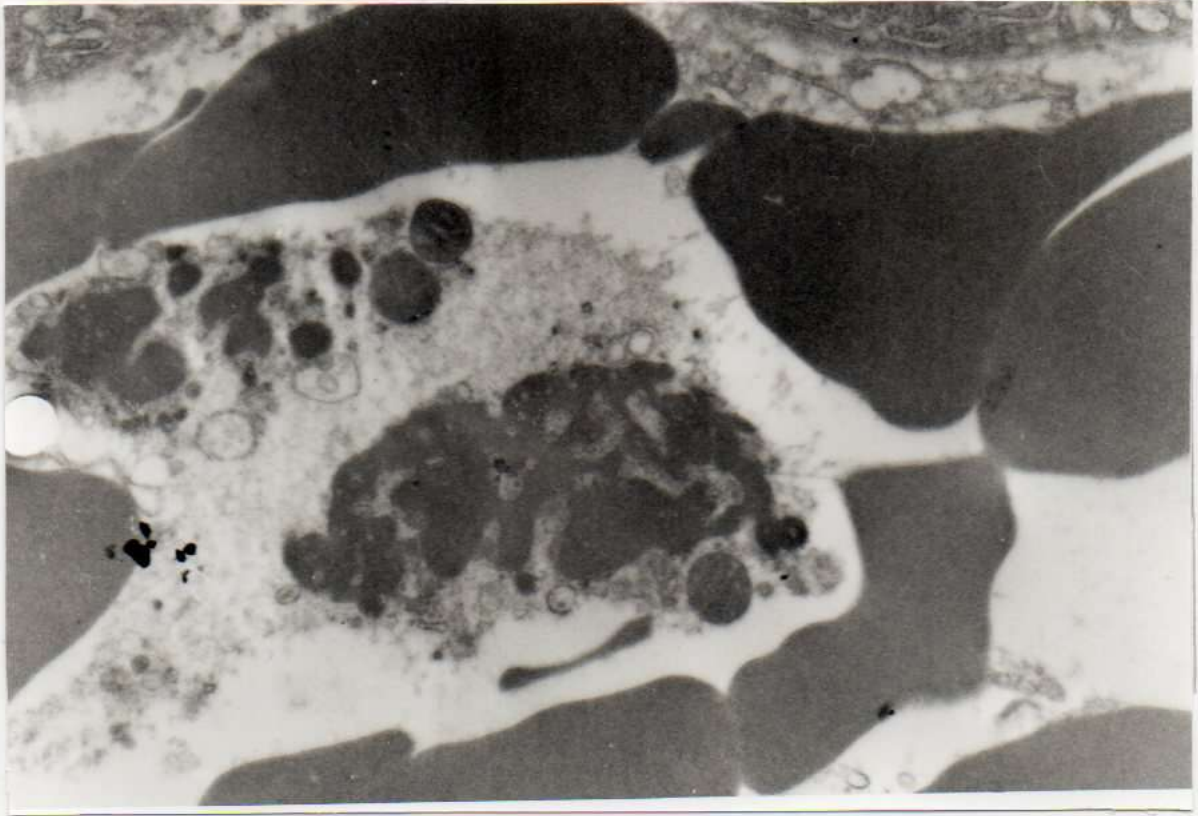




**FOTO 36- Microfotografía electrónica problema 10 horas, donde visualizamos elementos formes de la sangre que invaden el campo de las células acinares. x 11000.**



**FOTO 37- Microfotografía electrónica problema 10 horas, observamos destrucción de membranas basales por avance de elementos formes de la sangre. x 11000 .**



**FOTO 38- Microfotografía electrónica problema 10 horas, en la que observamos necrosis de células acinares por avance de elementos formes de la sangre extravasados. x 10000 .**



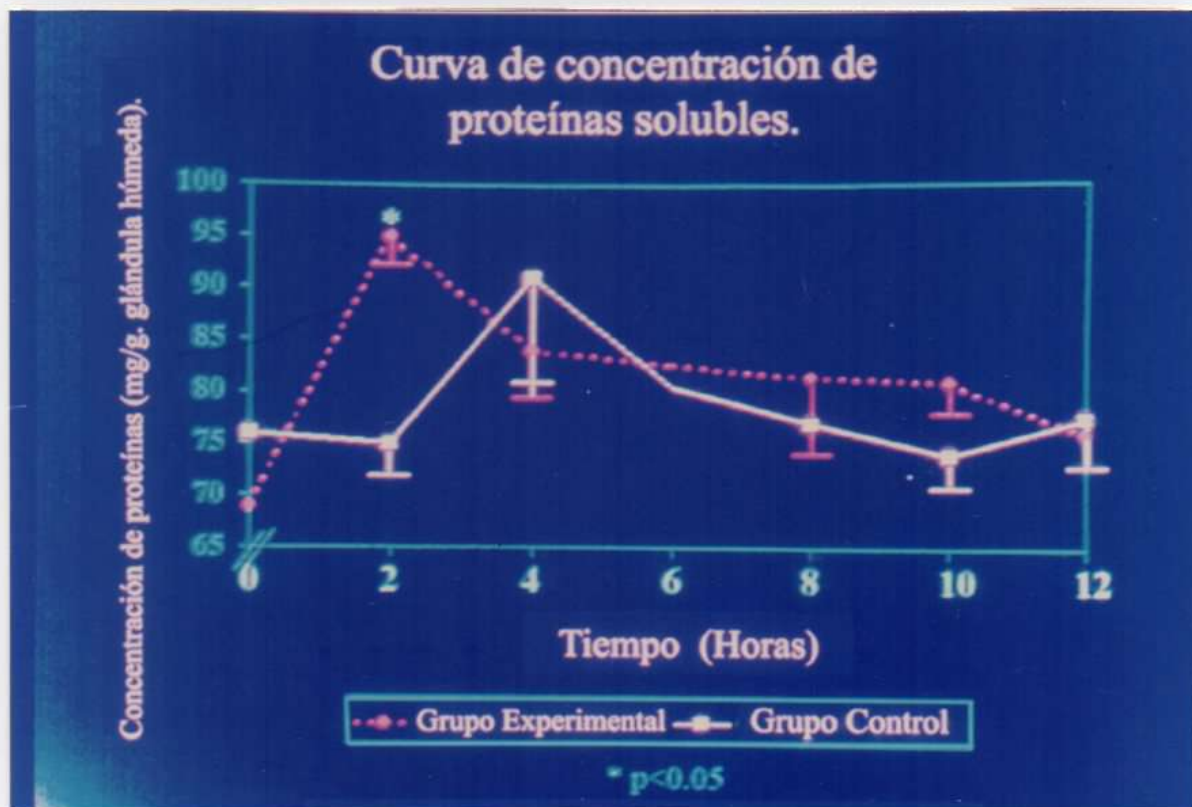


FIGURA 1-

## **ESTUDIO DE CORRIDAS ELECTROFORÉTICAS** (Figuras 2 y 3)

Los estudios de las densidades ópticas por área y de los pesos moleculares de las bandas observadas tanto en los controles como en los problemas mostraron los siguientes resultados:

### **Controles 0 h:** (Figura 4)

Los porcentajes de densidad óptica fueron: 13.81% (63.14 kDa), 18.09% (52.96 kDa), 11.76% (47.49 kDa), 12.29% (43.68 kDa), 10.21% (37.06 kDa), 13.87% (35.43 kDa), 9.40% (18.59 kDa), 8.19% (16.47 kDa), 5.66% (13.81 kDa). Por otra parte se analizan bandas adicionales con los siguientes pesos moleculares: 33.78, 26.61, y 20.49 kDa.

### **Experimentales 0 h.** (Figura 4)

Cuando se determinan los porcentajes de densidades ópticas con relación al área sólo pudimos analizar cuatro bandas: 30.96% (64.06 kDa), 30.35% (53.64 kDa), 22.70% (43.91 kDa), y 16.27% (13.47 kDa). Se observaron además bandas correspondiente a los siguientes pesos moleculares: 48.05 kDa; 29.10 kDa; y 20.63 kDa.

