



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS**

**EFFECTOS DE LA OBESIDAD EN LA MORFOFUNCIÓN DE GLÁNDULAS
SUBMANDIBULARES DE RATAS**

Memoria presentada a la Escuela de Odontología de la
Universidad de Talca como parte de los requisitos exigidos
para la obtención del título de Cirujano Dentista.

**ESTUDIANTE: LEONEL FELIPE FAUNDEZ CORREA
PROFESOR GUÍA: DR. IGNACIO ROA HENRIQUEZ**

TALCA - CHILE

2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MÉTODOS	4
3.1. Diseño general	4
3.2. Unidades Experimentales	5
3.3. Procedimientos	5
3.4. Determinación de Estado Nutricional y Volumen Glandular	5
3.5. Obtención y Procesamiento de las muestras	6
3.6. Análisis Estereológico	6
3.7. Análisis Cuantitativo Salival	6
3.8. Microanálisis Semicuantitativo de Elementos.....	7
3.9. Análisis Estadístico	7
4. RESULTADOS	8
4.1. El consumo de alimentos provocó obesidad en GMS.....	8
4.2. GMS causó disminución del volumen glandular.	8
4.3. GMS causó alteraciones a nivel histológico.....	9
4.4. GMS causó disminución de pH y flujo salival y aumento de concentración de amilasa salival.	10
4.5. Microanálisis semicuantitativo de elementos salivales	10
5. DISCUSIÓN	12
6. REFERENCIAS.....	16
7. Anexos	21
7.1. Anexo 1: Acta de Evaluación para Protocolo de Investigación	21
7.2. Anexo 2: Solicitud de Bioseguridad para Protocolos de Investigación	22

1. RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica no transmisible, considerada una epidemia global, la cual afecta a múltiples órganos, entre ellos las glándulas salivales. Dentro de estas, las glándulas submandibulares, las cuales adquieren relevancia debido a que son las encargadas de la producción del 60-70% del volumen salival total no estimulado.

El objetivo de este estudio fue observar los cambios morfofuncionales en la glándula submandibular de ratas adultas posterior a la administración de glutamato monosódico (GMS) subcutáneo en su estado neonato. Se utilizaron glándulas submandibulares, obtenidas de 12 ratas Sprague-Dawley, divididas en 2 grupos según exposición a GMS, Grupo Control: Cloruro de Sodio 0,9% (p/v) en agua destilada) 8 µl/g peso vía subcutánea, Grupo GMS: 5 dosis de GMS vía subcutánea: 4 mg/g peso al 2° y 4° día y 2 mg/g peso al 6°, 8°, 10° día, ambos grupos mantenidos durante 16 semanas. Se determinó el estado nutricional de las ratas calculando Índice de Lee (IL), además de ser analizado el flujo salival, pH, actividad de α -amilasa, y porcentaje de masa de Na, Cl, K y Ca mediante análisis semicuantitativo. Luego de la eutanasia por sobredosis de ketamina/xilasina, las glándulas fueron extraídas y procesadas para histología y posterior estudio estereológico. Se observó un aumento en el IL de las ratas posterior a la exposición a GMS y cambios en los parámetros estereológicos a nivel del adenómero y sistema de conductos. Además de cambios en las características salivales como flujo, pH y composición de microelementos.

Palabras clave: obesidad, glándula salival, saliva, histología, glutamato monosódico.

2. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica no transmisible, considerada una epidemia en países desarrollados y en vías de desarrollo (1). Su prevalencia se encuentra en aumento, elevándose significativamente en la última década en Chile (2). Es considerada una patología de etiología multifactorial, sin embargo, el desequilibrio entre el consumo de calorías y gasto energético permanece dentro de sus principales causas (3).

Múltiples estudios reportan los efectos de la obesidad en la función y morfología de distintos órganos (4), a nivel oral, se ha observado su relación con patologías tales como caries, enfermedad periodontal y xerostomía (5), causadas principalmente por alteraciones en la función de las glándulas salivales (5).

Las glándulas submandibulares son una de las 3 glándulas salivales mayores, productoras de saliva, principalmente, de tipo serosa (6), las cuales producen entre el 60-70% del volumen salival no estimulado (7).

La saliva participa en procesos fisiológicos tales como digestión, gusto y olfato, además de intervenir en funciones como la lubricación, protección inmunológica y dentaria. (6) la cual se encuentra alterada en pacientes obesos, tanto en su composición como cantidad (8-10).

Existen múltiples modelos experimentales de obesidad, dentro de los cuales se utilizan sustancias obesidogénicas como el Glutamato Monosódico (GMS) (11, 12). El GMS es un potenciador del sabor, ocupado en la industria alimentaria y ampliamente consumido en alimentos envasados. Se ha reportado que la ingesta de GMS estaría asociada con un mayor riesgo de sobrepeso y de padecer síndrome metabólico independiente de la actividad física y la ingesta calórica en humanos (13). En ratas, la administración neonatal de GMS induce obesidad por destrucción de los núcleos arqueados y ventromedial del hipotálamo, los cuales regulan los mecanismos de absorción y gasto energético (12).

Actualmente, se han descrito cambios metabólicos en relación a glándulas salivales y obesidad, donde se ha observado disminución de la actividad secretora, reducción en la secreción de peroxidasa (14-16). Sin embargo, no existe claridad sobre los efectos de la obesidad en la morfología de las glándulas salivales (9).

