

Tesis de Licenciatura

Participación del óxido nítrico en la secreción salival de la rata

Lomniczi, Alejandro

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lomniczi, Alejandro. (). Participación del óxido nítrico en la secreción salival de la rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000650_Lomniczi

Cita tipo Chicago:

Lomniczi, Alejandro. "Participación del óxido nítrico en la secreción salival de la rata". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000650_Lomniczi

EXACTAS
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

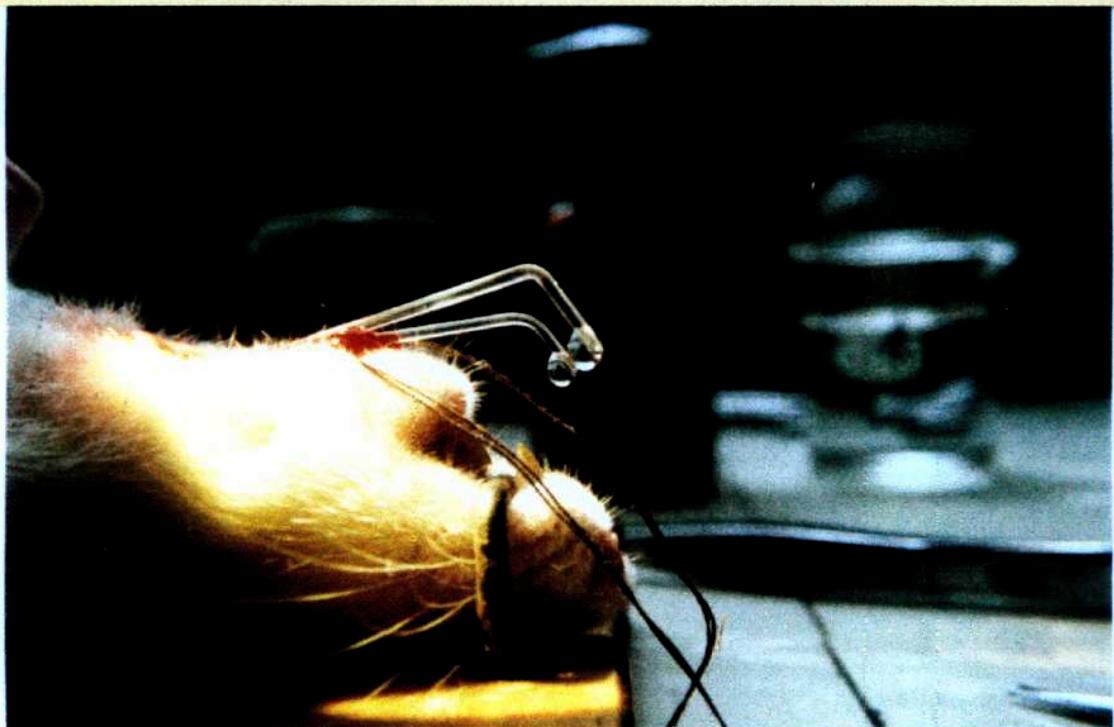
Participación del óxido nítrico en la secreción salival de la rata

ALEJANDRO LOMNICZI
FCyN BIBLIOTECA
Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ciencias Biológicas

(Tesis de Licenciatura)



Directora de Tesis: Dra. Valeria Besuhli de Rettori

Codirectora de Tesis: Dra. Angela María Suburo

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos - CONICET

Noviembre de 1997

Nº 065 05

Agradecimientos

La presente Tesis representa la culminación de un período muy importante tanto en mi formación científica como personal. Me ha dado la oportunidad de conocer la riqueza del trabajo interdisciplinario y principalmente a personas que me han ofrecido su experiencia académica y fundamentalmente su apoyo incondicional.

Es por todo esto que quiero agradecer especialmente a:

Dra. Valeria Rettori, quien desde el año 1995 me ha brindado toda su confianza para desarrollarme científicamente en su laboratorio.

Dra. Angela M. Suburo, junto a quien aprendí las técnicas de inmunohistoquímica aplicadas en este proyecto.

Dr. Juan C. Elverdín, por su hábil mano para la cirugía y su paciencia para enseñarme las técnicas operatorias.

Lic. Claudio A. Mastronardi, gracias a su aporte en la corrección de esta Tesis y especialmente gracias a las largas discusiones sobre el presente y el futuro.