### **Controles 2 h.:** (Figura 5)

Las bandas encontradas tenían los siguientes porcentajes de densidad óptica: 12.83%, 16.97%, 11.05%, 12.42%, 10.38%, 10.05%, 9.81%, 7.54%, y 8.76% que se correspondían con los siguientes pesos moleculares: 63.14 kDa , 52.96 kDa, 47.22 kDa, 43.91 kDa, 35.27 kDa, 33.50 kDa, 18.39 kDa; 13.14 kDa; y 16.54 kDa. Además se encontró otra banda con el siguiente peso molecular: 28.99 kd

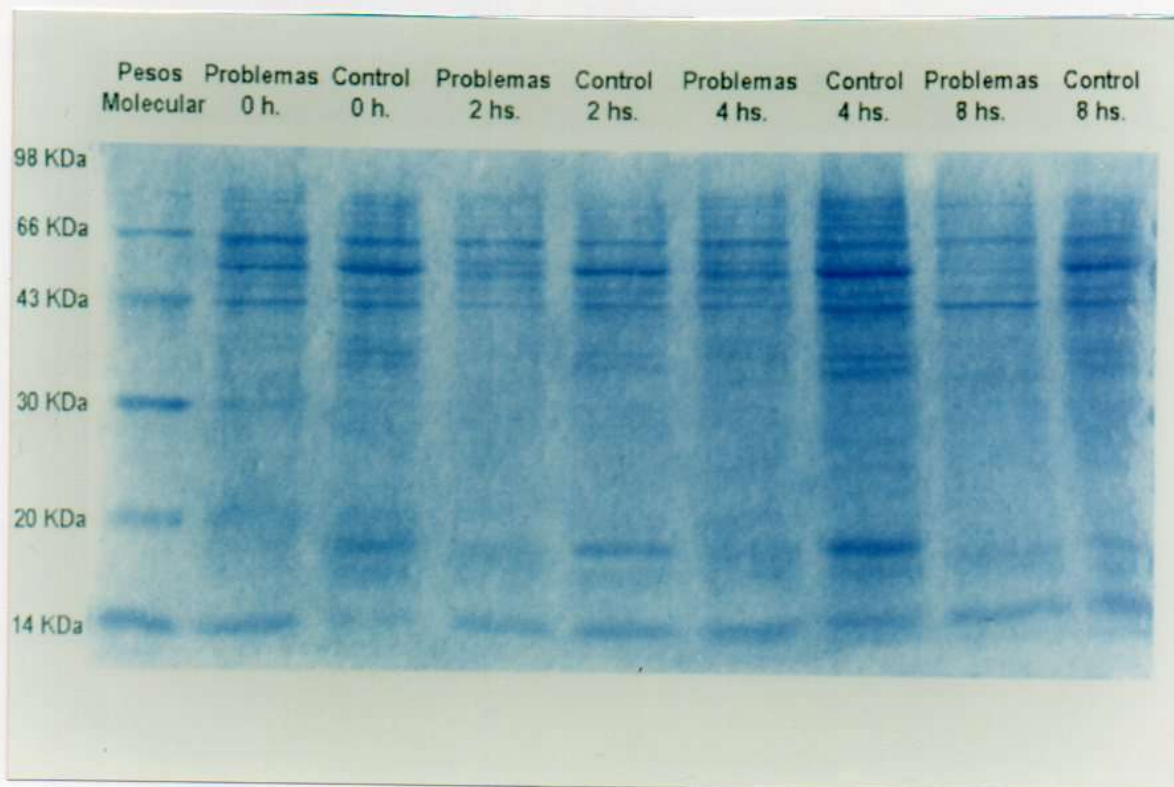
### **Experimentales 2 h.** (Figura 5)

A este tiempo se analizaron los siguientes porcentajes de densidades ópticas por área: 16.13% (63.14; kDa); 17.11% (55.77 kDa); 18.17% (51.97 kDa); 13.77% (47.77 kDa); 13.16% (44.15 kDa) 10.93% (18.11 kDa); y 10.65% (13.54 kDa). Por otra parte se analiza una banda adicional de un peso molecular de 35.43 kDa.

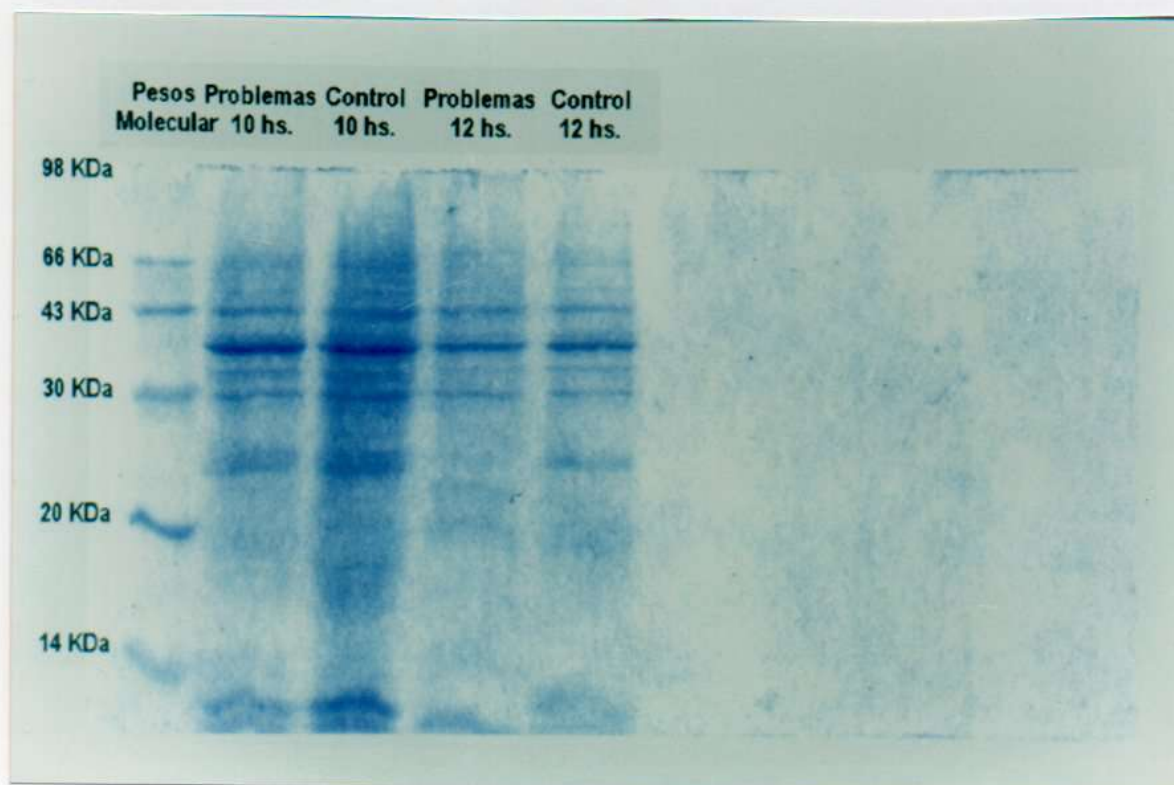
### **Controles 4 h:** (Figura 6)

Esta es la calle que más bandas presentó las cuales tenían los siguientes porcentajes de densidad óptica: 12.49%, 15.21%, 12.24%, 12.99%, 10.43%, 11%, 10.57%, 7.84%, y 7.22%, que se





**FIGURA 2- Corridas electroforéticas de homogenatos de glándulas submandibulares controles y problemas. SDS Page.**



**FIGURA 3- Corridas electroforéticas de homogenatos de glándulas submandibulares controles y problemas. SDS Page**

Control 0 hs bandas	% D. O./área	Peso Molec.	Problemas 0 hs bandas	% D.O./área	Peso Molec.
1	13.81	63.14kDa	1	30.96	64.06 kDa
2	18.09	52.96 kDa	2	30.35	53.64 kDa
3	11.76	47.49 kDa	3		48.05 kDa
4	12.29	43.68 kDa	4	22.40	43.91 kDa
5	10.21	37.06 kDa	5		29.10 kDa
6	13.87	35.43 kDa	6		20.63 kDa
7		33.78 kDa	7	16.27	13.47 kDa
8		26.61 kDa			
9		20.49 kDa			
10	9.40	18.59 kDa			
11	8.19	16.47 kDa			
12	5.86	13.81 kDa			

**FIGURA 4- Cuadro de porcentajes de densidades ópticas/área y pesos moleculares controles y problemas recién comidos**

Control 2 hs banda	% D. O./área	Peso Molec.	Problemas 2 hs bandas	% D.O./área	Peso Molec.
1	12.83	63.14	1	16.13	63.14 kDa
2	16.97	52.96 kDa	2	17.11	55.57 kDa
3	11.05	47.22 kDa	3	18.17	51.97 kDa
4	12.42	43.91 kDa	4	13.77	47.77 kDa
5	10.38	35.27 kDa	5	13.16	44.15 kDa
6	10.05	33.5 kDa	6		35.43 kDa
7		28,99 kDa	7	10.97	18.11 kDa
8	9.81	18.39 kDa	8	10.65	13.54 kDa
9	7.54	16.54 kDa			
10	8.76	13.14 kDa			

**FIGURA 5- Cuadro de porcentajes de Densidades ópticas/área y pesos moleculares controles 2 horas**





corresponden con los siguientes pesos moleculares: 62.69 kDa, 52.30 kDa, 46.41 kDa, 43.21 kDa, 32.95 kDa, 18.57 kDa, 17.15 kDa y 13.88 kDa. Se observan otras bandas de los siguientes pesos moleculares: 34.96 kDa, 26.06 kDa, 24.07 kDa, 13.81 kDa y 12.73 kDa.

