

## **EVALUACION DEL AREA Y DENSIDAD OPTICA DE GLÁNDULAS SALIVALES HUMANAS DE LA RAIZ DE LA LENGUA DE FETOS E INDIVIDUOS ADULTOS TEÑIDAS CON PAS, AB-PH1 Y DANE (AB PH 2.5)**

**Fernández, Javier Elías; Samar, María Elena; Ávila, Rodolfo.**

**Cátedra de Diagnóstico por Imágenes "A". Cátedra de Histología y Embriología "A". Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Javdens555@hotmail.com**

### RESUMEN

Las glándulas de la raíz de la lengua son predominantemente mucosas. El propósito de nuestro trabajo fue procesar y analizar las imágenes de cortes de estas glándulas de fetos e individuos adultos. Se evaluó el área y la densidad óptica de muestras coloreadas con PAS (adultos n=7, fetos n=9), AB pH 1 (adultos n=7, fetos n=9) y tricrómico de Dane (adultos n=7, fetos n=9). Con respecto a las glucoproteínas marcadas como PAS positivas podemos concluir que entre fetos y adultos se detecta un aumento estadísticamente significativo del área en adultos. En el grupo etario de los adultos se observaron diferentes intensidades de tinción específicas (AB pH 1: máxima, media y mínima; DANE (AB pH 2.5): normal y débil). Al observarse en los adultos que con AB pH 1 las áreas de tinción son similares a las de Dane (AB pH 2.5) y al encontrarse además con AB pH 1 intensidades máximas, se puede inferir que hay un predominio de glucosaminoglucanos ácidos. Estos datos nos indican que si bien en los fetos las glándulas salivales menores comienzan la secreción de glucoconjugados en el desarrollo prenatal, la superficie que ocupan las mucinas y su concentración es menor en comparación a los adultos.

Palabras clave: glándulas salivales de la raíz de la lengua, glucoconjugados,

análisis de imagen.

## INTRODUCCIÓN

Las glándulas de la raíz de la lengua forman parte de las glándulas salivales menores que juegan un rol de importancia en la fisiología y la patología de la cavidad bucal (Carpenter, 2013; De Almeida et al, 2008; Humphrey y Williamson, 2001). La contribución de las mismas al volumen total de saliva es inferior al 10 % y secretan de manera más o menos continuada. Sin embargo, cumplen una función principal protegiendo a los tejidos bucales duros y blandos (dientes y mucosa) debido a que incorporan mucinas a la saliva mixta en una cifra superior al 70 %. (Dawes y Wood, 1973; Hand et al, 1999, Samar, 2008).

Se ha demostrado que las glándulas salivales participan con sus mucinas de la formación de una capa que reviste a la mucosa bucal y que actúa como área de defensa entre los tejidos bucales y el medio ambiente ayudando al mantenimiento de la salud bucal (Levine, 1993; Wu et al, 1994; Traving et al, 1998). Las mucinas salivales interactúan con los tejidos duros y blandos para mantener el equilibrio del ecosistema bucal a través del desarrollo de inmunidad natural no específica (Levine, 1993; Wu et al, 1994). Las mucinas forman una película protectora contra la desecación y las agresiones externas debido a su viscosidad elevada, elasticidad, adhesividad y baja solubilidad. También, como ya fue descrito en la literatura, las sulfomucinas frenan el desarrollo de la flora bucal patógena y los sialoglucoconjugados incrementan la viscosidad de la secreción salival creando un mecanismo protector contra organismos patógenos y manteniendo un ambiente hidrofílico en la boca (Dodds et al, 2005; Traving et al, 1998).

Las glándulas de la raíz de la lengua se distribuyen en la región posterior de la lengua por detrás de las papilas caliciformes, cercanas a la tonsila lingual.

Son formaciones glandulares bilaterales predominantemente mucosas, con células grandes y núcleos adelgazados contra la superficie basal y el citoplasma totalmente ocupado por gránulos grandes y pálidos, con escasa afinidad por los colorantes histológicos de rutina (Samar, 2016; Ten Cate, 1986).

Numerosos investigadores demostraron que los glucoconjugados de las glándulas salivales de diferentes especies de mamíferos muestran importantes diferencias debido a la estructura y las propiedades histoquímicas de sus carbohidratos complejos (Offner y Troxler, 2000; Pinkstaff, 1980; Vigneswaran et al, 1989). Con métodos histoquímicos clásicos aplicados en cortes histológicos de las glándulas salivales, como son PAS y Alcian Blue se diferencian las macromoléculas que contienen carbohidratos (CH) (Spicer et al, 1992).