Dra. Martha Fernández de Gimeno, por permitirme investigar en el instituto bajo su dirección.

Dr. Samuel M. McCann, por todas las drogas y reactivos que tan gentilmente nos ha proporcionado, y muy especialmente por su habilidad para la redacción de la publicación que se desprende de los resultados presentados en esta Tesis.

Lic. Emilce S. Díaz, por haber participado en algunos de los experimentos incluidos en este trabajo.

A mi hermano Carlos, por ayudarme en el “escaneo” de las fotografías y la impresión de las numerosas copias de la Tesis.

A mi novia y compañera Adriane, por soportarme durante tantos años.

Finalmente, debo expresar mi ilimitado agradecimiento por el apoyo y la confianza de mis padres (Otto y Helga) brindados durante todos estos años de estudio.

Abreviaturas

CAM: calmodulina

cAMP: adenina monofosfato cíclico

DEM: dosis efectiva mínima

EDRF: factor relajante derivado del endotelio

EGTA: etilen glicol (β -aminoethyl) N,N,N',N', ácido tetraacético

GC: guanilato ciclasa

cGMP: guanina monofosfato cíclico

GSM: glándula submaxilar

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADPHd: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa

L-NAME: N^G-nitro arginina metil éster

L-NMMA: N^G-monometil L arginina

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

cNOS: óxido nítrico sintasa constitutiva

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

PKG: proteína kinasa G

Resumen

La glándula submaxilar (GSM) está compuesta por túbulos y acinos los cuales secretan varias proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos, electrolitos y agua. La actividad secretora está controlada por el sistema nervioso autónomo, y es especialmente mediada por nervios que inervan los acinos y secretan acetilcolina. Este neurotransmisor se une y activa los receptores muscarínicos evocando grandes cantidades de fluido. La substancia P fue encontrada también en los nervios parasimpáticos, colocalizada con la acetilcolina y evoca la secreción salival a través de la activación de receptores del tipo NK.

La óxido nítrico sintasa (NOS) ha sido descripta en el control del funcionamiento de varios órganos a través de su distribución en los nervios no-adrenérgicos no-colinérgicos del sistema nervioso autónomo, lo cual lleva a la hipótesis que el óxido nítrico podría modular la secreción salival en la GSM de la rata.

Es por eso que se investigó la distribución de la NOS en la GSM de ratas adultas normales a través del método indirecto de la NADPH diaforasa y por inmunohistoquímica usando antisueros dirigidos contra la NOS neuronal (Ca^{++} dependiente) y la NOS inducible (Ca^{++} independiente). Luego se determinó el efecto de la inhibición de la NOS por análogos de la arginina como el L-NMMA, en la secreción salival estimulada por metacolina y substancia P, así como el efecto sobre la actividad de la enzima.

Los resultados demostraron que la NOS está ampliamente distribuida en varias partes de la GSM, especialmente en los tipos celulares pertenecientes a los conductos glandulares. Se pudo medir actividad NADPH diaforasa en los conductos estriados, contorneados granulares y excretores, lo cual se correlacionó con la inmunomarcación con los distintos antisueros utilizados para detectar las diferentes isoformas de la NOS.

La secreción salival se comportó de forma dosis dependiente tanto para la metacolina como para la substancia P. El L-NMMA redujo significativamente la secreción salival estimulada por cualquiera de estos agentes sialogogos, a diferencia de los controles que no sufrieron modificación alguna en la secreción salival en ausencia de L-NMMA. Se midió una inhibición significativa de la actividad de la NOS de la GSM en los animales tratados con L-NMMA.

Estos resultados abren un nuevo camino en el estudio de nuevas vías en la regulación de la secreción salival.

Introducción

La saliva representa el primer fluido corporal que entra en contacto con el alimento que ingerimos. La misma consiste en un conjunto de secreciones descargadas hacia la cavidad oral desde glándulas salivales mayores y menores. Esta mezcla de fluidos contiene algunas enzimas como amilasas y ribonucleasas. El rol de estas enzimas en la digestión es limitada, a excepción de la lipasa lingual secretada por la glándula de Ebner, que cumple una función digestiva en los recién nacidos, donde la secreción de la lipasa pancreática es muy baja.