#### Experimentales 4 h. (Figura 6)

Las bandas analizadas dieron los siguientes porcentajes de densidad óptica/área:

16.13% (63.14 kDa); 15% (52.96 kDa); 16.96% (47.22 kDa); 13.89 (43.91 kDa); 15.30% (35.27 kDa); 11.14% (18.25 kDa); y 11.54% (13.27 kDa). Además se encontraron bandas con los siguientes pesos moleculares: 36.72 kDa; 35.12 kDa y 20.63 kDa.

#### Experimentales 8 h (Figura 7)

Los porcentajes de densidad de intensidad óptica con relación al área de las bandas analizadas mostró los siguientes resultados: 12.72%, 15.39%, 11.91%, 13.07%, 9.74%, 10.54%, 9.39%, 8.06%, y 9.35% que correspondían a los siguientes pesos moleculares: 64.53 kDa, 52.53 kDa, 48.33 kDa, 44.15 kDa, 37.06 kDa, 32.42 kDa, y 14.24 kDa respectivamente. Se observaron además se observaron dos bandas adicionales correspondientes a los siguientes pesos moleculares 17.97 kDa y 10.33 K Da de peso molecular.

#### Control 8 h: (Figura 7)

Los porcentajes de densidades ópticas /área encontradas a este tiempo fueron de: 16.57%, 14.26%, 14.96%, 17.19%, 13.04%, 11.72%, y 12.22%. Estas bandas se correspondían con los siguientes pesos moleculares: 64.53 kDa, 52.53 kDa, 48.33 kDa, 44.64 kDa, 37.4 kDa, 35.5 kDa, 33.5 kDa, 17.29 kDa Y 15.17 kDa.

#### Controles 10 h: (Figura 8)

Los porcentajes de densidades ópticas registrados en las bandas que se evidencian en estos tiempos son: 11.46%, 14.19%, 21.36%, 12.76%, 15.23%, 12.65%, y 12.35%, cuyos pesos moleculares son: 64.53 kDa, 53.4, kDa 47.35 kDa, 44.02, kDa 37.08, 17.97 kDa, y 14.54 kDa.

Experimentales 10 h (Figura 8) Se analizaron los siguientes porcentajes de densidad óptica: 8.24 % (64.53 kDa), 12.37% (52.53 kDa), 23.32% (48.33 kDa), 11.10% (44.15 kDa), 12.07% (37.06 kDa), 9.57%, (32.42 kDa), 11.04% (17.97 kDa) y 12.26% (14.24)

Controles 12 h: (Figura 9)

Las bandas encontradas registraban los siguientes porcentajes de densidades ópticas: 19.72%, 37.92%, 15.12%, 15.94% y 13.27%, cuyos pesos moleculares son: 64.53 kDa, 53.4 kDa, 47.35 kDa, 44.02 kDa, 37.08 kDa, 17.97 kDa, y 14.54 k Da.

Problemas 12 h: (Figura 9)

Se analizaron los porcentajes de densidades ópticas: 30.29%, 45.38% y 24.30%, lo que demuestra una disminución de las bandas observadas.

Cuando se comparan los pattern electroforéticos con el de 10 h se destacó que en este tiempo desaparecen las bandas de 37.06 kDa y 17.97 kDa y aparece una banda de 11.2 kDa.



Control 4 hs bandas	% D. O./área	Peso Molec.	Problemas 4 h banda	% D.O./área	Peso Molec.
1	12.49	62.69 kDa	1	16.13	63.14 kDa
2	15.21	52.30 kDa	2	15	52.96 kDa
3	12.24	46.41 kDa	3	16.96	47.22 kDa
4	12.99	43.21 kDa	4	13.89	43.91 kDa
5	10.43	36.55 kDa	5		36.72 kDa
6		34.96 kDa	6	15.30	35.27 kDa
7	11	32.95 kDa	7		35.12 kDa
8		20.63 kDa	8		20.63 kDa
9		24.07 kDa	9	11.14	18.25 kDa
10	10.57	18.57 kDa	10	11.54	13.27 kDaGG
11	7.84	17.15 kDa			
12	7.22	13.88 kDa			
13		13.81 kDa			
14		12.73 kDa			

**FIGURA 6- Cuadro de porcentajes de Densidades ópticas/área y pesos moleculares controles y problemas 4 horas**

Contrl 8h. bandas	% D. O./área	Peso Molec.	Problema 8 h banda	% D.O./área	Peso Molec.
1	12.72	64.53	1	16.57	64.53 kDaG
2	15.39	52.53	2	14.26	52.53 kDa
3	11.71	48.33	3	14.96	48.33 kDa
4	13.07	44.64 kDa	4	17.19	44.15 kDa
5	9.74	37.40 kDa	5	13.04	37.06 kDa
6	10.54	35.50 kDa	6	11.72	32,42 kDa
7	9.39	33.5 kDa	7		17.97 kDa
8	8.06	17.29 kDa	8	12.22	14.24 kDa
9	9.35	15.15 kDa	9		10.33 kDa

**FIGURA 7- Cuadro de porcentajes de Densidades ópticas/área y pesos moleculares controles 8 horas**

Control 10h. bandas	% D. O./área	Peso Molec.	Problema 10 h banda	% D.O./área	Peso Molec.
1	11.46	64.53 kDa	1	8.24	64.53 kDa
2	14.19	53.40 kDa	2	12.37	52.53 kDa
3	21.36	47.35 kDa	3	23.32	48.33 kDa
4	12.76	44.02 kDa	4	11.10	44.15 kDa
5	15.23	37.08 kDa	5	12.07	37.06 kDa
6	12.65	17.97 kDa	6	9.57	32.42 kDa
7	12.35	14.54 kDa	7	11.04	17.97 kDa
			8	12.26	14.54 kDa

**FIGURA 8- Cuadro de porcentajes de Densidades ópticas/área y pesos moleculares controles y problemas 10 horas**

Control 12h. bandas	% D. O./área	Peso Molec.	Problema 12 h banda	% D.O./área	Peso Molec.
1	19.72	64.53 kDa	1	30.29	64.53 kDa
2	37.92	53.40 kDa	2	45.38	53.5 kDa
3	15.12	47.35 kDa	3		48 kDa
4	15.94	44.02 kDa	4	24.30	44.05 kDa
5	13.27	37.08 kDa	5		14.54 kDa
6		17.97 kDa	6		11.20 kDa
7		14.54 kDa			

**FIGURA 9- Cuadro de porcentajes de Densidades ópticas/área y pesos moleculares controles y problemas 12 horas**



## DISCUSION

La saliva cumple una variedad de funciones vitales para la homeostasis de la cavidad bucal (102-104):

- disuelve condimentos que luego pueden ser percibidos por el sentido del gusto.
- lubrica la cavidad bucal y permite funciones tan importantes como la masticación, deglución y fonación.
- actúa como un sistema neutralizante ("buffering") de los ácidos formados durante el metabolismo bacteriano de carbohidratos, provenientes de los alimentos.
- Provee iones minerales como calcio, fosfatos, fluoruros, etc, que son importantes en la remineralización del esmalte
- provee sustancias de defensa como inmunoglobulinas A secretoria, lactoferrina, lisozima, etc.
- modula a través de las mucinas ( especialmente las de bajo peso molecular), la infectividad del virus VIH-1 (105,106).
- favorece la regeneración de la mucosa oral por el factor de crecimiento epidermal (función endócrina de las glándulas salivales) (107).

Considerando la importancia de estas funciones en el ecosistema bucal, es fácil deducir que los pacientes que padecen hiposalivación. o xerostomía manifiestan serias dificultades en la lubricación del medio bucal, en la defensa ante daños mecánicos y en la prevención ante infecciones virales o bacterianas

Las causas más comunes de hiposalivación son:

- efectos colaterales de drogas (108,109) como diuréticos, antidepresivos, neurolépticos,

citostáticos, antiparkinsonianos y antihipertensivos, etc.

- patologías como diabetes, condiciones autoinmunes, síndrome de Sjögren, respiradores bucales, radioterapia de cuello y cabeza, y desordenes hormonales (102, 109-111).

Se comprende entonces, la importancia de encontrar medios de estimulación para glándulas salivales completas o restos glandulares (en casos de pacientes irradiados), sobre todo conociendo que pequeños estímulos como el de dulces libres de azúcar, o chicles producen beneficios importantes a corto plazo y moderados o bajos a largo plazo. (112).

Por otro lado está bien establecido que las radiaciones laser de baja potencia alteran ciertas funciones celulares como la síntesis y secreción de proteínas, crecimiento y diferenciación celular, motilidad celular, potenciales de membrana, afinidad a ligandos, liberación de neurotransmisores, fagocitosis, síntesis de prostaglandinas y ATP, efecto conocido en la bibliografía como **bioestimulante (27,37)**.