Los acinos mucosos son voluminosos, muestran una luz muy amplia y células secretoras cuboideas. Cuando las células están repletas de material secretorio, éste comprime los núcleos hacia basal. El citoplasma de los mucocitos es vacuolado y pálido cuando se tiñe con Hematoxilina-Eosina (H/E) debido a su contenido de mucígeno. Dicha sustancia es PAS positiva, alcianófila y metacromática y dilata la luz acinar (Ten Cate, 1986; Samar et al, 2008). Con histoquímica convencional se observó que con PAS las células presentaban intensa coloración difusa y con Alcian blue una fuerte coloración a pH 2.5 y 1.0. A partir de lo relatado, el propósito de nuestro trabajo fue procesar y analizar las imágenes de cortes de glándulas de la raíz de la lengua de fetos e individuos adultos teñidos con PAS, Alcian blue pH1 y DANE (Alcian blue pH 2.5) para evaluar el área (superficie que ocupa la sustancia) y la densidad óptica (concentración de la sustancia).

Los resultados obtenidos nos brindarán nuevos conocimientos histofisiológicos y serán punto de partida para comparar los mismos con los cambios patológicos tumorales y no tumorales de las glándulas salivales menores.

## OBJETIVOS

El propósito de nuestro trabajo fue procesar y analizar las imágenes de cortes de glándulas de la raíz de la lengua de fetos e individuos adultos teñidos con PAS, Alcian blue pH1 y DANE (Alcian blue pH 2.5) para evaluar el área (superficie que ocupa la sustancia) y la densidad óptica (concentración de la sustancia).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para los estudios morfométricos se tomaron como modelo las glándulas de la raíz de la lengua. Se realizó el procesamiento y análisis de imágenes de cortes de las glándulas de fetos e individuos adultos teñidos con PAS, AB-pH1 y DANE (AB Ph 2.5).

Se evaluó el área (superficie que ocupa la sustancia) y la densidad óptica (concentración de la sustancia) de muestras coloreadas con PAS (adultos n=7, fetos n=9), AB pH 1 (adultos n=7, fetos n=9) y tricrómico de Dane (adultos n=7, fetos n=9).

Todas las imágenes fueron procesadas mediante el empleo del software libre *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). El sistema fue calibrado con una imagen de un micrométrico tomada al mismo aumento y bajo las mismas condiciones, con el fin de obtener los resultados del área de tinción en mm<sup>2</sup>. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test no paramétrico de Kruskas-Wallis (software *Statgraphics Plus v5.1*).

ImageJ ImageJ es un programa de procesamiento de imagen de Java que funciona con diferentes sistemas operativos como Linux, Mac, Windows. Es el programa puro más rápido de procesamiento de imagen.

También se instaló y usó en *ImageJ* el módulo *Color inspector 3D (v2.1)*, el cual permite reducir todos los niveles de color a un número de colores determinado. Para la reducción de color se utilizó el algoritmo de Xiaolin Wu "*Color quatization by dynamic programming and principal analysis*" que, junto a una adecuada segmentación por reducción, permite de un modo dinámico identificar los valores color y sus frecuencias relativas; dichas frecuencias fueron posteriormente transformadas en valores de área teniendo en cuenta la calibración de la imagen.

## RESULTADOS

### **PAS (segmentación manual)**

Cada una de las imágenes PAS<sup>+</sup> se procesaron siguiendo el siguiente

protocolo: en primer lugar, cada imagen original (de tipo RGB-color) se separó en tres imágenes diferentes, correspondiente a cada canal de color, lo que originó imágenes de tipo 8-bit (Fig.1). De ellas se seleccionó para la segmentación posterior la correspondiente al canal G, al ser la que proporcionaba una mayor intensidad de tinción positiva respecto al fondo.

A continuación, la imagen correspondiente al canal G fue segmentada manualmente para seleccionar las estructuras con tinción específica (Fig.2), y se registraron los valores correspondientes al área y al nivel de gris medio de dichas estructuras segmentadas.

El análisis estadístico de los datos mostró un incremento estadísticamente significativo (test no paramétrico de Kruskal-Wallis) en los individuos adultos frente a los fetos, tanto en área de tinción (media±SEM: 123805±6640 **vs** 13491±1793;  $p<0.001$ ) como en su intensidad (nivel de gris medio, media±SEM: 63.4±1.5 **vs** 58.4±1.6;  $p<0.05$ ) (Gráfico 1).

### **PROCESAMIENTO CON COLOR INSPECTOR 3D (v2.1)**

Las tinciones con AB pH1 y con DANE (AB pH2.5) dan lugar a diferentes intensidades de tinción específicas (AB: máxima, media y mínima; DANES: normal y débil; (Fig. 3) difícilmente segmentables de modo inequívoco por el anterior método descrito. Así pues, se llevó a cabo un procesamiento de imagen diferente, que también se aplicó a las secciones PAS<sup>+</sup> para poder realizar un posterior análisis comparativo evitando el posible sesgo propio del procedimiento (y aún teniendo en cuenta que sólo se cuantificó una intensidad de color para estas secciones).