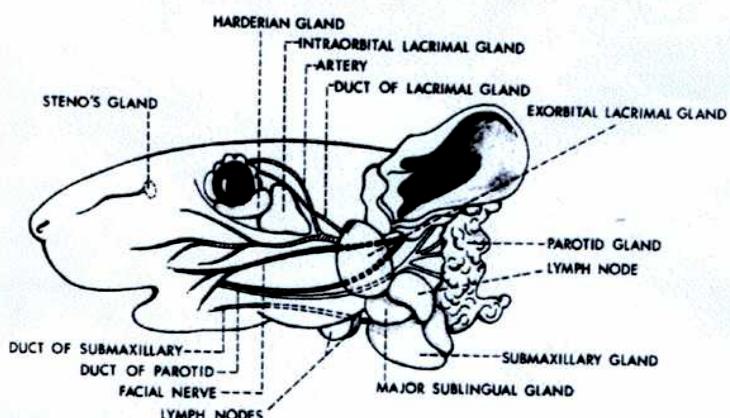
Dentro de las funciones más reconocidas de la saliva están la de humedecimiento de la mucosa oral y el alimento ingerido, para la formación del bolo alimenticio, la fonación, la acción germicida, y el mantenimiento general de la salud e integridad de los tejidos duros y blandos de la cavidad oral. Otras funciones importantes son la formación de un película protectora sobre los dientes por acción de “proteínas salivales ricas en prolina que unen calcio” (Bennick y col., 1983) y su participación en la disminución de la temperatura corporal por evaporación en algunas especies.

Además, las glándulas salivales contienen y secretan un gran número de substancias fisiológicamente activas, incluyendo factores de crecimiento, serinproteasas vasoactivas y péptidos regulatorios, los cuales ejercerían una función biológicamente activa aunque no necesariamente relacionada con los procesos digestivos en forma directa.

Anatomía macroscópica

Las glándulas salivales se dividen generalmente en dos grupos: las glándulas salivales mayores (parótida, submaxilar y sublingual) cada una de las cuales secreta fluido por medio de un conducto secretor único (monostomáticas), y las numerosas glándulas menores, que son polistomáticas y consisten en pequeños paquetes glandulares presentes en las mucosas labial, palatina, bucal, lingual y sublingual. Las parótidas son topológicamente constantes en la mayoría de los mamíferos, se ubican ventralmente al oído externo, extendiéndose detrás de la rama ascendente de la mandíbula. Las glándulas submaxilares se encuentran generalmente caudales a la

mandíbula pero son mucho más variables en posición, tamaño e histología que las parótidas. Las glándulas sublinguales, usualmente situadas en el piso de la cavidad oral, están conformadas por dos partes siendo monostomática solo una de ellas (Lorber, 1991) (Esquema 1).



Esquema 1: ubicación anatómica de las glándulas en la cabeza del ratón.

La cantidad total de saliva secretada en el hombre es de alrededor de 1 a 1,5 l/día (1ml/min), en mayor parte producida en el momento de la comida. El nivel de secreción salival en reposo es menor de 0,025 ml/min. En reposo, las parótidas secretan aproximadamente el 25%, las submaxilares el 70% y las sublinguales el 5% de la secreción total de saliva.

En la mayoría de los mamíferos las glándulas mayores están muy bien inervadas por fibras secretomotoras simpáticas y parasimpáticas. Las fibras preganglionares parasimpáticas surgen ipsilateralmente del núcleo reticulado parvocelular. Los nervios que inervan la parótida acompañan el nervio glosofaríngeo hasta el ganglio ótico, o alcanzan la glándula por vía de una rama bucal del nervio trigémino. Las fibras destinadas a las sublinguales y las submaxilares generalmente acompañan al nervio facial y la cuerda timpánica, pero algunos nervios también alcanzan estas glándulas por una rama bucal del nervio trigémino. Las fibras simpáticas postganglionares se originan en el ganglio cervical superior. Los cuerpos celulares de los nervios sensoriales de las submaxilares están localizados en los ganglios vagal proximal y geniculado y en la zona mandibular del ganglio trigeminal (Chibuzo y col., 1980). Las fibras aferentes de la parótida se originan en neuronas del ganglio trigeminal ipsilateral (Sharkey y col., 1984).