Sin embargo existen discrepancias acerca si tal efecto es siempre estimulante y si lo es sobre todos los tejidos (30). Se conoce además que, debido a esas modificaciones, a nivel tisular se producen diversas reacciones químicas; entre ellas las más notorias son liberación de histamina, y secreción de colágeno, (113,114).

Nuestros hallazgos a nivel estructural muestran una marcada congestión vascular e hiperemia en el sistema de la microcirculación, concordantes con los trabajos de Samar y col (88) y Velez González y col (113). Estas modificaciones podrían estar relacionadas con la liberación de histamina y la relajación del músculo liso vascular, al menos en los dos primeros tiempos experimentales.

Estas modificaciones vasculares evolucionan a cambios estructurales significativos a las 10 hs. post-irradiación donde se produce rupturas de las paredes vasculares, con extravasación de plasma y de elementos formes de la sangre.

Sin embargo todos estos cambios semejan más un franco proceso inflamatorio, que una simple reacción local. Las características más significativas que fundamentan esta apreciación son que a las 2 hs. post-irradiación se observa una vasodilatación linfática bien manifiesta (signo inequívoco de inflamación), y a las 10 h se destacan rupturas vasculares y extravasación de plasma, polimorfonucleares y linfocitos que infiltran la zona perivascular,



Estos hallazgos no son coincidentes con el concepto propuesto Trelles y col(115) y Colls (37), quienes afirman que las radiaciones laser de baja potencia tienen un efecto antiinflamatorio.

La proliferación fibroblástica con aumento de la secreción de colágeno por acción de las radiaciones laser de baja potencia son un hallazgo coincidente con trabajos previos ( 88,116-122). Sin embargo, nosotros no observamos modificaciones del estroma, salvo las producidas por la extravasación de los componentes sanguíneos.

Estas discrepancias acerca de las modificaciones vasculares como del estroma, podrían explicarse teniendo en cuenta que la densidad de energía utilizada modifica las reacciones celulares estimulando o suprimiéndolas.

Radiaciones laser de baja potencia depositadas en densidades de energía bajas ( $2 \text{ J/cm}^2$ ) producen una estimulación tanto en la cantidad como en la función de fibroblastos y de células inmunes, mientras que el depósito de densidades altas de energía ( $16 \text{ J/cm}^2$ ) produce una supresión de estas actividades. (123).

Nosotros utilizamos una densidad de energía intermedia-alta ( $10 \text{ Joul/cm}^2$ ) en forma directa sobre la glándula con el propósito de evitar interferencias o grandes disipaciones de energía. Probablemente esto explicaría de alguna manera las diferencias encontradas en nuestro trabajo con respecto a lo descrito por otros autores (37,88,115-122).

Un hallazgo importante de nuestras observaciones es que las radiaciones laser de baja potencia mantienen su acción a lo largo del tiempo experimental, hecho que se manifiesta por que las alteraciones encontradas aumentan progresivamente desde el tiempo cero (animal recién comido) hasta las 12 h post-irradiación.

Por otro lado, el análisis de los hallazgos ultraestructurales nos aportan datos de importancia con respecto al supuesto efecto bioestimulante de las radiaciones laser de baja potencia, con las dosis utilizadas por nosotros.

Malberti y col (124) demostraron que el ayuno durante 4 h. produce una acumulación de gránulos heterogéneos probablemente debido a diferentes estadios de maduración de las vesículas secretorias, hallazgo que coincide con lo demostrado en el presente estudio.



A períodos cortos de ayuno post irradiación se observa un marcado ensanchamiento de los espacios intercelulares y el desarrollo de abundantes microvellosidades, que estaría asociada a una secreción estimulada según lo describieron Amsterdam y col (125) y Williams y Cope (126)., estudiando el efecto de  $\beta$  adrenérgicos sobre glándula parótida de conejo.

Sin embargo, a las 10 h de ayuno post-irradiaciones el cuadro histológico muestra cambios importantes y se observan claros signos de desorganización celular originados por una programación interna de la célula con activación de señales intracelulares que conducen a su destrucción. Este mecanismo de autodestrucción programada conocido como **apoptosis** es notorio en primer lugar por los cambios nucleares (127). Las modificaciones detectables en el núcleo son la condensación de la cromatina y, en estadios más tardíos fragmentación del núcleo en varias partículas. Con la desintegración de la célula estas partículas son empaquetadas en cuerpos apoptóticos y son tomados por células fagocíticas vecinas (128).

Este hallazgo es coherente con lo que observamos estructuralmente como necrosis en migajas causada por la radiación, entendiendo que los términos necrosis y apoptosis en realidad se diferencian por la pasividad (necrosis) o el compromiso activo (apoptosis) de la célula en el proceso destructivo. Desde el punto de vista estructural en la necrosis en migajas la desorganización tisular es similar a las observadas por Russell y col (129) en el proceso de apoptosis que denominó citolisis en rosetas de maíz (*pop corn cytolisis*). Nuestros hallazgos respecto a las dilataciones de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso están de acuerdo con los de otros autores (130-132). Ferguson y Anderson (127) en un estudio sobre apoptosis en glándula mamaria describieron como un hecho destacable la desagregación de ribosomas adheridos. Este hallazgo es coincidente con nuestros resultados sobre efectos de las R.L.B.P. en glándulas submaxilares, datos no descriptos en la bibliografía.

Es indudable entonces la capacidad de este tipo de radiación de producir modificaciones a nivel subcelular, ya que la apoptosis es un proceso activo de células autónomas iniciado por una vía de señal especializada. Comienza con la activación de la enzima caspasa (principalmente caspasa -3 y probablemente caspasa- 7 y caspasa-6), lo cual causa la ruptura distintas proteínas



intracitoplasmáticas, lo que produce modificaciones a distintos niveles según la proteína que se altere.

( por ej: rabaptina sobre el retículo endoplásmico rugoso, laminas nucleares etc.)

Se señala la importancia de estos hallazgos debido a que las densidades de energía utilizadas por nosotros observamos que estas radiaciones no sólo no tienen un efecto estimulante del proceso de síntesis y secreción como lo proponen Coll y col, (37) sino que por el contrario promueven procesos apoptóticos que se producen en patologías como el síndrome de Sjögren.(133) que cursan con disminución de la función glandular y por lo tanto xerostomía.

Se ha propuesto que la activación y modulación de los mecanismos apoptóticos son de gran complejidad y son mediados por proteínas ligadas al cromosoma X (134), lo que resalta el amplio rango de acción de este tipo de radiaciones a nivel ultracitoplasmático.

Destacamos como un hallazgo no descrito en la bibliografía la extravasación de elementos formes de la sangre, la destrucción de membrana basal y la evolución hacia la desorganización de la célula acinar por efecto de las R.L.B.P. a las dosis de energía aplicadas en este estudio.

Se propone que el momento de máxima acumulación de proteínas solubles en los animales problemas a las 2 h post-irradiación se produce por un estímulo trófico celular, lo que explicaría que el pico de concentración máxima de proteínas se adelanta con respecto a los controles (4h).

Es de destacar que si bien estructuralmente la máxima acumulación de gránulos secretorios es similar en la glándula parótida y en la submandibular del cobayo, el comportamiento en cuanto al tiempo es diferente produciéndose antes en la glándula submaxilar (4 h de ayuno) que en la glándula parótida (10 a 12 h de ayuno) (135)

A las 10 hs y 12 hs post -irradiación, la curva de concentración de proteínas solubles decae lo que se corresponde con las modificaciones estructurales observadas: necrosis por invasión hemorrágica y a nivel celular por acción física (en "migajas"). Esta respuesta tisular induciría una disminución del compartimento glandular.

Por otra parte, las moléculas presentes en la saliva están constituidas por un grupo multigenético de proteínas y polipéptidos sintetizados por las glándulas salivales. Estas moléculas salivales son consideradas como una familia polimórfica. Tales sustancias químicas están relacionadas con



factores biológicos muy importantes en el mantenimiento de la salud bucal. (136).

Hay estudios que informan la existencia de un polimorfismo genético de las proteínas salivales (137) relacionado con una susceptibilidad específica a la degradación por microorganismos orales. Esta contribución genética, resalta la importancia de la composición salival y de la concentración de proteínas en la etiología de la caries dental y de enfermedades sistémicas. (138,139)

Es importante hacer notar que en nuestra experiencia hemos obtenido un trazado electroforético uniforme cuando se comparan los casos controles entre sí, hecho coincidente con lo que se manifiesta en humanos (136,140).

Cuando comparamos el pattern electroforético de los casos controles con sus respectivos problemas irradiados se observa en éstos una disminución, tanto en la cantidad de bandas evidenciables como los porcentajes de densidad óptica/área de dichas bandas.