El procedimiento se basó en la instalación y uso en *ImageJ* del módulo *Color inspector 3D (v2.1)*, el cual permite reducir todos niveles de color a un número de colores determinado, de entre los cuales, en su caso, pudieran segmentarse en cada imagen los correspondientes a alguno (o todos) de los identificables como tinción específica (Figuras 4, 5 y 6). Para la reducción de color se utilizó el algoritmo de Xiaolin Wu "*Color quatization by dynamic programming and*

*principal analysis*” que, junto a una adecuada segmentación por reducción, permite de un modo dinámico identificar los valores color y sus frecuencias relativas; dichas frecuencias fueron posteriormente transformadas en valores de área teniendo en cuenta la calibración de la imagen.

### **AB-pH 1**

Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo (test no paramétrico de Kruskas-Wallis;  $p < 0.001$ ) del área de tinción (media  $\pm$  SEM) para todas las intensidades específicas en los adultos frente a los fetos: máxima ( $47868 \pm 4063$  **vs**  $633 \pm 442$ ); media ( $40743 \pm 2678$  **vs**  $1198 \pm 424$ ); y mínima ( $42938 \pm 1991$  **vs**  $4801 \pm 562$ ). Como puede observarse, los individuos adultos mostraron una proporción similar de las diferentes intensidades de marcaje. Sin embargo, en las imágenes correspondientes a los fetos el principal marcaje fue de tipo intensidad mínima (Gráfico 2).

Para el total de tinción, es decir, la correspondiente a la suma de las tres anteriores, se detectó un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ) en el área de las secciones correspondientes a los individuos adultos cuando se compararon con los fetos ( $131549 \pm 5659$  **vs**  $6631 \pm 976$ ). (Gráfico 3)

### **TRICROMICO DE DANE (con AB pH 2.5)**

Los valores de área obtenidos fueron significativamente superiores en los individuos adultos frente a los fetos para todos los valores de área: normal ( $46192 \pm 3338$  **vs**  $1010 \pm 350$ ); débil ( $47711 \pm 2462$  **vs**  $2586 \pm 456$ ). Se utilizó el test no paramétrico de Kruskas-Wallis ( $p < 0.001$ ), y el área de tinción se representa como media  $\pm$  SEM. (Gráfico 4)

De modo global, los individuos adultos mostraron una proporción similar entre los marcajes normal y débil, mientras que en los fetos se detectó una mayor proporción de marcaje tipo débil ( $93903 \pm 4817$  **vs**  $3596 \pm 536$ ). (Gráfico 5).

## **PAS**

El procesamiento de las imágenes PAS positivas con el módulo *color inspector*, y su posterior análisis estadístico, puso de manifiesto un aumento estadísticamente significativo en el área de tinción de las secciones de adultos cuando se compararon con la de los fetos ( $119678 \pm 5014$  **vs**  $22720 \pm 2193$ ). Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0.001$ ), y el área de tinción se representa como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . (Gráfico 6)

## **Comparación PAS vs AB**

Cuando se compararon los valores de área entre los tres tipos de tinciones histoquímicas en los fetos, se detectó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre todos y cada uno de los grupos de tinción. Sin embargo, en los individuos adultos sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre los marcajes PAS **vs** DANE y AB **vs** DANE, pero no en PAS **vs** AB. (Gráfico 7)

## DISCUSION

Con respecto a las glicoproteínas marcadas como PAS positivas podemos concluir que entre fetos y adultos se detecta un aumento estadísticamente significativo del área (la superficie que ocupan) en adultos. En ambos grupos etarios se identificó una sola intensidad de coloración (densidad óptica).

Con AB pH 1, que tiñe glucosaminoglucanos ácidos sulfatados, el área de tinción es significativamente mayor en adultos que en los fetos (para todas las intensidades, máxima, media y mínima). El área de tinción para las tres intensidades fue similar en los adultos, mientras que en los fetos hubo un marcado predominio de superficie en la intensidad mínima.

Con Dane (pH 2.5) se distinguieron dos intensidades: normal y débil. Para los adultos, el área obtenida para las dos intensidades fue significativamente superior en relación a los fetos. Mientras que en el grupo de los adultos el área de ambas intensidades de tinción fue similar, en el grupo etario correspondiente a los fetos predominó el área de intensidad débil.