Anatomía microscópica

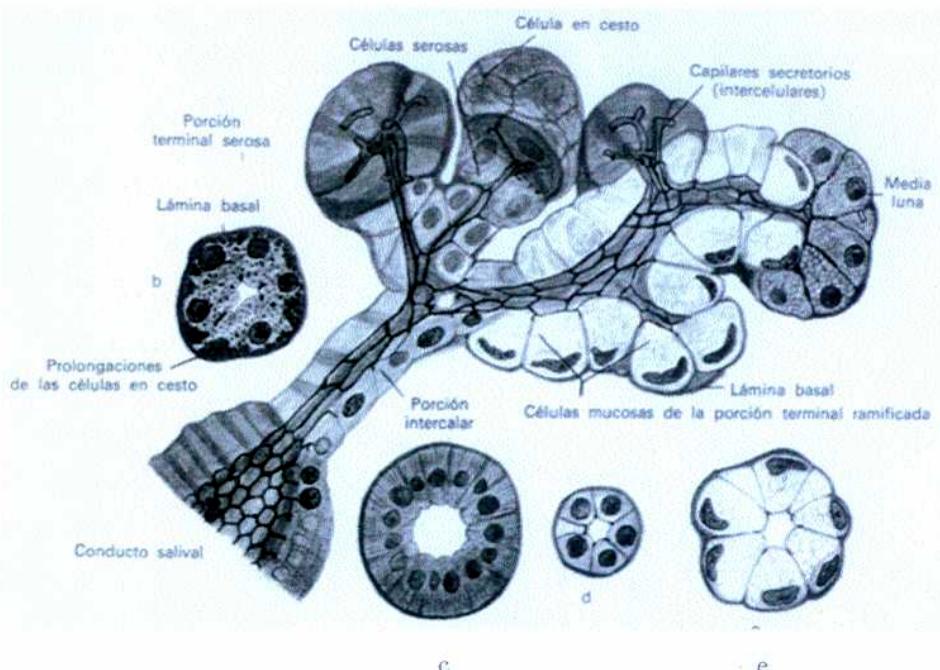
Del mismo modo que en la mayoría de las glándulas exócrinas, el parénquima de las glándulas salivales contiene conductos y porciones secretoras. El parénquima está organizado en lóbulos separados por septos de tejido conectivo. Los septos contienen los grandes conductos excretores, vasos sanguíneos, manojos nerviosos y pequeños ganglios.

La porción secretoria terminal suele variar en tamaño y forma, inclusive dentro de un mismo lóbulo, con las porciones periféricas usualmente más o menos globulares y las porciones centrales más pequeñas y lobadas. Las porciones secretorias terminales consisten en un pequeño túbulo que finaliza en un acino lobulado característico (Esquema 2). Las células que constituyen las dos partes de las porciones terminales tienen diferencias citológicas, citoquímicas y se diferencian en su inervación. Las porciones típicamente mucosas son tubulares, mientras que las serosas son mayormente acinosas.

Mientras que las porciones terminales de la glándula parótida de la mayoría de los mamíferos son histológicamente muy similares, no se puede decir lo mismo de las porciones terminales en las glándulas submaxilares, donde en muchas especies podemos encontrar dos tipos celulares secretorios diferentes, hasta en el mismo acino. En el humano, por ejemplo, la glándula submaxilar posee aproximadamente un 90% de acinos seromucosos, mientras que los restantes son túbulos mucosos y demilunas seromucosas (Esquema 2). Los términos “mucoso”, “seroso” y “seromucoso” se utilizan en relación a que proporción de las proteínas secretorias de los gránulos de secreción están constituidos por mucinas contenido 70-80% de carbohidratos. La cantidad de carbohidratos se refleja en el tamaño y las propiedades en la tinción (o densidad electrónica) que presentan los gránulos de secreción.

El sistema de conductos de las glándulas salivales mayores se clasifica en conductos intercalados, estriados y excretores. Los intercalados y estriados son intralobulares, mientras que los excretores yacen en el estroma interlobular. El sistema de conductos se encuentra muy reducido en las glándulas salivales menores (Esquema 2). En las glándulas submaxilares de los roedores hay un marcado dimorfismo sexual manifestado en el mayor o menor desarrollo de los conductos granulares ubicados entre

el acino y el conducto estriado. En el ratón esta diferenciación es estimulada por testosterona y tiroxina (Gresik y col., 1981).



Esquema 2: reconstrucción de la porción terminal de una glándula submaxilar con su conducto. b, Corte transversal a través de una porción terminal puramente serosa; c, corte transversal a través de una porción terminal puramente mucosa; d, corte transversal de un conducto intercalar; e, corte transversal a través de un conducto salival. (Reconstruido por Vierling, tomado de Braus).