En esta investigación, el objetivo fue observar los cambios morfofuncionales de la glándula submadibular, posterior a la administración de glutamato monosódico en ratas.

3. MÉTODOS

3.1. Diseño general

Dentro de este estudio experimental, fueron utilizadas glándulas submandibulares derechas obtenidas de ratas Sprague-Dawley obesas por efecto inductor de Glutamato Monosódico (GMS), tal como se observa en el esquema general de la Figura 1.

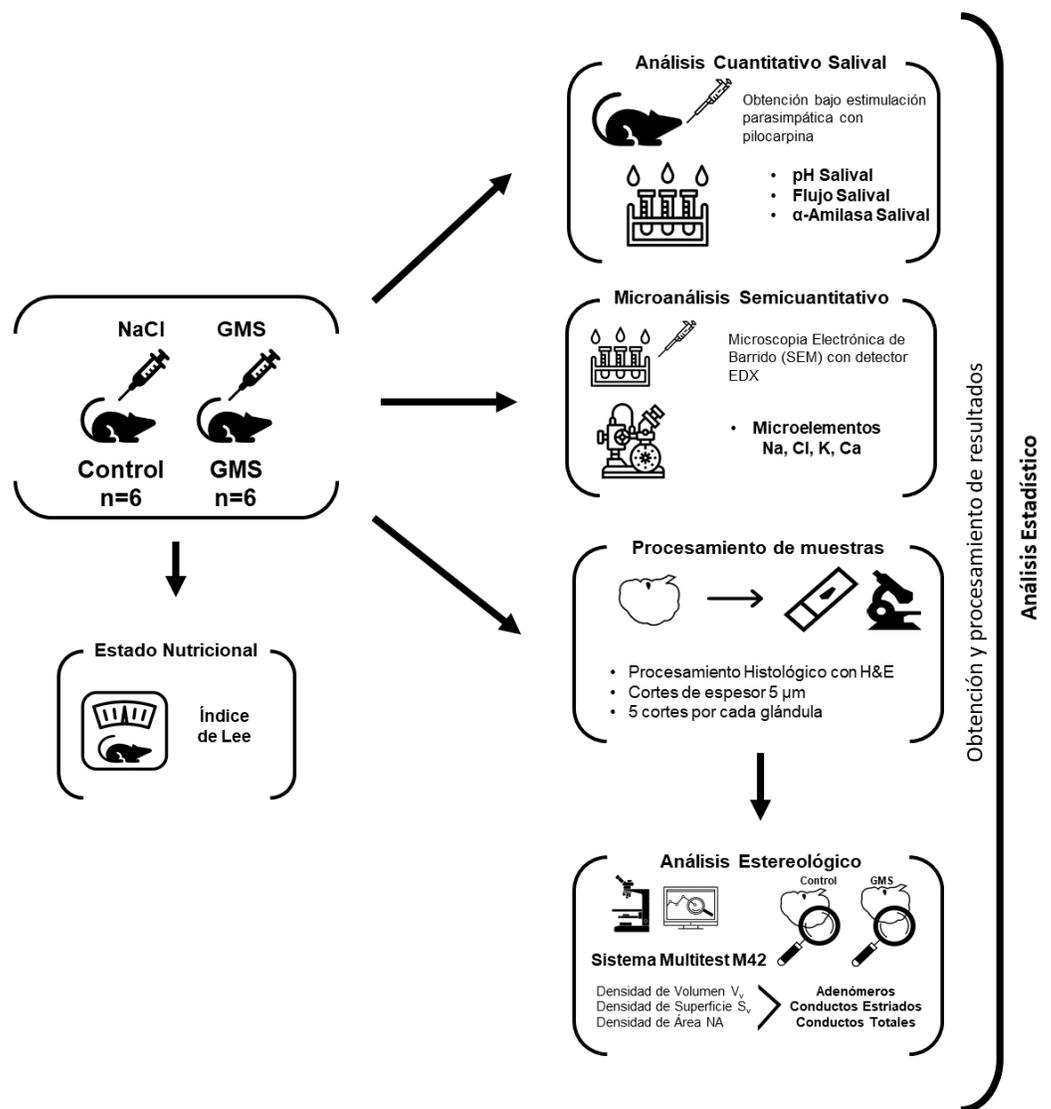


Figura 1: Diseño Experimental.

3.2. Unidades Experimentales

Las unidades experimentales fueron 12 ratas machos Sprague-Dawley, neonatas de 2 días post nacimiento. Las cuales se mantuvieron en el Bioterio del Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ) de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, durante 16 semanas en jaulas individuales a una temperatura de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 50 % - 70 % de humedad y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, se les administró bajo régimen *ad libitum* dieta estándar de laboratorio (AIN-93M) y agua.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile, (N°051/2017).

3.3. Procedimientos

Al comienzo del periodo experimental las ratas fueron divididas en 2 grupos: Grupo control (n=6): se les administró solución salina (Cloruro de Sodio 0,9% (p/v) en agua destilada) 8 $\mu\text{L/g}$ peso vía subcutánea. Grupo GMS (n=6) expuestas a 5 dosis de GMS vía subcutánea: 4 mg/g peso al 2° y 4° día y 2 mg/g peso al 6°, 8°, 10° día y mantenidas durante 16 semanas. Al terminar el periodo experimental las ratas fueron sometidas a eutanasia inducida por sobredosis de ketamina/xilasina.