Se puede concluir que en los fetos la superficie de tinción (área) fue significativamente menor en comparación a la de los adultos para PAS, AB pH1 y Dane y además hubo un marcado predominio del área de tinción mínima o débil en los fetos. Estos datos nos indican que si bien en los fetos las glándulas salivales menores comienzan la secreción de glucoconjugados en el desarrollo prenatal, la superficie que ocupan las mucinas y su concentración es menor en comparación a los adultos.

En el grupo etario de los adultos se observaron diferentes intensidades de tinción específicas (AB pH 1: máxima, media y mínima; DANE (AB pH 2.5): normal y débil). Al observarse en los adultos que con AB pH 1 las áreas de tinción son similares a las de Dane (AB pH 2.5) y al encontrarse además con AB pH 1 intensidades máximas, se puede inferir que hay un predominio de glucosaminoglucanos ácidos sulfatados que tienen un rol polifacético en el mantenimiento de la salud bucal, cumpliendo importantes funciones de defensa. En los adultos la superficie de distribución para las distintas intensidades de tinción fue semejante, lo que sería consecuencia de las modificaciones en el ciclo secretor de las glándulas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Carpenter G. (2013). The secretion, Components and Properties of Saliva. *Rev. Food Sci. Technol.* 4: 267-76.
- De Almeida P. del V., Grégio A.M., Machado M.A., De Lima A.A., Azevedo L.R. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J. Contemp. Dent. Pract.* 9 (3): 72-80).
- Dawes C., Wood C.M. (1973). The contribution of oral minor mucous glands secretions to the volume of whole saliva in man. *Archs. Oral Biol.* 18: 337-342.
- Dodds M.W., Johnson D.A., Yeh C.K. (2005). Health benefits of saliva: a review. *J. Dent.* 33(3): 223-33.
- Hand A.R., Pathmanathan D., Field R.B. (1999). Morphological features of the minor salivary glands. *Archs. Oral Biol.* 44. S3-S10.
- Humphrey S.P., Williamson R.T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.* 85(2): 162-9.
- Levine M. (1993). Salivary macromolecules. A structure/function synopsis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 694: 11-16.
- Offner G.D., Troxler R.F. (2000). Heterogeneity of high-molecular-weight human salivary mucins. *Adv. Dent. Res.* 14: 69-75.
- Pinkstaff C. (1980). The cytology of the salivary glands. *Int. Rev. Cytol.* 63: 141- 261.
- Samar M.E., Avila R.E., Fernández J., Fernández R., Ferraris R.V., Rugani N. (2005). Cambios estructurales e histoquímicos en glándulas linguales y palatinas humanas durante el envejecimiento. *Rev. Circ. Med. Córdoba.* 92: 2-7.
- Samar M.E., Avila R.E., Fonseca I., Ferraris R., Rabino M. (2008). Adenoma de células basales de glándulas salivales, variedades sólido y tubular: estudio histopatológico e inmunohistoquímico. *Patología Rev. Lat.* 46: 276-283.
- Samar M.E. (2016). *Histología humana clínicamente orientada.* 5° Edición. Córdoba. Samar Ediciones.

- Spicer S., Schulte B. (1992). Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically. A perspective. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 1-38.
- Ten Cate A.R. (1986). *Histología oral*. 2º Edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.
- Traving C., Schauer R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 1330-1349.
- Vigneswaran N., Haneke E., Hornstein O. (1989). A comparative lectin histochemical study of major and minor salivary glands with special reference to labial glands. *Rach. Oral Biol.* 34: 739-748.
- Wu A., Csaka G., Herp A. (1994). Structure, biosynthesis and function of salivary mucins. *Mol. Biol. Chem.* 137: 39-56.