En la mayoría de las glándulas salivales hay células mioepiteliales que usualmente rodean a la porción secretoria terminal, y en el menor número a los conductos intercalados. Aquellas que rodean los acinos son estrelladas, mientras que las asociadas a los conductos son elongadas y orientadas paralelamente al eje del conducto. Estudios ultraestructurales y funcionales mostraron que las principales vías para el control mioepitelial dependen del sistema nervioso simpático, aunque la mayor parte de las glándulas que poseen estos tipos celulares también tienen inervación parasimpática. La contracción de las células mioepiteliales causa un transiente aceleramiento en la tasa de liberación de saliva hacia la cavidad oral y su principal función aparente es la prevención de la distensión del acino, que tiende a ocurrir durante la secreción como consecuencia del aumento de la presión intraluminal (Garrett y col., 1979).

Algunos estudios en glándula salival de rata (Ohtani y col., 1983) han revelado que las arterias en los septos interlobulares dan lugar a dos sistemas circulatorios separados: uno alimentando al parénquima lobular y el otro al epitelio del conducto excretor. Las arteriolas que alimentan la sección lobular terminan en una red capilar que

rodean las porciones secretoras terminales y los conductos granulares. Estas redes capilares son drenadas por cortas vénulas porta, que alimentan una densa red capilar en la base del epitelio de los conductos estriados. Esta última red es drenada por vénulas que se unen con venas del septo interlobular. De esta manera el epitelio del conducto estriado es alimentado por sangre que circuló primero por el epitelio secretor. Los conductos excretores poseen una red capilar subepitelial muy densa que es alimentada por sangre proveniente de arteriolas del estroma interlobular.

Sobre el óxido nítrico

Hace aproximadamente diez años se consideraba al óxido nítrico (NO) como uno de los gases nocivos de nuestra atmósfera como consecuencia directa del escape de los motores de combustión interna o el humo de los cigarrillos.

En 1980 Furchtgott y Zawadzki demostraron que el endotelio era esencial para la acción vasodilatadora de la acetilcolina sobre anillos arteriales *in vitro* (Furchtgott y col., 1980). La remoción del endotelio prevenía la acción vasorelajante de la acetilcolina e incluso producía una vasoconstricción. La estimulación de las células endoteliales producía la liberación de una substancia que Furchtgott llamó “factor relajante derivado del endotelio” (EDRF). El EDRF era una substancia altamente inestable y de una vida media de aproximadamente segundos en soluciones buffer. Su acción era destruida por oxihemoglobina y preservada por la superóxido dismutasa, demostrando que los aniones superóxido podían inactivarla.

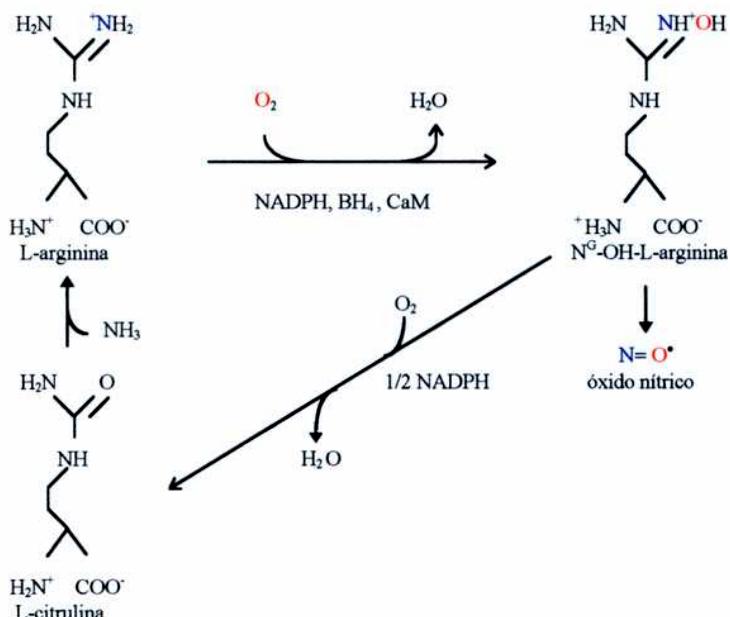
Se encontraron muchas otras substancias vasoactivas endógenas que actuaban a través de la liberación de EDRF para producir la vasodilatación dependiente del endotelio. Entre ellas bradiquinina, histamina, adeninucleótidos, trombina, substancia P y 5-hidroxitriptamina.

