



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

EVOLUCION MORFOHISTOQUIMICA
DEL MESENQUIMA EN GLANDULAS
LABIALES FETALES HUMANAS

María Elena SAMAR [*]
María Elsa G. de FERRARIS [**]
K. GRÜNBERG [***]
Rodolfo Esteban AVILA [****]
Sofía P. de FABRO [*****]

RESUMEN

Se estudiaron los caracteres estructurales e histoquímicos del mesénquima salival en relación con el epitelio de las glándulas labiales durante su desarrollo embrionario para correlacionar las características estructurales e histoquímicas de ambos tejidos durante su histogénesis. Se analizaron muestras de labios de fetos humanos de 8 a 32 semanas con Hematoxilina/eosina, PAS, Cason, Alcian blue, Azul de toluidina y Metenamina/plata. El proceso de histogénesis glandular comenzó entre las 8 y 10 semanas. El mesénquima que rodea a los esbozos glandulares tenía a esta edad granulaciones PAS positivas, alcianofílicas, metacromáticas y periodatoreactivas. Además, había fibrillas de colágeno periodatoreactivas, células reticulares y filetes nerviosos de calibre considerable. Las membranas basales eran PAS positivas, alcianofílicas y discontinuas.

-
- [*]: Profesora Adjunta de la Cátedra "B" de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.
[**]: Profesora Titular de la Cátedra "B" de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.
[***]: Bióloga. Jefe de Trabajos Prácticos. Cátedra "B" de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba.
[****]: Profesor Adjunto de la II Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.
[*****]: Profesora Titular de la II Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Trabajo subsidiado por CONICOR y SECYT

A las 12 semanas el mesénquima se diferenciaba en tejido conectivo laxo formando una delicada cápsula periglandular, con fibroblastos y fibrillas de colágeno. Desde las 20 a 24 semanas los acinos estaban estructural e histoquímicamente diferenciados en serosos, mucosos y mixtos. Se corrobora que el mesénquima periglandular juega un rol fundamental en los procesos de morfogénesis, puesto que identificamos histoquímicamente moléculas con funciones biológicas precisas en las interacciones epitelio-mesénquima durante la organogénesis.

Palabras claves: Fetos humanos - Glándulas labiales - Mesénquima - Histoquímica.

SUMMARY

The structural and histochemical patterns of the salivary mesenchyma were analysed in relation to the epithelium of the labial glands during the embryonic development to correlate the structural and histochemical characteristics in both tissues during the histogenesis. Samples of human fetal lips were analysed using H/E, PAS, Cason, Alcian blue, Toluidine blue and Methenamine/silver. The process of glandular histogenesis begun between 8 to 10 weeks. The mesenchyma surrounding the glandular buds had PAS positive granulations which were also alcianophilic, metachromatic and periodatoreactive. Periodatoreactive collagenous fibrillae, reticular cells and nervous fibers of considerable diameter were observed. Basement membranes were PAS positive, alcianophilic and discontinuous. At 12 weeks the mesenchyma differentiated as loose connective tissue which produced a delicate periglandular capsule with fibroblast and collagenous fibrillae. From 20 to 24 weeks the acini were structurally and histochemically differentiated as serous, mucous and mixed. It was postulated that the periglandular mesenchyma would play an important role in the morphogenetic process in relation to the histochemical identification of molecules which have a specific biological functions in the epithelium-mesenchyma interactions during organogenesis.

Key words: Human fetuses - Labial glands - Mesenchyma - Histochemistry.

INTRODUCCION

Desde la 8° hasta las 12 semanas de vida intrauterina tiene lugar la histogénesis de las glándulas salivales.

Las glándulas salivales mayores comienzan a desarrollarse a partir de la 8° semana, mientras que las glándulas menores o accesorias lo hacen en el transcurso de las 12 a 16 semanas de gestación [1].

Ferraris y col [9] observaron en fetos humanos la presencia de los primordios epiteliales de las glándulas labiales a las 10 semanas de desarrollo y sugirieron que la diferenciación morfológica y funcional se iniciaría a las 14 semanas de vida embriona-

ria. El proceso histogénético de las glándulas salivales es común a todas ellas. Aparecen proliferaciones epiteliales macizas que crecen hacia el ectomesénquima subyacente.