3.4. Determinación de Estado Nutricional y Volumen Glandular

El peso y la longitud de cada animal fue medido semanalmente por toda la duración del periodo experimental. Para determinar el estado nutricional de los animales se utilizó el Índice de Lee: [La raíz cubica del peso corporal (g) dividida por la longitud hocico-ano(cm)] (17). Un valor igual o menor a 0,3 fue considerado normal; mayor que 0,3 fue considerado como obesidad (18). Se determinó el volumen glandular utilizando método descrito por Scherle. (19)

3.5. **Obtención y Procesamiento de las muestras**

Después de extraer las glándulas submandibulares, se fijaron en formalina tamponada durante 48 horas, se deshidrataron e incluyeron en Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A.). Posterior a obtener los bloques, se realizaron cortes de 5 μm de espesor (Leica® RM2255) y se tiñeron con H&E.

3.6. **Análisis Estereológico**

Para el análisis estereológico, se utilizó un microscopio óptico (Leica®, DM750, Switzerland) con cámara integrada (Leica® ICC50W, Nussloch, Germany). Se obtuvieron imágenes a partir de la observación de 5 campos para cada corte histológico. Los parámetros que se analizaron fueron los siguientes: *Densidad de Volumen* (V_v), *Densidad de Superficie* (S_v) y *Densidad de Area* (NA) tanto para adenómeros (A_d), como para conductos estriados ($_{str}$) y conductos totales ($_{tc}$), utilizando un Sistema de Test Multipropósito M42 (20) (21). Se consideró un núcleo representativo de una célula.

3.7. **Análisis Cuantitativo Salival**

La saliva se recolectó de la cavidad oral de cada animal, bajo estimulación parasimpática, para aumentar el flujo, y facilitar la recolección de saliva. A los animales se le administró Pilocarpina clorhidrato 2% (2 mg/kg de peso corporal s.c.), posteriormente la saliva fue aspirada utilizando una micropipeta, almacenándose en un tubo Eppendorf y mantenido sobre hielo, a los cuales previamente se le agregó 60 μL de inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cockteail set I, Merck, Darmstadt, Germany) con el fin de minimizar la pérdida proteica. El pH salival se obtuvo utilizando tiras reactivas de pH (MQuant®, Merck, Darmstadt, Germany). La determinación del flujo salival, se obtuvo con una micropipeta 20-200 μL (BioPette™, NJ, USA) por un periodo de 10 min.

3.8. **Microanálisis Semicuantitativo de Elementos**

Para la determinación de los elementos salivales se realizó un Microanálisis elemental Semicuantitativo, EDX en un Microscopio Electrónico de Barrido (VP-SEM) (SU 3500 Hitachi, Japan) acoplado a Detector EDX, (Quantax, Bruker, Berlin, Germany). Se depositaron 50µl de saliva sobre cinta doble faz de carbono montada al stub, se secó a 30°C por 10 min (control cinta carbono). Se realizó un microanálisis elemental semicuantitativo en las muestras bajo los siguientes parámetros: Energía 15KV, Distancia de trabajo (WD) 10mm aprox., detector BSD-3D, Magnificación 500X Presión 6Pa.

3.9. **Análisis Estadístico**

Los datos fueron recolectados en el programa Microsoft Excel y analizados con GraphPad Prism. Para determinar su distribución se utilizó el Test de Shapiro-Wilks. Según la normalidad de los datos obtenidos se usó t de Student o U de Mann-Whitney. Se consideró un valor $p < 0.05$ para la significancia.

4. RESULTADOS

4.1. El consumo de alimentos provocó obesidad en GMS.

Luego del tiempo experimental, las ratas correspondientes al grupo GMS, presentaron aumentos en sus pesos corporales al ser comparados con el grupo no intervenido, presentando un Índice de Lee de 0,4 desde el mes 3 en adelante. Dichos cambios en el peso nos indica obesidad, tal a lo observado en la Fig. 2.

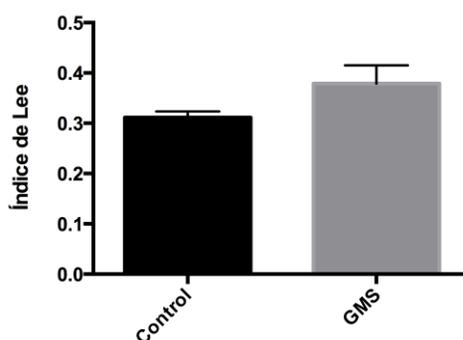


Figura 2: Estado Nutricional de ratas.

4.2. GMS causó disminución del volumen glandular.

Respecto al volumen de la glándula submandibular, esta presentó una disminución tanto en el grupo GMS ($0,36 \pm 0,03$ ml) en comparación al grupo control ($1,47 \pm 0,10$ ml) lo que fue estadísticamente significativo ($p=0.0014$) (Fig. 3).

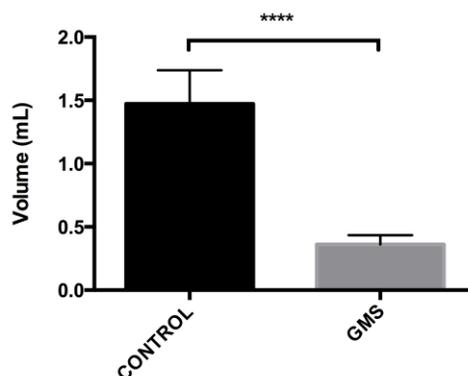


Figura 3: Volumen Glandular Submandibular.