La naturaleza química del EDRF no fue descubierta hasta 1987. Furchtgott e Ignarro independientemente concluyeron que el EDRF y el NO tenían acciones biológicas muy similares. Ese mismo año Moncada y sus colegas, utilizando bioensayos simultáneos y ensayos de quimioluminiscencia, demostraron que el NO era responsable de la actividad biológica del EDRF (o sea que EDRF era el NO) y que su precursor era la L-arginina (Palmer y col., 1988).

Un punto importante para llegar a esta conclusión fue la similaridad de las acciones del EDRF y los nitrovasodilatadores. Se sabía ya que estas drogas eran metabolizadas a nitrosothioles y/o NO en las células blanco (Needleman y col., 1976; Ignarro y col., 1981). De tal manera demostraron que los dos, tanto el EDRF/NO como los nitrovasodilatadores actuaban vía la estimulación de la guanilato ciclase soluble y la subsecuente formación de cGMP. El cGMP activa ciertas proteínas quinasas que determinan la defosforilación de las cadenas de miosina y consiguientemente la relajación del músculo. Esta es la forma como la célula endotelial regula el tono de la célula muscular lisa de los vasos sanguíneos.

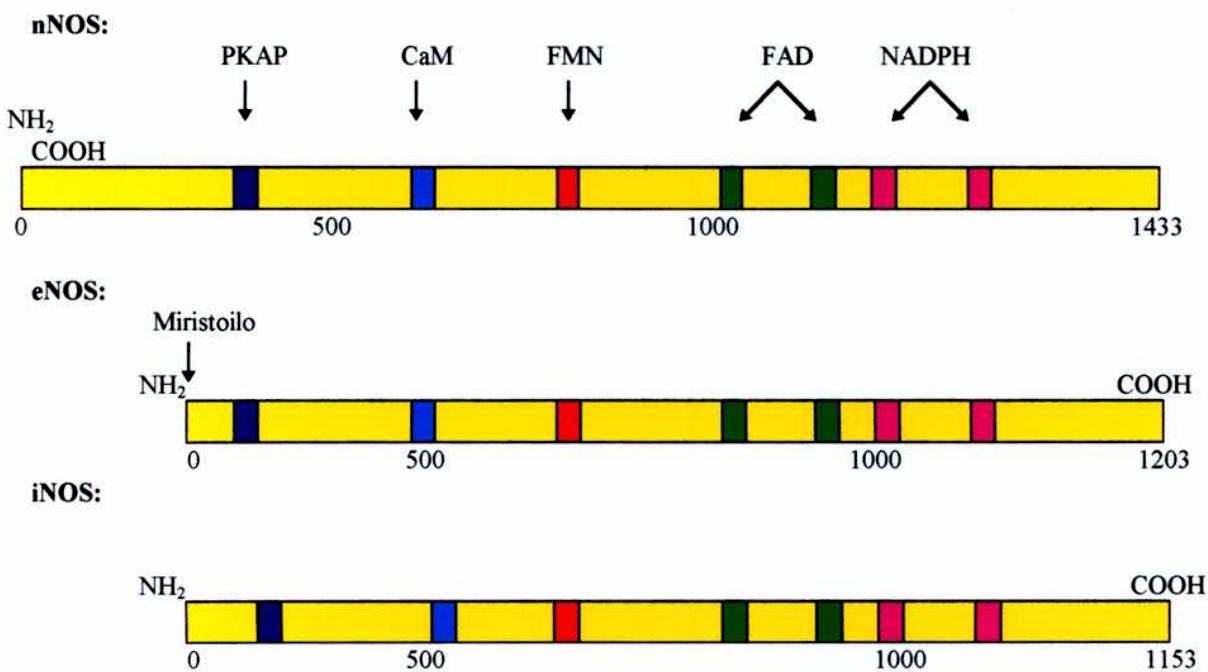
Biosíntesis y liberación del NO

La biosíntesis del NO se puede ver en el esquema 3. El primer paso es la hidroxilación del nitrógeno del grupo guanidino de la L-arginina. Esta reacción es catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS). En el proceso se incorpora oxígeno molecular y se produce NO y citrulina en cantidades equimolares. La reacción que es una oxidación por cinco electrones, requiere piridin nucleótidos reducidos, biopterinas reducidas y calmodulina. Es relevante remarcar que el producto secundario de la reacción, la citrulina, es reciclada nuevamente a L-arginina tan solo incorporando un nitrógeno (Hecker y col., 1990).