Simultáneamente con la diferenciación morfológica del epitelio para constituir el parénquima glandular, el mesénquima embrionario o ectomesénquima que lo rodea (llamado así por tener su origen a partir de las células de la cresta neural) se convierte paulatinamente en tejido conectivo para formar el estroma correspondiente.

Por otro lado la idea de que dos o más tejidos de diferente origen histogénético y función se asocian afectando su desarrollo final, ha sido aceptada como el principal factor en el desarrollo embrionario [12-18]. Se requieren interacciones epitelio-mesénquima para una amplia variedad de tejidos, incluyendo glándulas salivales, piel, dientes, glándula mamaria, etc. [7].

Actualmente se considera que el ectomesénquima salival presuntivo es el portador del mensaje genético que induce la proliferación y diferenciación del epitelio glandular.

También se ha postulado que la membrana basal situada entre conectivo y epitelio, constituye un factor importante para la diferenciación celular [2-21].

Bernfield y Banerjee [5] postularon que la rápida degradación de los glicosaminoglicanos de la lámina basal de los lóbulos distales de la glándula submaxilar en desarrollo, produce interrupciones en la misma, para el crecimiento y expansión epitelial.

Muchas evidencias experimentales indican que el desarrollo epitelial depende no sólo de la presencia del mesénquima. La matriz extracelular ha sido considerada como mediador en la interacción que ocurre durante el desarrollo entre estos dos tejidos [16]. Se ha propuesto recientemente, que el colágeno intersticial, y en particular el colágeno tipo I, puede controlar el comportamiento de la ramificación epitelial por estabilización de la membrana basal subepitelial [16].

Dozin [8] en un estudio morfogenético de las glándulas submaxilares y sublingual en embriones humanos demuestra la presencia de fibras nerviosas, las que serían inductoras del desarrollo glandular. Samar y col. [25-26] en estudios realizados en glándulas linguales de fetos humanos, destacaron la presencia de estos componentes nerviosos vecinos a los epitelios glandulares en diferenciación.

Con respecto a la interacción epitelio-mesénquima, Grobstein [14] propone tres mecanismos posibles:

- A) Interacción célula-célula, o sea por contacto directo.
- B) Interacción a distancia por difusión de sustancias químicas, tales como ribonucleoproteínas y proteínas.
- C) Interacción por medio de material extracelular rico en colágeno, glicosaminoglicanos y glicoproteínas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes en el presente trabajo se analizarán las características estructurales y citoquímicas del mesénquima salival durante la morfogénesis, crecimiento y diferenciación de las glándulas labiales en fetos humanos con el objeto de correlacionar las características citoquímicas y estructurales del mesénquima con el epitelio glandular labial durante su histogénesis.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron 40 muestras de la zona de labios obtenidas de un total de 20 embriones y fetos humanos provenientes de abortos espontáneos o muerte fetal por partos prematuros en buen estado de conservación y exentos de anomalías macroscópicas.

Las edades oscilaron entre 8 y 32 semanas y fueron establecidas según la longitud vértex-cóccis de acuerdo a la tabla de crecimiento por semanas de Patten [24].

Se estudiaron los siguientes etarios:

6 embriones _____	8 a 10 semanas
4 embriones y fetos _____	12 a 14 semanas
3 fetos _____	18 a 20 semanas
3 fetos _____	24 a 28 semanas
4 fetos _____	30 a 32 semanas

Las autopsias se realizaron entre una y dos horas posteriores al aborto o muerte.

El material obtenido se fijó en las siguientes soluciones de acuerdo al procedimiento experimental a seguir posteriormente: Líquido de Bouin, Líquido de Gendre, Formol/Cloruro de cetilpiridina, Formol neutro [3-23].

Se realizaron cortes seriados de cada muestra, los que fueron coloreados con las siguientes técnicas histológicas e histoquímicas: Hematoxilina/Eosina, tricrómico de Cason, Azul de toluidina a pH 3.8, PAS/Amilasa, Alcian blue a pH 2.5 y 1.0, Metenamina/plata, reacciones de bloqueo (metilación) y saponificación (demetilación) y digestión con neuraminidasa (sialidasa) [3-19-23-29].

RESULTADOS

Desde las 8 a 10 semanas de desarrollo fetal se observaron cordones celulares provenientes de la mucosa labial en diferentes estadios de diferenciación estructural.

Se identificaron algunos conductos en diferenciación en las muestras de 10 semanas.