4.3. GMS causó alteraciones a nivel histológico.

El análisis estereológico reflejó un aumento en V_v , S_v y un descenso del NA de adenómeros de la glándula submandibular en el grupo GMS, valores estadísticamente no significativos en comparación al grupo control. Por su parte V_v , S_v y NA de conductos estriados de la glándula submandibular en el grupo GMS aumentaron en comparación con el grupo control ($p=0.001$). Respecto a los conductos totales, estos mostraron un aumento en V_v , NA y S_v , ($p=0.01$) (Fig. 4).

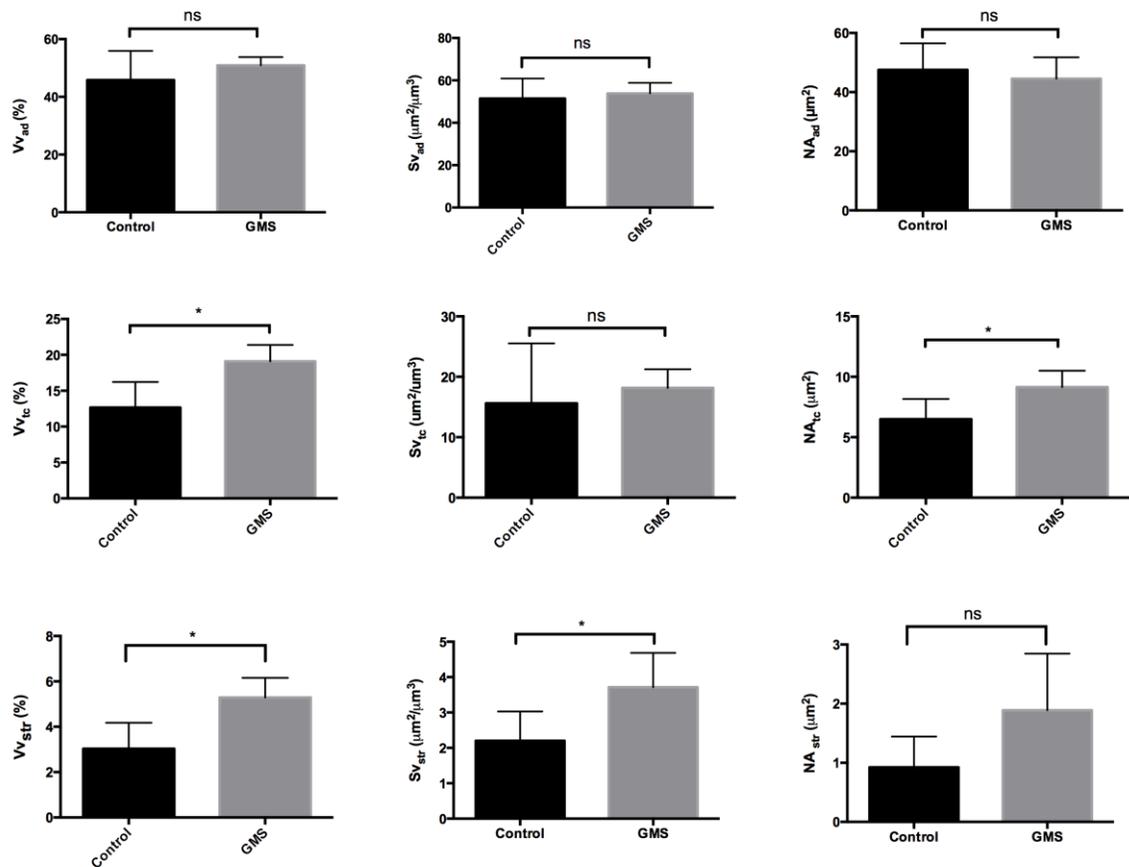


Figura 4: Resultados del Análisis Estereológico en adenómeros, conductos totales y estriados.

4.4. GMS causó disminución de pH y flujo salival y aumento de concentración de amilasa salival.

Luego del tiempo experimental, las ratas correspondientes al grupo GMS, presentaron una disminución en el pH salival, GMS ($7,7\pm 0,23$) y control ($8,8\pm 0,36$) resultado estadísticamente significativo ($p=0.0001$). Las tasas de flujo salival por grupo fueron control ($167,5\pm 18,9$ $\mu\text{L}/\text{min}$) GMS ($101,7\pm 10,1$ $\mu\text{L}/\text{min}$) presentándose una disminución tanto en el grupo GMS, resultados estadísticamente significativos ($p=0.01$). La α -amilasa presentó aumentos en el grupo GMS (11732 ± 3999 U/L) al ser comparados al grupo control (5905 ± 1668 U/L), significativos ($p=0.0095$) (Fig. 5).