## ANEXOS

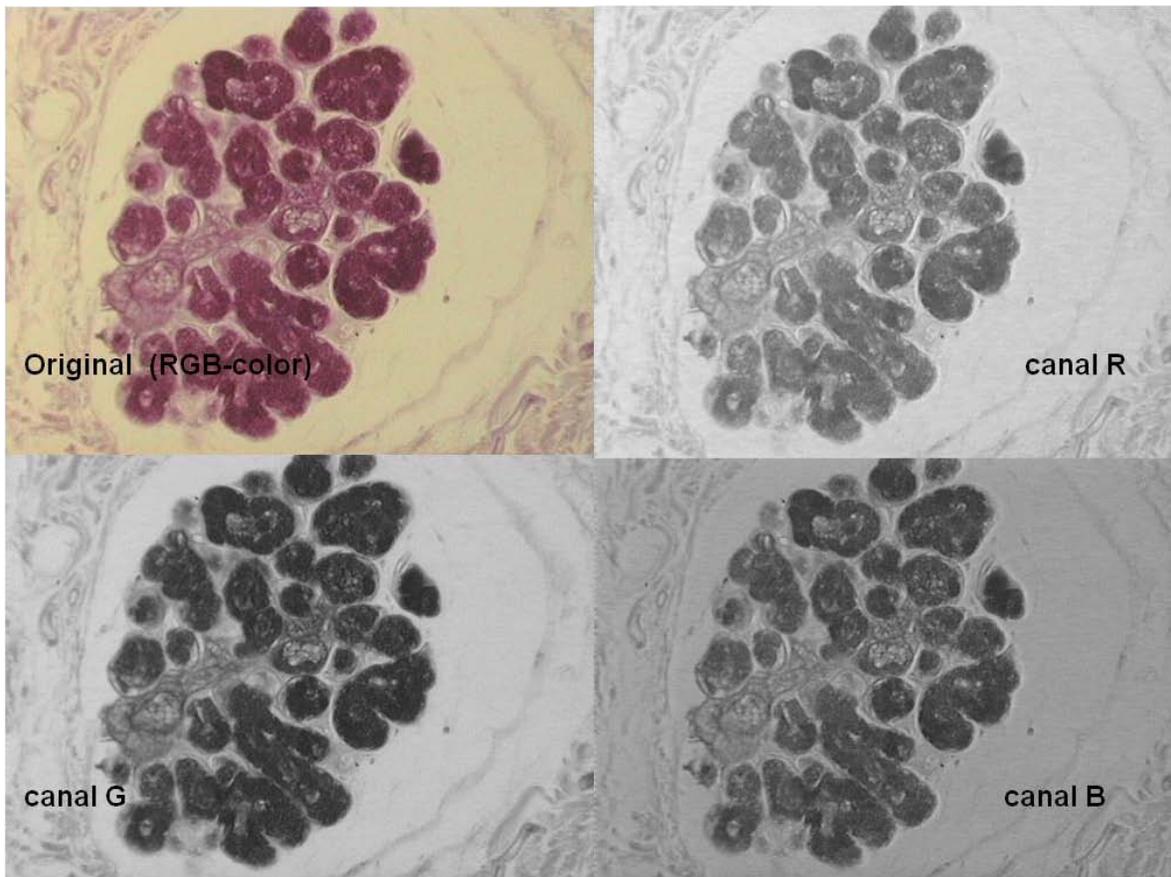


Fig. 1

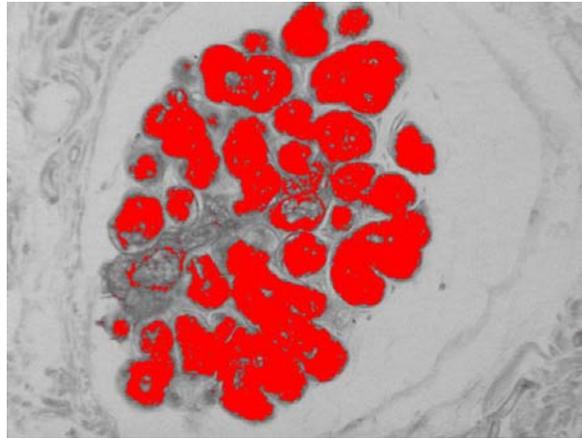


Fig.2

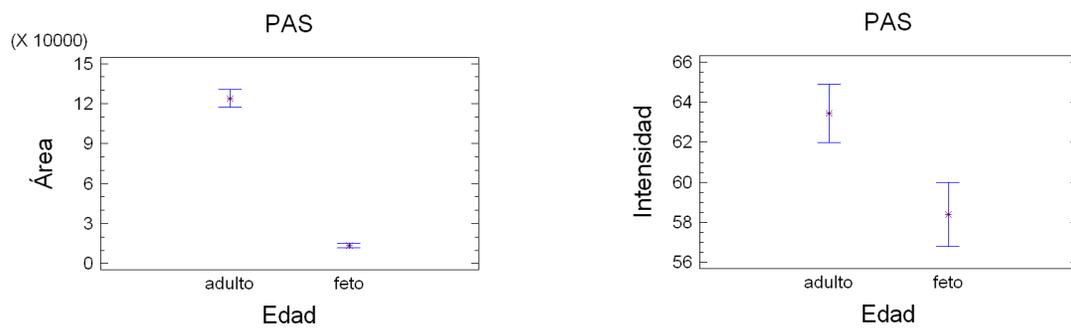


Gráfico 1

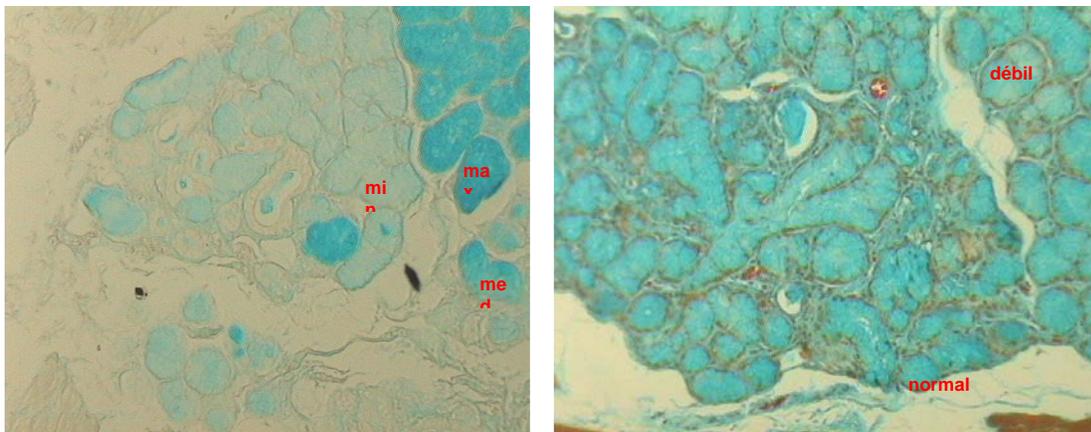