Estos cambios se evidencian a partir de las 4 h. Sin embargo se señala que las proteínas de mediano peso molecular en un rango entre los 20 y 40 kDa desaparecen a las 12 h post-irradiación. Posiblemente por el rango de peso molecular estas proteínas se correspondan con las proteínas ricas en prolina. Estas fosfoproteínas representan el 60 al 70% del total de proteínas en saliva submandibular y parotídea (141). Son de crucial importancia en la limpieza y adherencia microbiana, modulan el equilibrio de Ca y fosfatos, intervienen en la lubricación cuando se asocia con albúmina (142), actúan como nutrientes bacterianos y participan en la formación de las películas intrabucales.

Estimamos que los hallazgos producidos por el presente trabajo, constituyen una base sólida que nos permiten proponer que las radiaciones laser de baja potencia en densidades de energía intermedia-alta no estimulan a la glándula submandibular, sino que por diferentes mecanismos alteran la funcionalidad de la misma resultando en un contenido de proteínas salivales en cantidad y calidad insuficiente para cumplir con los requerimientos de la fisiología bucal.

La mayor cantidad de bandas encontradas en condiciones de ayuno a las 4 h (controles) son consistentes con el valor máximo en la curva de concentración de proteínas solubles para este tiempo.

Cuando analizamos el trazado electroforético de las 2 h. post-irradiación, encontramos más bandas



proteicas quizás por desdoblamiento de las preexistentes (0h). Estos hallazgos son consistentes con los resultados encontrados respecto de la concentración de proteínas solubles, lo que probablemente se deba al estímulo trófico tisular producido por la RLBP.

A las 12 h. observamos desaparición de la mayor cantidad de bandas, y a este tiempo se produce una caída de la curva de concentración de proteínas solubles, probablemente debido a una necrosis acinar superficial por radiación (en migajas) correspondiente con lesiones apoptóticas y en la profundidad a la destrucción producida por una hemorragia intersticial.

Las alteraciones encontradas a nivel bioquímico y ultraestructural son indicadores claros de modificaciones en el proceso de síntesis proteica. La valoración de la presencia o no del material de secreción en la luz de los conductos y las alteraciones morfológicas encontradas a nivel estructural y ultraestructural nos permitirían postular que las R.L.B.P. alteran el proceso secretorio de la glándula.

Se señala la importancia de estos hallazgos inéditos por la significación que las secreciones salivales tienen en el mantenimiento del equilibrio biológico del ambiente bucal.



## CONCLUSIONES

Considerando los resultados encontrados en este estudio se propone que las Radiaciones Laser de baja potencia (RLBP):

- 1- producen modificaciones bioquímicas en el contenido de proteínas solubles en la glándula submandibular.
- 2- aumenta a tiempos experimentales cortos la concentración de proteínas solubles en la glándula, acelerando el momento de acumulación máxima de las mismas por un estímulo trófico local.
- 3- el análisis de las corridas electroforéticas indica una disminución en la cantidad como en la densidad óptica /área de las bandas en especial de las proteínas de mediano peso molecular (en un rango entre 20 y 40 kDa, posiblemente se correspondan con proteínas ricas en prolina), siendo esta alteración más notoria a las 12 h post-irradiación.
- 4- las modificaciones estructurales producidas por las R.L.B.P. se relacionan con el pattern electroforético de proteínas solubles en glándulas submaxilar.
- 5- producen modificaciones estructurales relacionadas con una historia de evolución inflamatoria desde el tiempo 0 h (recién comidos) hasta las 12 h. post-irradiación ,donde producen necrosis de las células parenquimatosas.
- 6- no afectarían ni el estroma, ni los procesos de proliferación fibroblástica, ni la de secreción de colágeno.
- 7- las modificaciones de tipo apoptótica en las células acinares indican modificaciones complejas a nivel subcelular , que sin duda afectan el proceso de síntesis y secreción protéica.
- 8- los hallazgos encontrados permiten postular que las R.L.B.P. afectan en proceso de síntesis y secreción en la glándula submaxilar de cobayo.



## RESUMEN

Las radiaciones laser de baja potencia (RLBP) modifican las funciones celulares. No se conoce si el efecto bioestimulante es transferible a todos los tejidos. Además la acción de estas radiaciones sobre las glándulas salivales no fue suficientemente estudiado. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las RLBP sobre las glándulas salivales de cobayo. Se utilizaron 144 cobayos machos de 150 g  $\pm$  30 g de peso corporal divididos en dos lotes: controles (animales recién comidos y con 2, 4, 8, 10 y 12 h. de ayuno) y problemas (irradiados con laser de He-Ne depositando una densidad de energía de 10.8 Joul/cm<sup>2</sup> +animales recién comidos y con 2, 4, 8, 10,y 12 h. de ayuno). Finalizados los tiempos experimentales estipulados los animales fueron reintervenidos tomándose biopsias de las glándulas submandibulares con un punch de 5 mm de diámetro, que se procesaron para microscopía óptica, electrónica de transmisión, determinación de proteínas solubles y corridas electroforéticas SDS Page. Los resultados se analizaron según el test t de Student y ANOVA. La curva de concentración de proteínas solubles mostró un pico a las 2 h post irradiación, con diferencias estadísticamente significativas (  $p < 0.05$ ) respecto a los otros grupos experimentales y a los controles, y una aceleración en el momento de máxima acumulación (2h de ayuno post irradiación), en relación a los controles (4 h de ayuno). El análisis del trazado electroforético nos permitió afirmar que se produce una disminución en la densidad / área y en la cantidad de bandas, con el efecto más notorio a las 12hs. post- irradiación donde desaparecen las bandas correspondientes a proteínas de mediano peso molecular (entre 20kDa y 40 kDa). Las observaciones de las preparaciones histológicas permitieron establecer que a tiempos experimentales cortos (2 h post irradiación), se produce un estímulo trófico local evolucionando hacia las 10 h en un franco proceso inflamatorio con necrosis del parénquima glandular. Los estudios ultraestructurales confirmamos los hallazgos morfológicos y sustentan las modificaciones bioquímicas observadas.

Estos resultados nos permiten concluir que las RLBP a las dosis utilizadas en este estudio alteran el

proceso de síntesis y secreción de proteínas en las glándulas submandibulares de cobayo.

Palabras claves: laser de baja potencia – glándulas submandibulares síntesis y secreción de proteínas.



## ABSTRACT

Low power laser radiations (L.P.L.R.) change some cellular functions. The effect on salivary glands has'nt been sufficiently studied. The aim of this work was to study the effect of L.P.L.R. on guinea pig salivary glands. One hundred and forty four male guinea pig ( $150 \pm 30$  g body weight) were used. The animal were divided into two groups: control group (feed animals and with 2, 4, 8, 10, and 12 hours fasted) and experimental group ( irradiated with He-Ne laser beam. The energy density was  $10.8 \text{ Joul } 7 \text{ cm}^2$ . The guinea pig were feed and 2, 4, 8, 10 and 12 hours fasted). Samples of submandibular glands was taken with a punch ( 5mm. Diameter) and were used for optic and transmission electron microscopy studies. The soluble proteins concentration were determined and electrophoretic patterns were made. Anova and T Student tes were applied. The soluble proteins concentration in the gland was maximum at 2 h following irradiation and the differences were statistically significant (  $p < 0.005$ ). The greatest cumulative value was advanced ( 2h post-irradiation) when it compared with control group (4 fasted animals) . The electrophoretic pattern analysis showed that the percent of density / area relation and the number band diminished at 12 h post- irradiation, the bands wich corresponded to medium molecular proteins weight (between 20 and 40 kDa) disappeared. Ond the other hand structural observations showed that the irradiation effect was progressive; observations showed a trophic stiumulant effect at 2 h. following irradiation, with inflammation of glandular parenchima and a necrotic picture of glandular parenchima at longer times. The ultrastructural observations confirm morphologic findings and biochemical observations.

Therefore we propose that L.P.L.R. with the doses applied in this study disturb the protein synthesis and secretion of guinea pig submandibulary glands.