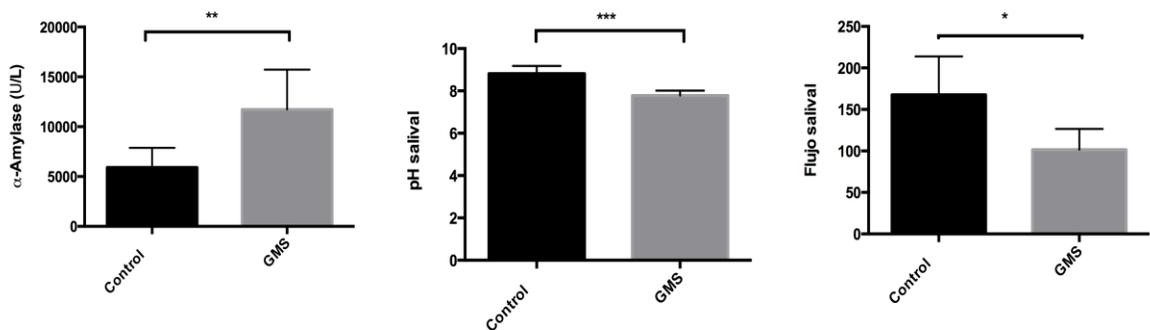


Figura 5: Resultados Análisis cuantitativo y cualitativo salival.

4.5. Microanálisis semicuantitativo de elementos salivales

En relación a los elementos encontrados en la saliva, los valores se encuentran descritos en la Tabla 1. La exposición a GMS, indujo cambios en los microelementos salivales, existiendo diferencias estadísticamente en los aumentos de sodio en el grupo GMS ($5,18\pm 1,79$) al ser comparado con el control ($3,78\pm 1,89$) ($p=0.0002$). Del mismo modo el cloro presentó aumentos estadísticamente significativos ($p< 0.0001$) en el grupo GMS, al ser comparados con el grupo control. El potasio y el calcio presentaron leves disminuciones en el grupo GMS con respecto al grupo control, resultados que no fueron estadísticamente significativos ($p= 0.0890$ y 0.2805 respectivamente).

Porcentaje de Masa (%)	Grupos		
	Control	GMS	<i>p</i>
Na	3,7±1,8	5,1±1,7	0,0002
Cl	14,1±4,7	19,8±6,9	< 0,0001
K	13,3±5,0	12,2±4,3	0,0890
Ca	3,25±3,6	1,4±0,7	0,2805

Tabla 1: Resultados de Análisis semicuantitativo micro elemental.

5. DISCUSIÓN

Ha sido observada que la administración neonatal de GMS subcutánea desarrolla obesidad, debido a la destrucción de los núcleos arqueado y ventromedial a nivel hipotalámico, específicamente, la necrosis neuronal en estas áreas (22), alterando el mecanismo regulatorio saciedad/apetito, provocando una mayor ingesta que gasto calórico en los individuos expuestos (12). A pesar de esta evidencia, actualmente, la relación entre el consumo de GMS y un riesgo aumentado de padecer sobrepeso es controversial (23). Sin embargo, varios estudios reportan un aumento del peso corporal en los grupos expuestos tanto animales como humanos (13, 24, 25). Aún más, se reporta una asociación positiva entre GMS y sobrepeso independiente de la actividad física y la ingesta calórica en humanos. (26). Para que se desarrolle obesidad en ratas, varios autores señalan que GMS debe ser administrado de forma subcutánea o intraperitoneal durante el periodo neonatal, en un rango de 4-10 dosis de 2-4 mg/g de peso (12, 27). Es así, como los presentes resultados muestran un aumento en el Índice de Lee, en el grupo experimental, lo que indica generación de obesidad en el grupo expuesto a GMS, luego de un periodo de 16 semanas, reafirmando lo expuesto por diversos autores. Dicha obesidad estaría explicada por el efecto del GMS en los núcleos hipotalámicos que controlan el eje apetito/saciedad.

Además de los efectos obesidogénicos del GMS, se reportan sus efectos nocivos en diversos órganos, entre ellos, algunas estructuras orales (14, 28). Luego de la exposición a GMS, fue observada una disminución del volumen de la glándula submandibular comparadas a los valores del grupo control, alcanzando una disminución del 75%. Los presentes datos indicarían una asociación entre obesidad y disminución del volumen glandular, resultados similares a los reportados por otro autor (29), quien observó una disminución del del volumen de la glándula parótida, en un modelo de obesidad inducida por GMS.

A nivel histológico, la exposición a GMS induce cambios en la glándula submandibular, existiendo alteraciones a nivel de adenómeros, conductos estriados y conductos totales. A nivel de adenómeros hay un aumento en el volumen de estas estructuras, aunque una

disminución de la superficie que estas ocupaban en la glándula, indicando alteraciones en el número de estas y tamaño (más cantidad pero más pequeños). Con respecto a los conductos totales, estos se encuentran aumentados en volumen y superficie en el grupo expuesto a GMS. La alteraciones a nivel de la densidad de células acinares explicaría la reducción en el flujo salival secretado debido a un descenso en el número de células secretoras. Estos resultados son semejantes a los publicados por Renzi et al. (30), donde se reporta la hipotrofia de estas estructuras causada por la inducción de obesidad vía daño hipotalámico con alteraciones similares a las generadas por la administración de GMS en las ratas.