Esquema 3: camino biosintético del NO desde la L-arginina, y reciclaje de la L-citrulina.

Se han descripto varias isoformas de la NOS (Nathan, 1992; Lowenstein y col., 1994)(Esquema 4). Dos isoformas constitutivas y Ca^{++} dependientes (cNOS) presente en el endotelio (eNOS) y en le tejido nervioso (nNOS), y una isoforma inducible (iNOS) formada en células inmunes activadas, en músculo liso vascular y en tejido nervioso y glandular. Las isoformas constitutivas sintetizan pequeñas cantidades de NO. Cuando a estos tipos celulares reciben el estímulo apropiado, acetilcolina (células endoteliales) o glutamato (células cerebrales), la activación de los receptores lleva al aumento del calcio intracelular, lo cual produce la activación de la cNOS con la consecuente producción de NO. Esta pequeña y lipofílica molécula puede viajar libremente a través de las membranas celulares lo cual le permite ejercer sus acciones sobre las células vecinas.



Esquema 4: estructura primaria de las isoenzimas conocidas de NOS humanas.

Los activadores de las isoformas constitutivas (nNOS y eNOS) son substancias liberadas por los nervios, como acetilcolina, bradiquinina y aminoácidos excitatorios, o por las plaquetas (trombina, ADP y serotonina). Entre los activadores farmacológicos encontramos a los ionóforos de calcio, péptidos formilados y ésteres de forbol. Se ha reportado recientemente que la isoforma endotelial de la NOS sufre modificaciones postranscripcionales luego de la estimulación de la célula endotelial con un agonista

Busconi y col., 1993). Estas modificaciones consisten en la fosforilación de la enzima y su consecuente translocación desde la membrana hacia el citosol.

La iNOS es muy diferente de las isoformas constitutivas porque es funcionalmente independiente de calcio. La característica más importante de la iNOS, es que esta libera grandes cantidades de NO continuamente: la cantidad de NO que es liberado por unidad de tiempo por un macrófago activado es miles de veces mayor que la liberada por cualquiera de las otras isoformas. El rol de NO en células inmunes activadas es actuar como molécula letal. Su liberación en cantidades masivas produce un daño oxidativo que destruye a la célula víctima. Tanto las toxinas bacterianas como el interferón gama y la interleukina-1 estimulan la expresión génica de la iNOS.

Antecedentes tomados en cuenta para realizar este trabajo

En el año 1995 el grupo de Lohinai describió la distribución de la actividad de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforasa (NADPHd) y nNOS por inmunocitoquímica en la GSM del gato. En ese trabajo se reportó la presencia de actividad NADPHd en las neuronas que inervan los acinos glandulares, en el epitelio ductal y vasos sanguíneos. Pero solo se encontró inmunoreactividad positiva para la nNOS en las neuronas y no en los vasos sanguíneos o los conductos glandulares. A mediados de 1996 el mismo grupo estudió el efecto de dadores de NO e inhibidores de la NOS sobre el flujo sanguíneo y resistencia vascular en la GSM del gato. Encontraron que los dadores de NO disminuyeron significativamente la resistencia vascular, pero no variaron el flujo sanguíneo. Por otra parte los inhibidores de la NOS aumentaron la presión y la resistencia vascular con la consiguiente reducción del flujo sanguíneo en la GSM. De estos resultados se desprende que el óxido nítrico, a través de los nervios nitridérgicos, estaría regulando el tono vascular de la GSM del gato (Lohinai y col., 1996).

En los últimos años se ha encontrado una importante participación del NO en la fisiología de varios órganos. Entre ellos el páncreas, anatómicamente y funcionalmente muy parecido a la GSM, donde se encontró una colocalización de NOS y NADPHd en células y fibras nerviosas que inervan acinos, conductos excretores, vasos sanguíneos e islotes de Langerhans. También se encontró NADPHd en los islotes y células epiteliales de los conductos, pero no así su corelato en la marcación con anticuerpos específicos

contra la NOS neuronal o endotelial. Esto sugiere la presencia de una nueva isoforma de NOS en estos tipos celulares (Worl y col., 1994).