Algunos acúmulos glandulares, sin luz aparente, ofrecían en conjunto una metacromasia débil con Azul de toluidina a pH 3,8.

En esta etapa, las estructuras acinares presentaban cubiertas celulares y gránulos PAS positivos en su zona central.

Además, los esbozos glandulares contenían un material alcianofílico finamente granular en la región apical. El mesénquima periglandular presentaba filetes nerviosos de calibre importante y abundantes capilares.

La matriz amorfa del ectomesénquima contenía numerosos gránulos glicoproteicos, PAS positivos, amilasa resistentes y parcialmente digeridos por la sialidasa, de diferentes tamaños y un depósito granular alcianofílico y metacromático alcohol resistente. Con Metenamina/plata se observaron fibras y células reticulares periodatoreactivas rodeando a los rudimentos glandulares [Figura 1A].

Las membranas basales eran PAS positivas y alcianofílicas. Mostraban en algunas zonas un complejo reticular periodatoreactivo, eran discontinuas y con indentaciones.

Entre las 12 a 14 semanas las porciones secretorias de la glándula en desarrollo presentaban una diferenciación estructural más manifiesta que en la etapa anterior.

Los cordones epiteliales se canalizaban por degeneración de sus células centrales para formar el sistema ductal y los extremos distales constituían los acinos.

El ectomesénquima, diferenciado en un tejido conectivo laxo con abundante vascularización insinuaba alrededor de la glándula en formación una delicada cápsula [Figura 1 B].

Se observó material secretorio PAS positivo, periodato reactivo, alcianofílico y metacromático en la porción apical de las piezas secretorias y en la luz de los conductos excretores.

El ectomesénquima mostró un fino puntillado PAS positivo relativamente abundante [Figura 2A].

A partir de las 20 semanas el desarrollo de los acúmulos glandulares y de los conductos excretores era mayor. El estroma se coloreaba de azul con el método tricrómico de Cason, pudiéndose identificar diferentes tipos celulares propios del tejido conectivo. Este, a esta edad, era ortocromático, con fibras reticulares PAS positivas. La sustancia fundamental dio una reacción PAS positiva más débil que en la edad anteriormente analizada.

La alcianofilia de los acinos era intensa a ambos pH.

A las 24 semanas el tejido conectivo vecino a los grupos glandulares presentaba una abundante vascularización y gruesas fibras nerviosas de localización periférica.

También observamos en esta etapa el mayor desarrollo de las fibras colágenas periglandulares las que conformaban gruesos haces que enviaban tabiques interacinarios que dividían a la glándula en pequeños lobulillos [Figura 3A].

Esto coincidía con un mayor desarrollo de los elementos parenquimatosos, con predominio de acinos mucosos y una notable evolución de los conductos [Figura 3B].

Los conductos excretores intraacinarios eran pequeños, revestidos por un epitelio cúbico simple. Otros conductos, de mayor calibre, contenía material secretorio en su interior, y estaban recubiertos por un epitelio cuboideo biestratificado [Figura 2B].

Con el método tricrómico de Cason, se observó tejido conectivo de aspecto semidenso, con gruesas fibras colágenas, que circunscribían en forma circular a los acúmulos glandulares.

Las membranas basales eran nítidas, continuas y con un material PAS positivo de distribución uniforme diferenciándose de lo que sucedía en etapas anteriores.

A las 28 semanas los cambios más llamativos se produjeron a nivel del tejido conectivo periglandular. Con el método tricrómico de Cason se observó que el tejido conectivo estaba más desarrollado que en la edad anterior.

A las 32 semanas de gestación los grupos acinares de las glándulas estaban rodeados de una cápsula conectiva bien evidente. Entre los acinos aparecían células adiposas aisladas o en acúmulos.

DISCUSION

Nuestros resultados indican que la etapa inicial del proceso histogenético de las glándulas salivales labiales comienza en los fetos humanos alrededor de las 8 a 10 semanas de desarrollo intrauterino.

Primeramente, se produce la proliferación de un cordón celular sólido desde el epitelio superficial de revestimiento, dentro del mesénquima subyacente, y luego se ramifica profusamente.

Este mesénquima relacionado con el crecimiento de los brotes epiteliales tiene un papel esencial en la morfogénesis de las glándulas salivales. La adquisición de la forma y la función durante el desarrollo embrionario involucra diferentes tipos de comportamiento celular tales como proliferación, movimientos, cambios de forma y adhesividad, como una expresión de productos moleculares específicos.