Si bien los presentes resultados indican alteraciones a nivel estereológico, evidenciándose aumento tanto en V_v , S_v de adenómeros, conductos estriados y totales en las glándulas submandibulares de ratas expuestas a GMS, Roa (28), observaron disminución de estos parámetros al observar glándulas parótidas de ratas en un modelo de obesidad inducida por GMS. Esto podría deberse a la morfología y función distinta de ambas glándulas, como describen otros autores, los que han descrito que la glándulas parótida y submandibular de humanos reaccionan de manera diferente frente en pacientes obesos y trastornos alimenticios, siendo la glándula parótida, la más afectada (31).

Con respecto a los conductos estriados, hay un mayor volumen y superficie ocupados por estos, así como también, un aumento en las células que los conforman. Estos hallazgos, podrían explicar en parte los cambios de concentración en los electrolitos salivales del grupo, donde Na y Cl están afectados, electrolitos absorbidos a nivel del conducto estriado, conformando así una a la secreción secundaria. Lo anterior, en contraste con los resultados obtenidos en el análisis semicuantitativo salival, la concentración de elementos Na y Cl muestran un aumento y la secreción de K en la saliva está disminuida en el grupo experimental. Lo que sugiere una deficiencia en la reabsorción pasiva/activa y la secreción, respectivamente, de estos a través de los conductos. Sin embargo, se hacen necesarios más estudios para determinar la causa de estos cambios en los niveles de estos elementos, ya que, aparentemente podría estar alterada la cadena metabólica intracelular responsable de la producción, los mecanismos de transporte transmembrana que utilizan estos elementos por efecto del GMS, el stress oxidativo presente en los tejidos como observan ciertos autores

(14, 28) o alteraciones a nivel nervioso parasimpático que impidan una correcta estimulación a nivel glandular (31).

El pH disminuyó de manera significativa en el grupo expuesto a GMS, evidenciando el efecto de éste sobre la función glandular, resultados similares a los reportados por otros autores en niños indios (32), donde pudieron observar la relación existente entre la disminución del pH, el aumento del IMC y disminución del flujo salival. La disminución del pH salival se podría deber a la relación directa entre flujo salival y cantidad de bicarbonato, ya que, a menor flujo salival, se libera menos bicarbonato, lo que disminuye el pH. Algunos autores indican que los cambios en el pH de las glándulas salivales, pueden conducir a cambios perjudiciales en la estructura de las glándulas salivales, repercutiendo en sus funciones, y causando hiposalivación, similar a lo observado en nuestro estudio (33). Sin embargo, otros autores no observaron cambios en el pH de niños obesos o sobrepeso al ser comparados con normopeso, igual resultado obtuvieron con el parámetro flujo salival (34).

Con respecto a los valores de α -amilasa, esta enzima se presentó aumentada en el grupo expuesto a GMS. Este aumento ha sido reportado previamente por varios autores en animales obesos (35, 36) en animales obesos, en modelos de obesidad inducidos por GMS y dietas ricas en grasas, respectivamente. Si bien en nuestros resultados se observó una disminución del número de células acinares, la secreción de α -amilasa aumentó, lo cual podría ser explicado por una respuesta compensatoria de estas células.

Es interesante resaltar las implicancias de la función secretora alterada, ya que están comprometidas varias funciones de la saliva, principalmente relacionadas con la homeostasis y protección inmunológica que otorga al medio oral. Entre estas alteraciones, podrían aparecer un aumento en el riesgo de padecer lesiones de caries producto de la alteración del flujo salival, niveles de pH y capacidad buffer salival para detener el ataque ácido producido por el biofilm oral en el esmalte dental como describen varios otros autores en estudios con individuos obesos. (8, 15, 37).

Todos los cambios morfológicos observados explican finalmente la alteración en la función glandular principalmente relacionada con la actividad secretora y corroboran cambios metabólicos que ocurren en glándulas salivales de organismos obesos como señalan diversos autores (14, 28).

En conclusión, la actividad glandular salival está relacionada con los cambios morfofuncionales observados, más aún, las alteraciones inflamatorias crónicas existentes en organismos obesos, sumado el stress oxidativo provocado por el GMS a nivel tisular explican, en última instancia, estos mismos cambios de la glándula submandibular y sus implicancias en el mantenimiento de las condiciones de salud oral.

6. REFERENCIAS

1. Farooqi IS. Genetic, molecular and physiological insights into human obesity. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(4):451-5. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02468.x.
2. Salud Md. Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 Primeros Resultados 2017 [cited 2019 8/12]. Available from: <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17-PRIMEROS-RESULTADOS.pdf>.
3. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet.* 2011;378(9793):804-14. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60813-1.
4. Meldrum DR, Morris MA, Gambone JC. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will? *Fertil Steril.* 2017;107(4):833-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.02.104.
5. Mathus-Vliegen E, Nikkel D, Brand H. Oral aspects of obesity. *International dental journal.* 2007;57(4):249-56. doi: 10.1111/j.1875-595X.2007.tb00128.x.
6. Dawes C, Pedersen AML, Villa A, Ekström J, Proctor GB, Vissink A, et al. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology.* 2015;60(6):863-74. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.03.004.
7. Carlson ER, Ord R. *Textbook and color atlas of salivary gland pathology: diagnosis and management*: John Wiley & Sons; 2009.
8. Mozaffari MS, Abdelsayed R, Zakhary I, El-Salanty M, Liu JY, Wimborne H, et al. Submandibular gland and caries susceptibility in the obese Zucker rat. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 2011;40(2):194-200. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00965.x.