Fig.3. Intensidades de tinción correspondientes a secciones AB (A) y DANE (B).

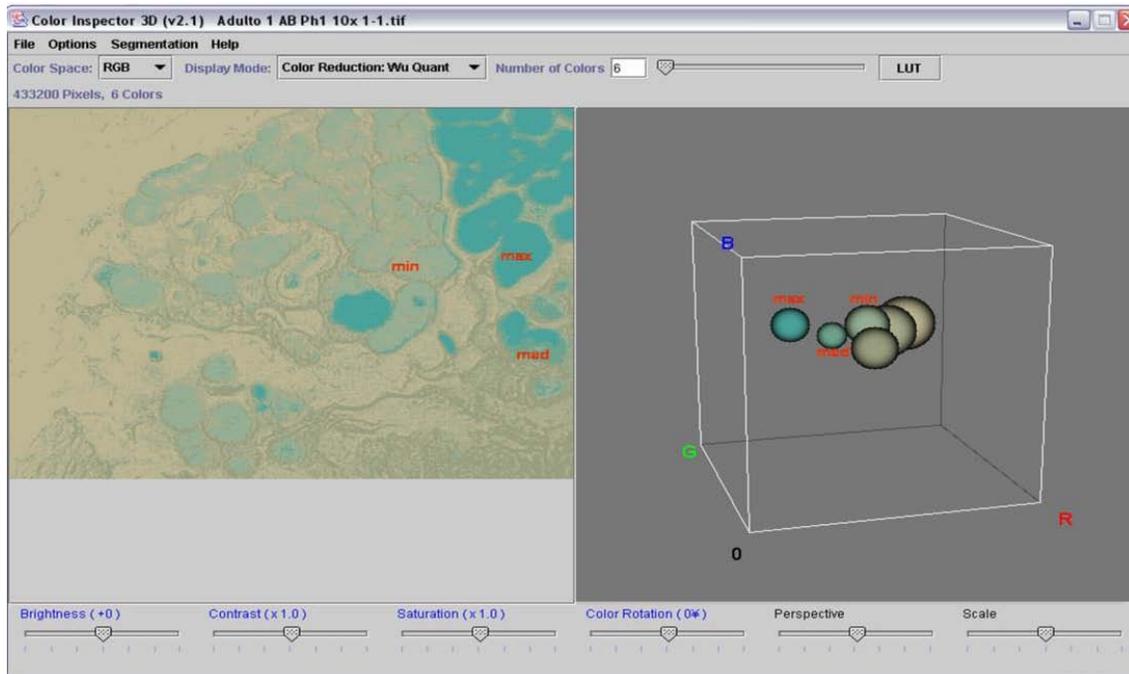


Fig.4 Procesamiento de una imagen AB mediante el uso del módulo *Color Inspector 3D*.