Estos eventos tienen lugar en el mesénquima compuesto por moléculas características constituidas principalmente por colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas. Estos componentes son altamente interactivos, unos con otros, y con las superficies celulares a las cuales rodean [6-10-16-22-30].

En los especímenes de 8 a 10 semanas observamos que el mesénquima presentó caracteres histológicos e histoquímicos compatibles con sustancias y estructuras involucradas en el proceso de interacción morfogenética tisular.

Así, en el mesénquima circundante a las glándulas en diferenciación fue evidente la presencia de una matriz amorfa que contenía gránulos glicoproteicos PAS positivos, amilasa resistentes y parcialmente digeridos por la sialidasa, de diferentes tamaños y un depósito granular de glicosaminoglicanos alcianofílico y metacromático.

Además, rodeando a los esbozos glandulares había un gran desarrollo de manojos de fibrillas precolágenas periodatoreactivas y numerosas células reticulares.

Las glicoproteínas, y entre ellas la fibronectina, los glicosaminoglicanos y las fibrillas de colágeno están involucradas en el

crecimiento, plegamiento y ramificación de los órganos epiteliales en desarrollo, en especial en las glándulas salivales, como lo han demostrado numerosos investigadores [6-22-30].

Los hallazgos de Fukuda y col. [10] sugieren que la presencia de manojos de colágeno intersticial es esencial para la formación de hendiduras o pliegues en los epitelios glandulares tanto in vivo como in vitro.

En cuanto a las estructuras nerviosas del mesénquima, aparecen en nuestras muestras filetes nerviosos próximos a las glándulas en desarrollo. Dozin [8] y Patten [24] postulan que las fibras nerviosas son inductoras del desarrollo glandular, pero según Ten Cate [28], no hay evidencia de que estas estructuras sirvan a modo de inductor al igual que el aumento local de la irrigación como sugieren otros autores. Ten Cate [28] opina que la vascularización y la inervación serían simultáneas al desarrollo glandular y no su causa.

A las 10 semanas, las membranas basales de los rudimentos glandulares eran PAS positivas y alcianofílicas, y en zonas aparecían discontinuas, con negativización de las reacciones histoquímicas. Las membranas basales embrionarias constituyen la interfase epitelio-mesénquima en las cuales tienen lugar los procesos de interacción y contienen principalmente glicosaminoglicanos, proteoglicanos y colágeno, moléculas que están implicadas en las interacciones tisulares que ocurren en la morfogénesis como ya se mencionó anteriormente [12-13]. Nosotros hemos observado interrupciones e indentaciones en las membranas basales de las piezas secretorias terminales (futuros acinos), mostrando depósitos de material alcianofílico PAS positivo.

Bernfield y Banerjee [4] han demostrado que en las interrupciones de la membrana basal existe íntimo contacto e interacción entre las células epiteliales y el mesénquima. En esta interacción, el rol del mesénquima es promover el crecimiento y ramificación epitelial, al degradar los glicosaminoglicanos laminares y depositar colágeno fibrilar, el cual a su vez estabiliza la degradación de la lámina [4-5-11].

A partir de las 12 a 14 semanas de gestación el ectomesénquima que circunda a las glándulas labiales ya se ha transformado en un tejido conectivo laxo con abundante vascularización, en tanto que a las 20 semanas los acinos ya están estructural y citológicamente diferenciados. El estroma muestra la presencia de fibras colágenas y se pueden diferenciar las células propias del tejido conectivo.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados nos permiten sugerir que:

1. El desarrollo de las glándulas labiales humanas comienza alrededor de las 8 a 10 semanas de vida intrauterina.
2. El ectomesénquima vecino a los rudimentos glandulares jugaría un rol fundamental en el proceso de morfogénesis, ya que se han identificado, con métodos histoquímicos, moléculas que tendrían funciones biológicas precisas en las interacciones epitelio-mesénquima durante la organogénesis.
3. La membrana basal embrionaria también influiría en la morfogénesis de las glándulas labiales puesto que se han observado zonas donde aquélla es discontinua. Esta degradación sectorial de la membrana basal promovería la ramificación epitelial.
4. Los cambios estructurales y citoquímicos observados son indicadores del ritmo de crecimiento y diferenciación de los elementos parenquimatosos glandulares y de las células y sustancia intercelular del estroma circundante.
5. La demostración histoquímica de material secretorio, en las células acinares y en la luz de los conductos, indica actividad funcional en la etapa prenatal.