9. Inoue S, Campfield LA, Bray GA. Comparison of metabolic alterations in hypothalamic and high fat diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1977;233(3):R162-R8. doi: 10.1152/ajpregu.1977.233.3.R162.
10. Pedersen AML, Belstrøm D. The role of natural salivary defences in maintaining a healthy oral microbiota. *Journal of dentistry*. 2019;80:S3-S12. doi: 10.1016/j.jdent.2018.08.010.
11. Savcheniuk OA, Virchenko OV, Falalyeyeva TM, Beregova TV, Babenko LP, Lazarenko LM, et al. The efficacy of probiotics for monosodium glutamate-induced obesity: dietology concerns and opportunities for prevention. *EPMA Journal*. 2014;5(1):2. doi: 10.1186/1878-5085-5-2.
12. Von Diemen V, Trindade EN, Trindade MRM. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2006;21(6):425-9. doi: 10.1590/S0102-86502006000600013
13. Insawang T, Selmi C, Cha'on U, Pethlert S, Yongvanit P, Areejitranusorn P, et al. Monosodium glutamate (MSG) intake is associated with the prevalence of metabolic syndrome in a rural Thai population. *Nutrition & metabolism*. 2012;9(1):50. doi: 10.1186/1743-7075-9-50.
14. Berehova T, Falalyeyeva TM, Neporada KS, Hordiienko L. Metabolic changes in salivary glands of rats under glutamate-induced obesity. 2014.
15. Modéer T, Blomberg CC, Wondimu B, Julihn A, Marcus C. Association Between Obesity, Flow Rate of Whole Saliva, and Dental Caries in Adolescents. *Obesity*. 2010;18(12):2367-73. doi: 10.1038/oby.2010.63.

16. Salamonowicz MM, Zalewska A, Maciejczyk M. Oral consequences of obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *Dent Med Probl.* 2019;56(1):97-104. doi: 10.17219/dmp/102620.
17. del Carmen Contini M, Millen N, Riera L, Mahieu S. Kidney and liver functions and stress oxidative markers of monosodium glutamate-induced obese rats. *Food and Public Health.* 2012;2(5):168-77. doi: 10.5923/j.fph.20120205.08.
18. de Campos KE, Sinzato YK, de Paula Pimenta W, Rudge MVC, Damasceno DC. Effect of maternal obesity on diabetes development in adult rat offspring. *Life sciences.* 2007;81(19-20):1473-8. doi: 10.1016/j.lfs.2007.09.016.
19. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie.* 1970;26(1):57-60.
20. Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *The Journal of cell biology.* 1966;30(1):23-38. doi: 10.1083/jcb.30.1.23.
21. Mandarim-de-Lacerda CA, Del Sol M. Tips for Studies with Quantitative Morphology (Morphometry and Stereology). *International Journal of Morphology.* 2017;35(4). doi: 10.4067/S0717-95022017000401482.
22. Burde RM, Schainker B, Kayes J. Acute Effect of Oral and Subcutaneous Administration of Monosodium Glutamate on the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus in Mice and Rats. *Nature.* 1971;233(5314):58-60. doi: 10.1038/233058a0.
23. Ebert AGJO. Evidence that MSG does not induce obesity. 2009;17(4):629. doi: 10.1038/oby.2008.631.

24. El-Aziz GSA, El-Fark MO, Hassan SM, Badawoud MHJTTJoVM. Effects of Prolonged Oral Intake of Monosodium Glutamate (MSG) on Body Weight and Its Correlation to Stomach Histopathological Changes in Male Rats. 2014;44(2):201-8.
25. He K, Du S, Xun P, Sharma S, Wang H, Zhai F, et al. Consumption of monosodium glutamate in relation to incidence of overweight in Chinese adults: China Health and Nutrition Survey (CHNS). The American Journal of Clinical Nutrition. 2011;93(6):1328-36. doi: 10.3945/ajcn.110.008870.
26. He K, Zhao L, Daviglius ML, Dyer AR, Van Horn L, Garside D, et al. Association of Monosodium Glutamate Intake With Overweight in Chinese Adults: The INTERMAP Study. 2008;16(8):1875-80. doi: 10.1038/oby.2008.274.
27. Nagata M, Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Maruyama H, Takeda S, et al. Type 2 Diabetes Mellitus in Obese Mouse Model Induced by Monosodium Glutamate. Experimental Animals. 2006;55(2):109-15. doi: 10.1538/expanim.55.109.
28. Hordiienko LP, Berehova TV, Neporada KS, Falalieieva TM. [Oxidative stress development in the tissues of salivary glands of rats in conditions of monosodium glutamate-induced obesity]. Fiziolohichniy zhurnal (Kiev, Ukraine : 1994). 2014;60(4):105-7.
29. Roa I. Cambios morfológicos y funcionales en la glándula parótida, de ratas obesas por efecto de la administración de glutamato monosódico. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Morfológicas: Universidad de la Frontera; 2018.
30. Renzi A, Utrilla LS, Camargo LAdA, Saad WA, Luca Júnior L, Menani JV, et al. Morphological alterations of the rat submandibular gland caused by lesion of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. 2013;18(Único):157-64.