Key words: Low laser power- submandibular glands- protein synthesis and secretion

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- **Crawford P.R.** – 1992. Lasers. The new wave in dentistry.  
J. Canad Dent Assoc 57: 570-73
- 2- **Shawlow A. and Towers C.** 1958. Infrared and optical massers .  
Physical Rev. 112: 1940-49.
- 3- **Stern R.H., Sognaes R.F.** 1964. Laser beam effecto on dental hard tissues.  
J. of Dent. Res. 43 (Suppl):837 (Abst. 307).
- 4- **Adrian J.C., Bernier J.L., Sprague W.G.** 1971. Laser effects and the dental pulp. J.A.D.A.  
83:113-117.
- 5- **Goldman L, Hornby P., Meyer R., Goldman B.** 1964. Impact the laser on dental caries. Nature  
203:417.
- 6- **Taylor. R, Shklar G., Roeber F.** 1965. The effect of laser radiation on teth, dental pulp and oral  
mucosa of experimental animals. Oral Surg. 19:786-795.
- 7- **Lobine R. R., Fine S.F.** 1966. Interaction of laser radiation with oral hard tissue. J. Prosth. Dent.  
16:589-597.
- 8- **Lobine R. R., Bussry B.R., Fine S.** 1968. Interaction of CO2 laser radiation with enamel and  
dentine. J.Dent. Res. 47: 311-317
- 9- **Borggreven J.M.P.M., Van Dijk J.W.E., Dnessens F.C.M.** 1980. Effect of laser irradiation on  
permeability of bovine dental enamel. Arch. Oral Biol 25: 831-832.
- 10- **Yamamoto H., Sato K.** 1980. Prevention of dental caries by acousto – optically Q- switched Nd.  
YAG laser irradiation. J. Dent. Res. 59 (2): 137.
- 11- **Koruda S, Fowler B.O.** 1984. Compositional, structural and phase changes in vitro laseR irradiated  
human tooth enamel. Calcif. Tissue Int. 36:361-369.
- 12- **Luomanen M., Virtanen I.** 1987 Healing of laser and sacalpel Incisión wuonds of rat tongue  
mucosa as studied with cytoderatin antibodies. J. Oral Pathol 16: 139- 144



- 13- **Luomanen M, Virtanen I. Letho V.P.** 1987. Extracellular matrix in healing CO2 laser incision wounds. *J. Oral Pathol. Med.* 16: 322-331
- 14- **Luomanen M, Virtanen I.** 1991. Fibronectins in healing incision, excision and laser wounds. *J. Oral Pathol. Med* 20: 133-138.
- 15- **Luomanen M.** 1991. Oral focal hyperplasia removed with CO2 laser. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 19: 205-207.16-
- 16- **Luomanen M.** 1992. Experience with a CO2 laser for removal of benign oral soft tissue lesions. *Proc. Finn. Dent. Soc.* 86:49-55
- 17- **Walsh J.T., Flotte T.J., Anderson R.R., Deutsch T.F.** 1988. Pulsed CO2 laser tissue ablation, measurement and modeling of ablation rates. *Laser Surg. Med.* 8:264-275.
- 18- **Walsh J.T., Flotte T.J., Anderson R.R., Deutsch J.F.** 1988. Pulsed CO2 laser tissue ablation: measurement and modeling of ablation rates. *Laser Surg. Med.* 8:264-275.
- 19- **Shomaker K.T., Walsh J.T., Flotte T.J., Deutsch J.F.** 1990. Thermal damage produced by high irradiance CWCO2 laser cutting tissue. *Laser Surg. Med.* 10:74-84.
- 20- **Pick R.M., Picaro B.C., Silverman C.J.** 1985. The laser gingivectomy: the use of the CO2 for the removal of phenytoin hyperplasia. *J. Periodontol* 56 (8):492-496.
- 21- **Frame J.W.** 1985. Removal of soft tissue pathology with the CO2 laser. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 43: 850-855.
- 22- **Abt E., Wigdor H.A., Lobraico R., Carlson B. Hris D., Pyrz R.** 1986. Removal of benign intraoral masses using the CO2 laser. *J.A.D.A.* 115 (11): 729-731.
- 23- **Pick R.M., Picaro B.C.** 1987. Use of CO2 lasers in soft tissue dental surgery. *Laser Surg. Med.* 7: 207-213.
- 24- **Walsh L.J.** 1997. The current status of low laser therapy in dentistry. Part 1- Soft tissue applications. *Austral. Dent. Journal* 42 (4): 247-256.
- 25- **Pick R.M.** 1993. Using lasers in clinical dental practice. *J.A.D.A.* 124: 37-47
- 26- **Dedrich D.N.** 1993. Laser- tissue interaction: what happens to laser light when it strikes tissues? *J.A.D.A.* 124:57-61.



- 27- **Midda M. and Renton Harper P.** 1991. Laser in dentistry. Br. Dent. Journal 11: 343-346.
- 28- **Mester E., Trelles M.A., Mester A., Mayyayo E.** 1983. Laser terapia y revisión de datos experimentales y resultados clínicos. Inv. y Clin Laser Vol I, N° 0 pp. 13.
- 29- **Mester E., Szende B., Gatner P.** 1968. Die wirkun del lasestirahten auf den haarwudnder maus. Radiobiol. Radiother. 9:621.
- 30- **Inuyin V.M., Cherekov V.P.R.** 1960. "Biostimulation trough laser radiation and Bioplasma". University of Copenaghagen.
- 31- **Strang R., Moseley H., Casrmichael A.** 1988. Soft lasers:have they a place in dentistry?. Br. Dent. Journal 165:221.
- 32- **Juri H. Dwyewr R.M. De Bernardo J.A.** 1990. Laser en Medicina y Cirugía. Editorial Continente. Córdoba pp. 14.
- 33- **Hunt S.P., Rossor M.N., Emson P.M., Clement Jones V.** 1982. Substance Pand enkephalines in spinal cord after limb amputation. Lancet 1: 1023.
- 34- **Benedicenti A., Gola G., Cuigano L., Lupi L.** 1984. Valoración radioinmunológica del nivel de  $\beta$  endorfina en el líquido cefaloraquídeo antes y después de irradiar con luz laser de 904 nm, en la neuralgia del trigémino. Inv y Clin Laser Vol 1 N° 3: 7-12.
- 35- **Benedicenti A.** 1982.. La valorizzazione dell effetto della luce laser 904 nm., nella circolazione ematica in vivo. Atlante di Laser Terapia. De. Langa Grafica, Cuneo. Pp71-83.
- 36- **Fuentes Lánzuela S.** 1986. Laser de baja potencia y bioestimulación. Inv. y Clin. Laser. Vol III. N°1, pp. 21-26.
- 37- **Coll Joseph.** Octubre 1986. "La terapia laser hoy". Editorial Centro de Documentación Laser. 3° Edición pp.70.
- 38- **Shackleford J.M., and Wiborn W.H.** 1967. Structure and histochemical diversity in mammalian salivary glands. J. Med. Sci. 5: 180-203.
- 39- **Lesson C.R.** 1967. "Handbook of physiology". ( C.F. Code De.) Sect 6, Vol II, pp 463-495. American Physiological Society, Washington D.C.
- 40- **Tandler B.** 1972. "A symposium on salivary glands and their secretion ". (N.H. Rowe de) pp. 8-



21. Univ. of Michigan Press. Ann. Arbor.
- 41- **Tandler B.H. and Mac Callum D.K.** 1972. Ultrastructure and histochemistry of the submandibular gland of the European hedgehog, erinaceous Europeans. L. I. Acinar secretory cells. *J. Ultrastruct. Res.* 39: 186-204.
- 42- **Imai M., Minoda T., and Oikawa M.** 1975. Some affinities and differences between the threeshrews (tupaia) insectivora and primates. *Okajimas Folia Anat. Jnp.* 51: 337-50.
- 43- **Ichikawa M. and Ichikawa A.** 1977. Light electron microscopic histochemistry of the seroussecretory granules in salivary glandular cells of the Mongolian bebil ( mongolian meridianus) and rhesus monkey ( macacae irus) *Anat Res.* 189: 125.
- 44- **Shackleford J.M., and Schneyer L.H.** 1971. Ultrastructure aspects of the main excretory duct of rat submandibular gland. *Anat. Rec.* 169: 679-696.
- 45- **Tandler B. and Poylsen J.H.** 1976. Ultrastructure of the main excretory ducts of the cat submandibular gland. *J. Morphol.* 149: 183-197.
- 46- **Nalvade M.N. and Varupe AT.** 1972. Histochemical studies on the mucines of the vertebrate tongues. Three histochemical analysis of mucosubstances in Von Ebner's glands of four varieties of bats. *Am. Histochem.* 17: 123-134.
- 47- **Shear M.** 1969. Ultrastructural studies of the intercalary ducts in the rat parotid glands. *S. Afr. J. Med. Sci.* 34: 21-27.
- 48- **Jamieson J.D.** 1972. *International Cell Biology* ( B.R. Brinkley and K.R. Porten eds.). pp 308-317. Rockefeller Univ. Pres. New York.
- 49- **Castle J.D., Jamieson J.D., and Palade G.E.** 1972. Radioanotographic analysis of the secretory process in the parotid acinar cell of the rabbit. *J. Cell. Biol.* 53:290.
- 50- **Dorey G. And Bahoola K.D.** 1972. II Ultrastructure of duct cell granules in mammalian submaxillary gland. *Z. Zellforsch. Mkrosk. Anat.* 126: 335-347.
- 51- **Selinger Z, Sharoni Y. and Palade G.E.** 1974. "Advances in cytopharmacology". (B. Ceccarelli, F. Clementi and J. Meldolesi eds.) Vol 2 pp. 23-28. Raven, New York.
- 52- **Schachler H.** 1974. "Advances in cytopharmacology". (B. Ciccarelli, F. Clementi and J. Meldolesi



eds.) Vol 2 pp 2207- 2218. Raven. New York.