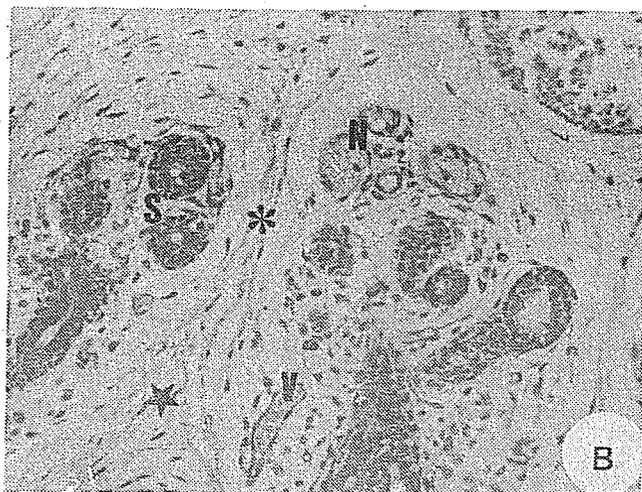
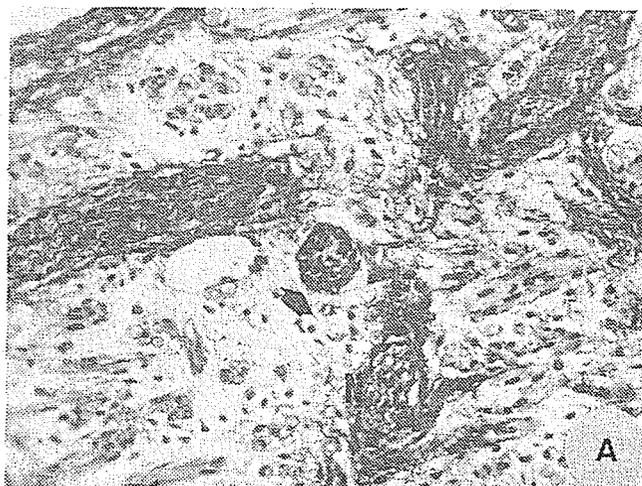


Figura 1: **A:** GLANDULAS LABIALES DE FETOS DE 8 A 10 SEMANAS DE DESARROLLO. Esbozo glandular [flecha]. Nervios [N]. En el ectomesénquima se observan fibras reticulares periodatoreactivas y células reticulares con múltiples prolongaciones irregulares. Coloración Metenamina/Plata. 400 x. **B:** GLANDULAS LABIALES DE FETOS DE 12 SEMANAS DE DESARROLLO. Porciones secretorias distales con luz evidente [S]. Nervios [N]. Vasos sanguíneos [V]. Ectomesénquima con fino material granular disperso [estrella]. Se insinúa una delicada cápsula alrededor de las glándulas en desarrollo [asterisco]. Coloración Hematoxilina/Eosina. 250 x.

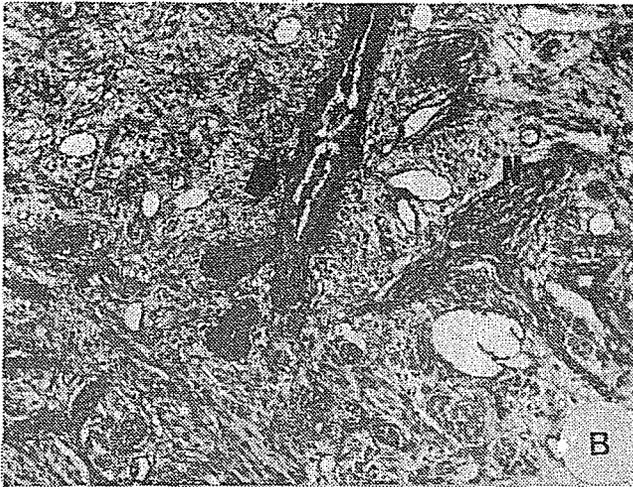
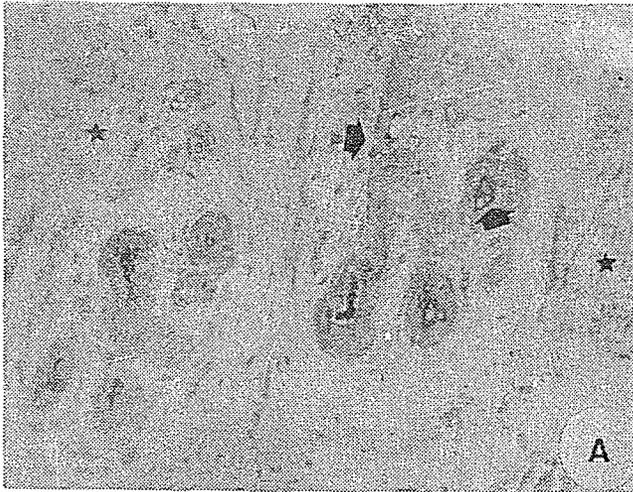