31. Nater UM, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(4):486-96. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.01.014.
32. Ain TS, Sultan S, Gowhar O, Ravishankar T, Kumar SJJoss. Obesity and salivary parameters (Flow rate, buffer capacity and salivary pH) in children of Moradabad, India. 2016;25-9. doi: 10.17354/ijss/2016/311.
33. Matczuk J, Zalewska A, #x141, ukaszuk B, #x142, omiej, et al. Insulin Resistance and Obesity Affect Lipid Profile in the Salivary Glands %J *Journal of Diabetes Research*. 2016;2016:9. doi: 10.1155/2016/8163474.
34. Pannunzio E, Amancio OMS, Vitalle MSdS, Souza DNd, Mendes FM, Nicolau J. Analysis of the stimulated whole saliva in overweight and obese school children *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2010;56:32-6. doi: 10.1590/S0104-42302010000100012
35. Rodrigues L, Mouta R, Costa AR, Pereira A, Capela e Silva F, Amado F, et al. Effects of high-fat diet on salivary alpha-amylase, serum parameters and food consumption in rats. *Arch Oral Biol*. 2015;60(6):854-62. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.02.015.
36. Sasaki KT, Delbem ACB, Santos OAMd, Shimabucoro CE, Nakamune ACdMS, Bedran-de-Castro JC, et al. Neuroendocrine alterations impair enamel mineralization, tooth eruption and saliva in rats %J *Pesquisa Odontológica Brasileira*. 2003;17:5-10.
37. Mozaffari MS, Abdelsayed R, Zakhary I, El-Salanty M, Liu JY, Wimborne H, et al. Submandibular gland and caries susceptibility in the obese Zucker rat. 2011;40(2):194-200. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00965.x.

7. Anexos

7.1. Anexo 1: Acta de Evaluación para Protocolo de Investigación



UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

ACTA N°077_2017

ACTA DE EVALUACIÓN PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN FOLIO N°051/17

Se deja constancia que, en la ciudad de Temuco, el 12 de julio del año 2017 el Comité Ético Científico de la Universidad de La Frontera, [Resolución Exenta N°1090 de fecha 12 de marzo de 2014], en sesión ordinaria N°11, presidido por el Dr. Milko Jorquera Tapia, con asistencia de sus miembros permanentes Señor(a):

NOMBRE	GRADO ACADEMICO	PROFESIÓN
Sra. Yasna Badilla Briones	Dr.	Psicóloga
Sr. León Bravo Ramírez	Dr.	Lic. en Biología
Sr. Roberto Contreras Eddinger	Lic.	Abogado
Sr. Sergio Contreras Muñoz	Dr.	Prof. de Estado en Matemática y Física
Sr. Rolando Díaz Fuentes	Dr.	Ing. Forestal
Sr. Milko Jorquera Tapia	Dr.	Ing. Acuícola
Sra. Karín Morales Manríquez	Mg.	Enfermera
Sr. Gonzalo Oporto Venegas	Dr.	Cirujano Dentista
Sra. Gloria San Miguel López	Mg.	Médico Cirujano
Sr. Paulo Sandoval Vidal	Mg.	Cirujano Dentista
Sr. Fabián Torres Ruiz	Dr.	Lic. en Ciencias Físicas

Han evaluado y sancionado el Protocolo de Investigación, presentado para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Morfológicas, según se indica:

Título	"CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES EN LA GLÁNDULA PARÓTIDA, DE RATAS OBESAS POR EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GLUTAMATO MONOSÓDICO"
Investigador Responsable	MG. IGNACIO ROA HENRÍQUEZ Alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Morfológicas
Prof. Guía	Dr. Mariano del Sol Calderón
Tipo de Proyecto	TESIS DOCTORADO EN CIENCIAS MORFOLÓGICAS
Institución	Universidad de La Frontera
N° Folio del Proyecto UFRO	051/17
Decisión	APROBADO

7.2. Anexo 2: Solicitud de Bioseguridad para Protocolos de Investigación

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA



COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO



SOLICITUD DE CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD PARA PROTOCOLOS DE INVESTIGACION

Uso interno

N°Folio	
Fecha de recepción solicitud	
Fecha emisión de Certificado	
Fecha de Seguimiento	

LANTECEDENTES DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN.

- 1.1. TÍTULO:** *Cambios morfológicos y funcionales en la glándula parótida, de ratas obesas por efecto de la administración de glutamato monosódico*
- 1.2. FONDO DE FINANCIAMIENTO E INSTITUCIÓN** Programa Doctorado Ciencias Morfológicas, Universidad de La Frontera (Financiamiento Institucional).
(Señale nombre del concurso e institución a la que postula.)
- 1.3. INVESTIGADOR RESPONSABLE:**
- | | |
|------------------------|---|
| Nombre Completo | Ignacio Javier Roe Henríquez |
| Correo Electrónico | iroa@utalca.cl |
| Departamento/Instituto | Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. |
| Facultad | Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. |
| Teléfono de Contacto | 2325470 |
| N° Celular | +56992950210 |
- 1.4 DEPENDENCIA(S) DE LA UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA DONDE SE DESARROLLARA LA INVESTIGACION** Laboratorio de Cirugía Experimental, Centro de Excelencia en Estudios Morfológicos y Quirúrgicos (CEMyQ), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.
(Señale nombre del laboratorio y unidad académica donde se realizará la investigación).
- 1.5 Nombre del Encargado del (de los) Laboratorio (s)** Tutor Prof. Dr. Mariano del Sol C. Director CEMyQ