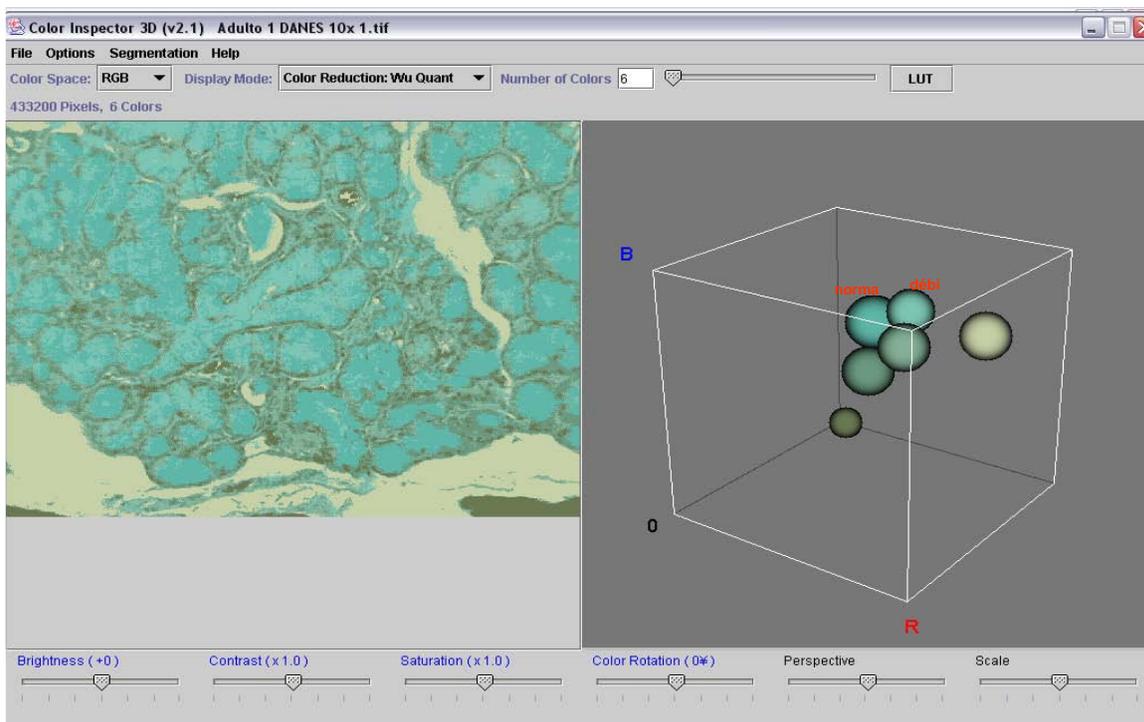


Fig.5. Procesamiento de una imagen DANE mediante el uso del módulo *Color Inspector 3D*.

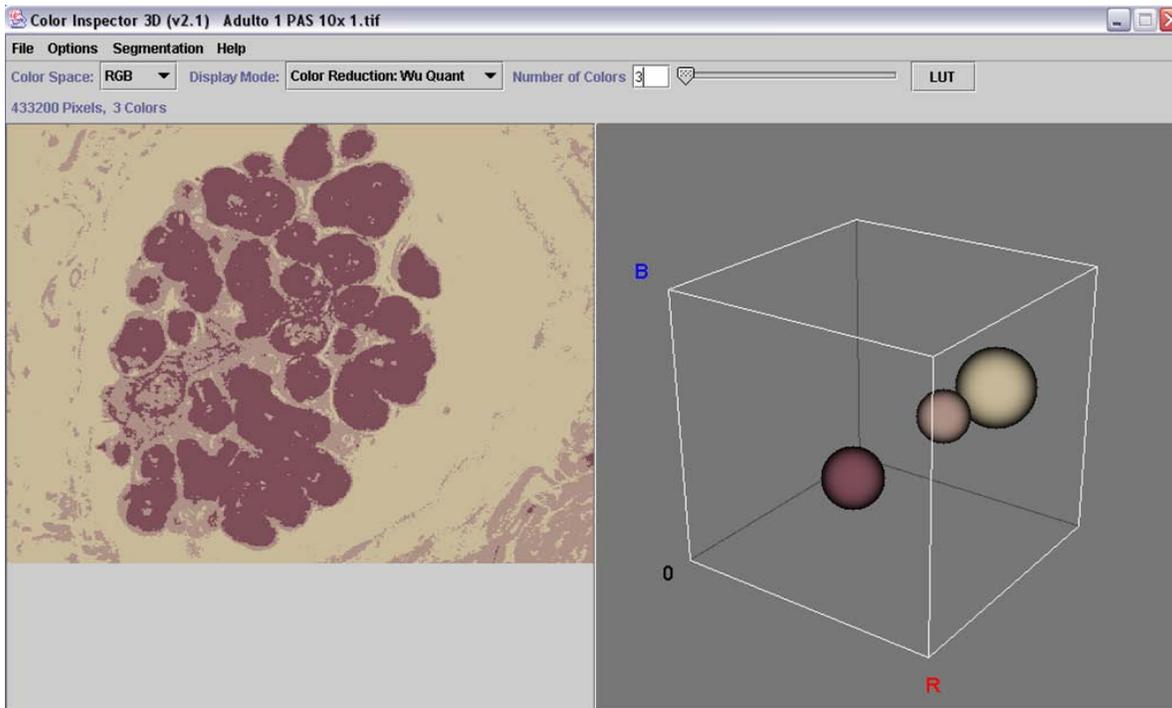


Fig.6. Procesamiento de una imagen PAS mediante el uso del módulo *Color Inspector 3D*