- 53- **Riva A., Testa-Riva F., Del Friacco M., and Lantini M.S.** 1976. Fine structure and cytochemistry of the intralobular ducts of the human parotid glands. *J. Anat.* 122: 627.
- 54- **Schachler H.** 1977. "Mucus in health and disease". (M. Elstein, D.V. Pake eds. ). Pp. 103-129. Plenum, New York.
- 55- **Carlson D.M.** 1977. "Mucus in health and disease". (M. Elstein, D.V. Pake eds. ). Pp. 143-154. Plenum, New York.
- 56- **Phelps C.F.** 1978. Biosynthesis of mucus glycoprotein. *Br. Med. Bull* 34: 43-48
- 57- **Tandler B. and Boysen-Moller F.** 1978. Ultrastructure of the anterior medial glands of the rat nasal septum. *Anat. Rec.* 191: 174-176.
- 58- **Oemrawsingh Y. and Ronkema P.A.** 1974. Isolation, purification and chemical characterization of mucins from human submandibular glands. *Arch. Oral. Biol.* 19: 615-626.
- 59- **Oemrawsingh Y. and Ronkema P.A.** 1974. Composition and biological properties of mucins isolated from human submandibular gland. *Arch. Oral. Biol.* 19: 753-759.
- 60- **Moschera J. and Pigman W.** 1975. The isolation and characterization of rat sublingual mucus glycoproteins. *Carbohydr. Res* 40: 53-63.
- 61- **Krogstad S., Meisin B.J., and Rolla G.** 1975. Isolation of <sup>35</sup>S- labeled sulphated glycoprotein from the rabbit submandibular gland. *J. Biol. Buccale* 3: 53-55
- 62- **Krogstad S, Rolla G., Sonju T., Christensen T.B., and Hofsoy H.** 1976. Chemical analysis of a sulphated macro molecule isolated from rabbit submandibular gland. *J. Biol. Buccale* 4: 1-6
- 63- **Jacobsen N., Brennhoud J., and Janden J.** 1977. Human submandibular gland tissue in culture. I -sulphate incorporation and tissue culture technique. *J Biol. Buccale* 5: 159-167.
- 64- **Samar M., Crosa M., Lucero R., Plavnik L.M.** 1983. Modificaciones del tejido conectivo de glándulas salivales de ratas adrenalectomizadas. *Act Odont.* 16 (4): 47-52.
- 65- **Samar M., Lucero R., Plavnik L., Crosa M.** 1984. Caracterización estructural y histoquímica de glándulas salivales de ratas adrenalectomizadas. *Rev. Fac. Ciencias Méd. Córdoba.* XIII, N°2: 11-13.



- 66- **Abbe K., and Dawes C.** 1978. The effect of electrical and pharmacological stimulation on the types of proteins secreted by rat parotid and submandibular glands. *Arch. Oral. Biol.* 23: 367-372.
- 67- **Abbe K., Yoneda K., Fiyita R., Yokota Y., and Dawes C.** 1980. The effects of epinephrine and pheylephrine on the types of proteins secreted by rats salivary glands. *J. Dent. Res.* 19:1627-1634.
- 68- **Abbe K., Yoneda K., Yokota Y., and Dawes C.** 1980. Protein secretion by rat submandibular glands in response to dopamine. *I.A..D.R. Progr &Abst* 59 N° 85.
- 69- **Denny P.C., and Denny P.** 1981. Non developmental modifications induced in submandibular glands of young rats by chronic isoproterenol administration. *Arch. Oral. Biol.* 26: 297-301.
- 70- **Gesik E. and Azmitia E.** 1980. Age related changes in NGF, EGF and protease in the granular convoluted tubules of the mouse submandibular glands. A morphological and immunocytochemical study. *J. Geront.* 35: 520- 524.
- 71- **Gesik E., Brennan M., and Azmitia E.** 1982. Age related changes in EGF and protease in submandibular glands of C57Bl/65 mice. *Exp.Aging Res.* 8: 87-90.
- 72- **Gesik E., Wenk Salomone K., Onetti Muda A.,Gubits R.A., and Shaw P.A.** 1986. Effect of advanced age on the induction by androgen or thyroid hormone of epidermal growth factor and epidermal growth factor mRNA in the submandibular glands of C57Bl/65 male mice. *Mech. Ageing Dev.* 34: 175-178.
- 73- **Mehansho H., and Carlson D.M.,** 1983. Induction of protein and glycoprotein synthesis in rat submandibular glands by isoproterenol. *J. Biol. Chem.* 258: 6616-6620.
- 74- **Crosa M., Candiotti A., Fabro S.** 1980. Effect of isoproterenol on guinea pig parotid gland. *J.Dent. Res.* 59: 769.
- 75- **Levy M., Gasser S., Crosa M., Colussi V., and Malberti A.** 1987. Parotid gland: effects of different diets. *J. Dent. Res.* 66 (4): 812.
- 76- **Crosa M., Ferraris M.E., Lanfri C., Fabro S.** 1985. Glándulas salivales: efectos de una dieta láctea. Estudio citoquímico y ultraestructural. *Actas III Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas I-* 19,29.
- 77- **Malberti A., Crosa M., Candiotti A., Chalabe A. and Fabro S.** 1984. Effect of colchicine on





guinea pig parotid glands. J. Dent. Res., 63 (4):604.

- 78- **Crosa M., Malberti A., Collussi V. and Fabro S.** 1986. Parotid glands. Variation of amylase activity by fasting. J. Dent. Res. 65 (4): 466
- 79- **Malberti A. and Crosa M.** 1989. Submaxillary glands: some aspects of secretory process. J. Dent. Res. 68 (4). 534.
- 80- **Malberti A., and Crosa M.** 1990. Effect of colchicines on guinea pig submaxillary gland. J Dent. Res. 69 (4): 929.
- 81- **Malberti A., Crosa M.** 1991. Effect of colchicine on guinea pig submaxillary gland. J. Dent. Res 70 (4).
- 82- **Malberti A., Crosa M.** 1995. Biochemical aspects of guinea pig parotid gland by the effect of isoproterenol. J. Dent. Res. 73 (4).
- 83- **Malberti A.** 1996. Proceso secretorio en glándula parótida de cobayo: efectos de la colchicina y el isoprotereno. Estudios estructurales y ultraestructurales. Medición de las proteínas solubles y de la actividad de amilasa. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- 84- **Takahama M. And Barka T.** 1967. Electron microscopic alterations of submaxillary gland produced by isoproterenol. J. Ultrast. Res. 17: 452-474.
- 85- **Lillie J.H., and Han S.S.** 1978. Secretory protein synthesis in the stimulated parotid gland. Temporal dissociation of the maximal response from secretion. J. Cell. Biol. 59: 708-721.
- 86- **Crosa M., Malberti A., Fabro S.** 1996. Structural and biochemical modifications on parotid gland induced by fast. Acta Odontológica Latinoamericana 9 (2): 51-63.
- 87- **Juri H., Crosa M., Macciochi E.** 1989. The effect of Nd : YAG laser radiation on salivary glands. J. of Bloodless Medicine and Surgery. 7: 30-32.
- 88- **Samar M., Avila R., Juri H., Plivelic T. and Fabro S.** 1995. Histopathological alterations induced by He- Ne laser in the salivary glands of the posthatched chicken. J. of Clin. Laser Med. and Surg. 13 (4): 267-272.
- 89- **Karu Ti.** 1987. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. IEEE. J. of Quant Electr.



- 90- **Enwemeka C.S.** 1992. Ultrastructural, morphometry of membrane bound intracytoplasmic collagen fibrils in tendon fibroblasts exposed to He-Ne laser beam. *Tissue Cell* 28: 111-123.
- 91- **Satto H., Landhler M., Haina D. and Schill W.B.** 1984. The effects of laser light on sperm motility and velocity in vitro. *Andrologia* 16:23.
- 92- **Lions R.F., Abergel R.P., White R.A., Dwyer R.M., Castel J.C., and Vitto J.** 1987. Biostimulation of wound healing in vivo by a He- Ne laser. *Ann. Plast. Surg.* 18:47.
- 93- **Usuba M.** 1998. Effect of low level laser therapy on viscoelasticity of the contracted knee joint: comparison with whirlpool treatment in rats. *Lasers Surg. Med.* 22 (2): 81-85.
- 94- **Wollman Y., Roschking S.** 1993. Muscle fiber formation in vitro is delayed by low power irradiation. *J. Photochem. Photobiol. Biol* 17: 287-290.
- 95- **Passarella S., Casamassina E., Molinari S.** 1985. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne laser. *FEBS lett.* 175:95.
- 96- **Passarella S., Casamassina E., Quaglianelo E., Caretto G., Grillo E.** 1985. Quantitative analysis of lymphocyte-salmonella interaction and effect of lymphocyte irradiation by He-Ne laser. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 130: 546.
- 97- **Fork R.L.** 1971. Laser stimulation of nerve cells in aphasia. *Science* 171: 907-908.
- 98- **Young S., Volton P., Dyson M., Harvey W., Diamantopoulos C.** 1989. Macrophage responsiveness to light therapy. *Laser Surg. Med.* 9: 497.
- 99- **Karu Ti, Ryabykh T.P., Ferdoseyeva G.E., Puchkiva N.I.** 1989. He-Ne laser induced respiratory burst of phagocytic cell. *Laser Surg. Med.* 9: 585-588.
- 100- **Lowry O.H., Rosebrough N.H., Farr A.L. and Randall P.J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 193: 265-275.
- 101- **Johnson D.A., and Alvares O.F.** 1984. Zinc deficiency- induced changes in rat parotid salivary proteins. *J. Nutr.* 114: 1955-1964.
- 102- **Petersen J.K.** 1986. Xerostomia- *Scand J. Rheumatol.* 61 (suppl) 185-189.
- 103- **Screbnny L.M., Valdini A.** 1988. Hyposalivation. Part I: relationship to other oral symptoms



and salivary gland hypofunction. *Oral Sur. Oral Med Oral Pathol* 66: 451-458.