Figura 2: GLANDULAS LABIALES DE FETOS DE 12 A 14 SEMANAS DE DE SARROLLO. **A:** Membranas basales discontinuas, porción apical y contenido de las unidades secretorias PAS positivos [flechas]. Se observa un puntillado PAS positivo en el ectomesénquima [estrellas]. Coloración PAS. 100 x. **B.** Se señala una porción se cretoria con material luminal y membranas basales periodotoreac tivos [Flecha]. Nervio (N). Colóración Metenamína/plata. 100 x.

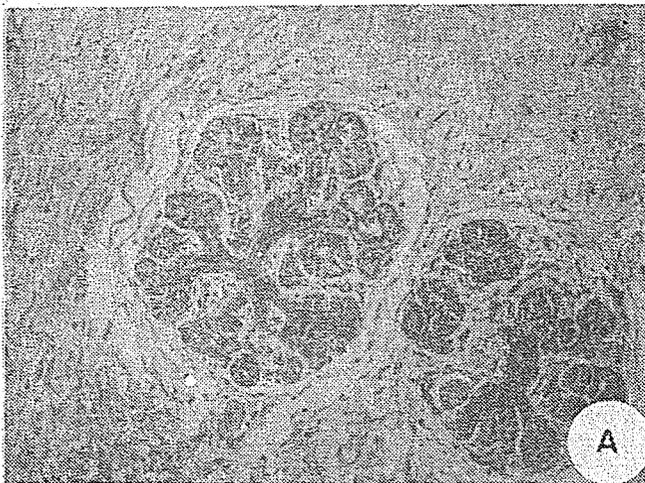


Figura 3: **A:** GLANDULAS LABIALES DE FETOS DE 20 SEMANAS DE DESARROLLO. Acinos y conductos bien desarrollados, rodeados de una cápsula conectiva. Coloración Hematoxilina/Eosina. 100 x. **B:** GLANDULAS LABIALES DE FETOS DE 24 SEMANAS DE DESARROLLO. Acinos mucosos intensamente PAS positivos [M]. Acinos mixtos con material apical PAS positivo [SM]. Coloración PAS. 250 x.

BIBLIOGRAFIA

1. ABRAMOVICH, A.: "Embriología de la región maxilofacial". 1° edición. Editorial Mundi; Buenos Aires; 1985.
2. BANERJEE, S.D.; COHN, R.H.; BERNFIELD, M.R.: "Basal lamina of embryonic salivary epithelia: Nature of glycosaminoglycan and organization of extracellular materials". J. Cell. Biol. 73: 464; 1977.
3. BARKA, T.; ANDERSON, P.: "Histoquímica". 1° edición. Editorial Atika S.A.; Madrid; 1967.
4. BERNFIELD, M.; BANERJEE, S.: "The turnover of basal lamina glycosaminoglycans correlates with epithelial morphogenesis". Devl. Biol. 90: 294-294; 1982.
5. BERNFIELD, M.R.: "Collagen synthesis during epithelio-mesenchymal interactions". Devl. Biol. 22: 213-213; 1970.
6. BOLENDER, D.: "A histochemical analysis of polyanionic compounds found in the extracellular matrix encountered by migrating cephalic neural crest cells". Anat. Rec. 196: 401-401; 1980.
7. CUTLER, E.L.: "The dependent and independent relationship between cytodifferentiation and morphogenesis in developing salivary gland secretory cells". Anat. Rec. 196: 341-1980.
8. DOZIN, A.: "Introduction a l'etude de la morphogenese des glandes sousmaxillieres et sublinguales chez l'embryon humain". Arch. Biol. 77: 459; 1966.
9. FERRARIS, M.E.; SAMAR, M.E.; AVILA, R.E.; FERRARIS, R.; FABRO, S.P. de: "Morphological and cytochemical evolution of labial glands in human fetuses". J. Dent. Res. (abstract) 67: 618; 1988.
10. FUKUDA, Y.; MASUDA, Y.; KISHI, J.I.; HASHIMOTO, Y.; TARO, H.; NOGAWA, H.; NAKANISHI, Y.: "The role of interstitial collagens in cleft formation of mouse embryonic submandibular gland during initial branching". Development. 103: 259; 1988.
11. GROBSTEIN, C.: "Transfilter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme". Exp. Cell Res. 10: 424; 1956.