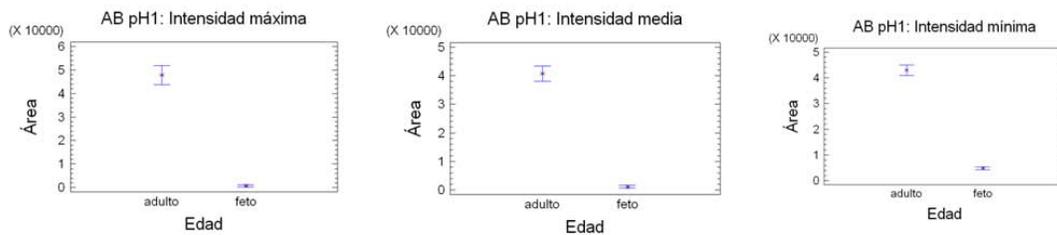


Gráfico 2

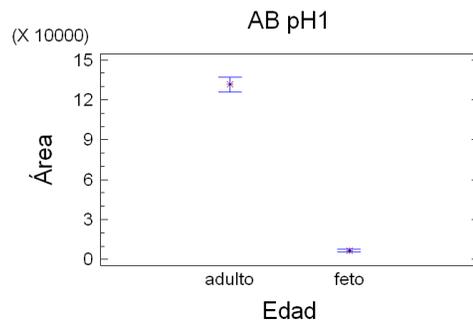


Gráfico 3

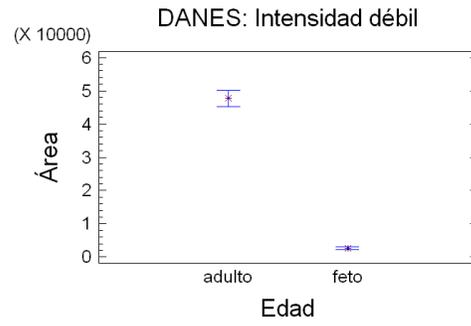
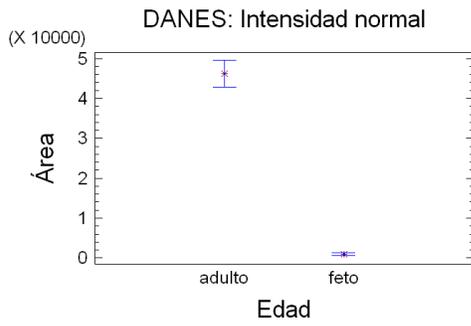


Gráfico 4

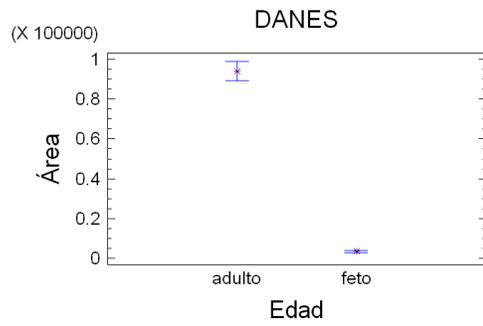


Gráfico 5

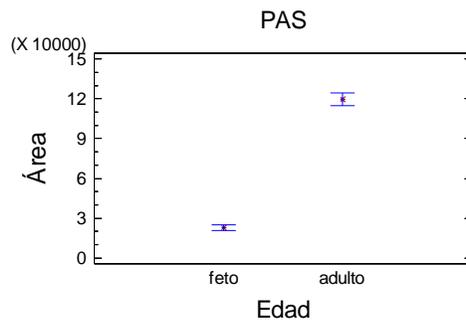


Gráfico 6

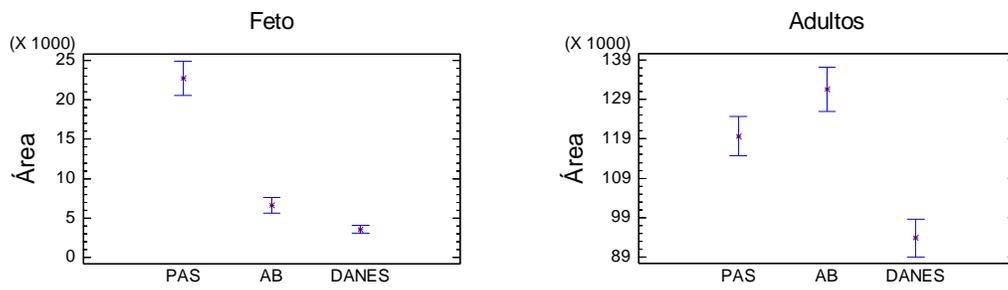


Gráfico 7