- 104- **Manthorpe R., Axell T.** 1990. Xerostomía. *Clin. Exp. Rheumatol* 8 (suppl 5): 7-12.
- 105- **Bergey E.J.,** 1994. Interaction of HIV-1 and human salivary mucins. *J. Acquir. Immune. Defic. Sndr. Oct. , 7 (10):* 995-1002.
- 106- **Shine E.**1997. The anti HIV-1 activity associated with saliva. *J. Dent. Res. Feb 76 (2):* 634-640.
- 107- **Christensen M.E., Hansen H. S., Poulsen S.S., Bbretlau F., Nexo E.** 1996. Immunohistochemical and quantitative changes in salivary EFG amilase and heptacorrin following radiotherapy for oral cancer. *Acta Oto- Laryngologica* 116(1):137-143
- 108- **Strahl R:C., Welsh S., Stecfus C.F.** 1990. Salivary flow rates a diagnostic aid in treatment planning geriatric patients. *Clin.Prev. Dent* 12: 10-12
- 109- **Fox P.C., Vander Ven P.F., Sonies B. C., Weiffenbach J:M., Baum B.J.** 1985. Xerostomia evaluation of a symptom with increasing significance. *J.Am. Dent. Assoc.* 110: 519-525.
- 110- **Persson R.E., Izutsu K. T., Truelove E., Persson R.** 1991. Differences in salivary floe rates in ederly subjects using xerostomatic medication. *Oral Sug. Oral Med. Oral Pathol.* 72: 42-46.
- 111- **Saunders R.H., Handelman S.L.** 1992. Effects of hyposalivatory medications on saliva flow rates and dental caries in adults aged 65 and older..*Space. Care Dent* 12:116-121.
- 112- **Edgar W.M.** 1990. Saliva and Dental Health..Clinical implications of saliva:report of a consensus meeting. *Br. Dental Journal . August 11/25:* 96-98.
- 113- **Velez Gonzales M and Colls Coruñas.**1988. Comportamiento de la luz en la interacción con los tejidos en especial, el laser de baja potencia. *Bol. C.D.L.* 15/16: 6-20.
- 114- **Mester E.** 1985. The biochemical effects of laser aplications. *Laser Surg. Med.* 5: 31-39.
- 115- **Trelles M.A. and Mayayo E.** 1992. Mast cells are implicated in lower poer laser efecto on tissue: apreliminary study. *Lasers in Medical Science.* 7: 73-77.
- 116- **Kana J.S. &Hutschenreiter G.** 1981. Effect of low power laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch. Surg.* 116: 293-296.
- 117- **Bosatra M., Jucci A., Olliaro P., Quacci D. & Sacchi S.** 1984. In vitro fibroblast and dermis



fibroblast activation by laser irradiation at low energy. *Dermatol* 16: 157-162

- 118- **Brunner R., Haina D., Landthaler M., Waidelich W., & Braun Falco O.** 1986. Applications of laser light of low power density. Experimental and clinical investigation. *Curr. Probl. Derm.* 15: 111-116.
- 119- **Chormette G., Auriol M., Zaitoun R., and Mousques T.** 1987. Effect of the soft laser on gingival tissue. II Effecto on wound healing. Optical microscopy, histoenzimology and electron microscopy study. *J. Biol. Buccale.* 15: 151-157.
- 120- **Takeda Y.** 1988. Irradiation effect of low- energy laser on alveolar bone after tooth extraction. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 17: 388-391.
- 121- **Noble P.B., Shields E.D., Blecher P.D., and Bentley K.C.** 1992. Locomotory characteristics of fibroblast within a trçthree dimensional collagen lattice: modulation by a He-Ne soft laser. *Laser Surg. Med.* 12 (6): 669-674.
- 122- **Walsh. L. J.** 1992. The use of lasers in implantology: an overview. *Journal of oral implantology.* Vol XVIII, N° Four: 335-340.
- 123- **Loevvschall H., Arenholtd-Bindslev D.** 1994. Effects of low level diode laser irradiation on human oral mucosa fibroblast in vitro. *Lasers Surg. Med.* 14: 347-354.
- 124- **Malberti A., Crosa M., Fabro S., Coluzzi V.** 1986. Glándula parótida. Variaciones estructurales producidas por el ayuno. Trabajo presentado en el Tercer año de la Carrera de Adscripción en la Cátedra de Histología y Embriología animal. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- 125- **Amsterdam A., O'Had Y., and Schram M.** 1969. Dynamics changes in ultrastructure of the acinar cell of the rat parotid gland during secretion cycle. *J. Cell Biol.* 41: 753-773.
- 126- **Williams M.A., and Cope G.H.** 1981. Membrane dynamics in the parotid acinar cell during regranulation acinar cell during regranulation: A stereological study following isoprenaline- induced secretion. *Anat. Rec.* 199: 389-401.
- 127- **Häcker G.** 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301: 5-17.
- 128- **Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.** 1972. Apoptosis: a basis biological phenomenon with



- wide-ranging applications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
- 129- **Russell S.W., Roseneau W., Lee J.C.**1972. Cytolysis induced by human llymphotoxin. *Am. J. Pathol.* 60: 103-118.
- 130- **Pollard J.W.,Pacey J., Cheng S.V., Jordan E.G.**1987. Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium.. *Cell Tissue Res.* 249: 533-540.
- 131- **Cotter T.G., Lennon S.V., Glynn J.M., Green D.R.** 1992. Microfilament disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoin apototica. *Cancer Res.* 52:997-1005.
- 132- **Ludewing. B., Graf D., Gelderblom H.R., Becker Y., Kroczek R.A., Pauli G.** 1995. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD-40 ligand) and TNF-alpha, buy strongly enhanced by interleukin 10. *Eur. J. Immunology.* 25: 1943-1950
- 133- **Nakamura H., Kawakami A., Yamasaki S., Nakashima T., Kamachi M., Migita K., Kawabe Y., Nakamura T., Koji T., Hayashi Y., Eguchi R.** 2000. Expression and ufnction of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in Sjögren's syndrome. *Lab. Invest. Sep.;* 80 (9): 1421-1427.
- 134- **Tapinos N.I., Polihornis M., Tzioufas AS.G.m Moutsopoulos. H.M.** 1999. Sjögren's Síndrome. Autoimmune epithelitis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 455:127-134.
- 135- **-Banderas Tarabay J., Gonzalez Begne M.** 1996. Genetic salivary protein polymorphism in mexican population. *Bol. Estud. Med. Biol.. Méx.* 44: 20-24.
- 136- **Azen E.A.** 1978. Genetic polimorphism in human saliva: an interpretative review. *Biochem. Genet.* 15:79.
- 137- **Coweman R.A.,Schaefer S.J., Fitzgerald R.J., Rosner D. ,Shklair L.,Waiter R.** 1979. Differential utilization of proteins in saliva caries-active and caries -free subjects as growth substrates. By plaque forming streptococci. *J. Dent. Res.* 58: 2019-2027.
- 138- **Anderson L.C., Mandel I.D.** 1982. Salivary protein polymorphism in caries free and caries-active adults. *J.Dent. Res.* 61: 1167-1168.



- 139- **Schwartz S.S., Zhu W.X., and Sreenby L.M.** 1995. Sodium dodecil sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human whole saliva. *Archs. Oral Biol.* 40 (10):949-958.
- 140- **Mandel I.D.** 1989. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *JADA* 119:298-304.
- 141- **Hatton M.N., Loomis R.E., Levine M.J., Tabak L.A.** 1985. Masticatory lubrication: role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary glycoprotein-albumin complex. *Biochemical J.* 230: 817-820.