12. GROBSTEIN, C.: "Inductive epithelio-mesenchymal interaction in cultured organ rudiments of the mouse". *Science* 118: 522; 1953.
13. GROBSTEIN, C.: "Epithelio-mesenchymal specificity in the morphogenesis of mouse submandibular rudiments in vitro". *J. Exp. Zool.* 124: 383; 1953.
14. GROBSTEIN, C.: "Tissue interactions in the morphogenesis of mouse embryonic rudiments in vitro. In aspects of synthesis and order in growth". 1° edición. Princeton University Press; Princeton; New Jersey; 1954.
15. HAY, E.D.: "Extracellular matrix". *J. Cell Biol.* 91: 205; 1981.
16. KRATOCHWIL, K.: "The stroma and the control of cell growth". *J. Path.* 149: 23; 1986.
17. KRATOCHWIL, K.; DZIADEK, M.; LOHLER, J.; HARBEUS, K.; JAENISCH, R.: "Normal epithelia branching morphogenesis in the absence of collagen". *Devl. Biol.* 117: 596; 1986.
18. LEHTONE, E.: "Transmission of signals in embryonic induction". *Med. Biol.* 54: 108; 1976.
19. LILLIE, R.D.; FULLMER, H.M.: "Histopathologic technique and practical histochemistry". 4° edición. Mac Graw-Hill Book Company; New York; 1976.
20. LANE SMITH, R.; BERNFIELD, M.: "Mesenchyme cells degrade epithelial basal lamine glycosaminoglycan". *Devl. Biol.* 94: 378; 1982.
21. MARTINEZ HERNANDEZ, P.S.; AMENTA, P.S.: "The basement membrane in pathology". *Lab. Invest.* 48: 656; 1983.
22. NAKANISHI, Y.; SUGURA, F.: "Scanning electron microscopic observation of mouse embryonic submandibular glands during initial branching: preferential localization of fibrillar structures at the mesenchymal ridges participating in cleft formation". *J. Embryol. exp. Morphol.* 96: 65; 1986.
23. NEZELOFF, C.; GALLE, P.; HINGLANS, N.: "Técnicas microscópicas". 1° edición. Editorial Jims; Barcelona; 1975.

24. PATTEN, B.M.: "Embriología humana". 2° edición. Editorial El Ateneo; Buenos Aires; 1986.
25. SAMAR, M.E.; FERRARIS, M.E.; AVILA, R.; FABRO, S.P. de: "Morphogenesis of the human lingual glands: Structural and cytochemical study". Acta Odontológica Latinoamericana. 3: 81; 1986.
26. SAMAR, M.E.; FERRARIS, M.E.; AVILA, R.; FABRO, S.P. de: "Histogenesis of the human lingual glands: Structural and cytochemical study". J. Dent. Res. 66: 810; 1987 (Abstract).
27. SPOONER, B.; FAUBION, J.M.: "Collagen involvement in branching morphogenesis of embryonic lung and salivary gland". Devl. Biol. 77: 84; 1980.
28. TEN CATE, A.R.: "Histología oral". 2° edición. Editorial Panamericana; Buenos Aires; 1986.
29. TROYER, H.: "Principles and techniques of histochemistry". 1° edición. Little, Brown and Company; Boston; 1980.
30. YAMADA, K.M.: "Cell interactions and development. Molecular mechanisms". 1° edición. John Wiley and Sons editors; New York; 1983.