Por medio de técnicas de hibridización *in situ*, se pudo detectar el mRNA de la iNOS en el riñón de la rata. Este estaba presente en el túbulo proximal, en la parte cortical y medular del asa ascendente gruesa de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo colector en su parte cortical y medular (Ahn y col., 1994). A su vez se detectó actividad NOS en túbulos proximales aislados de rata. Esta actividad aumentó por el pretratamiento “*in vivo*” con lipopolisacáridos bacterianos (Mayeux y col., 1995).

La descripción de la presencia de diferentes isoformas de NOS y de su actividad en diferentes órganos anatómicamente similares a la GSM, llevó a plantearnos la hipótesis de que el NO podía modular la secreción salival. Con este fin nos propusimos determinar la presencia de diferentes isoformas de la NOS en la GSM de la rata y la participación que esta o estas enzimas tienen en los mecanismos que determinan la secreción salival.

Hipótesis:

El óxido nítrico podría modular la secreción salival en la GSM de la rata.

Objetivos:

Primer objetivo: determinar la presencia de distintas isoformas de NOS en la GSM de la rata.

Segundo objetivo: estudiar el papel del NO en la secreción salival.

Tercer objetivo: medir la actividad de la NOS en la GSM de la rata.

Materiales y Métodos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 250 a 300 g de peso. Los animales se mantuvieron en jaulas metálicas con un ciclo de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad (luz de 6 a 20 hs) a temperatura controlada de entre 22 a 25 °C con libre acceso a comida y agua. La comida fue removida 14 hs antes de los experimentos.

Metodologías referentes al primer objetivo: las porciones centrales de las GSM se fijaron en una mezcla de paraformaldehído y ácido pírico en 0.16 M de buffer fosfato por 6 a 8 hs a temperatura ambiente. Los especímenes luego se sumergieron en sacarosa 15% en buffer fosfato salino (PBS) con 0,01% de azida sódica por 24 horas. Se obtuvieron cortes seriados de 14 μ m de espesor con un criostato y se montaron en slides cubiertos con gelatina como fue descripto anteriormente (Suburo y col., 1994). La presencia de NOS se confirmó revelando la actividad (NADPHd), una propiedad característica de todas las isoformas conocidas de NOS (Vincent y col., 1992) o por la detección de inmunoreactividad específica con antisueros de conejo contra las isoenzimas neuronal o macrofágica de la NOS (Springall y col., 1992). La actividad NADPHd se detectó por medio de la incubación de las muestras en una mezcla de NADPH (1 mg/ml) y nitroblue tetrazolium (0,1 mg/ml) en PBS conteniendo 0,3% Tritón X-100. Las inmunotinciones se hicieron en secciones delipidizadas (tratadas con soluciones crecientes de etanol 70% a 100% y dos cambios en xileno), donde la actividad endógena de peroxidasa fue bloqueada con 0,03% de peróxido de hidrógeno (15 minutos en etanol). Los antisueros se describen en la Tabla 1 y fueron incubados sobre los cortes durante 48 horas a 4°C. Las secciones se lavaron luego en PBS y se incubaron sucesivamente con antisuero de cabra anti IgG de conejo biotinilado y complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector Elite) preparado fresco. La actividad peroxidasa se reveló usando diaminobenzidina amplificada con níquel (Shu y col., 1988). Como controles se utilizaron muestras incubadas con suero preinmune, o con omisión de lo antisueros primario o secundario.

Tabla 1: antisueros utilizados en la inmunohistoquímica.

ANTIGENO	Código	Derivado de
NO sintasa neuronal	NOS-N	de cerebro de rata
Péptido sintético LPLLLQANCHDPELFQIPPEL	NOS-NP	la secuencia de DNA clonada de la isoforma neuronal
Péptido sintético QNGSPQLLTGTAQNVPESLDKHLHVT	NOS-M	la secuencia de DNA clonada de la isoforma de macrófago

Metodologías referentes al segundo objetivo: para estimar la respuesta secretoria, las ratas fueron anestesiadas con cloralosa (100 mg/kg) i.v. luego de una leve inducción con éter. Se canuló la vena femoral con un catéter de poliestireno (catéter P-40, Rivero y Cia, Argentina) para poder inyectar los diferentes agentes farmacológicos utilizados en este estudio. Por medio de una incisión media en el cuello se entubó la tráquea y se expusieron bilateralmente los conductos de las glándulas submaxilares para luego canularlos con finas cánulas de vidrio (Foto 1).



Foto 1: finalización del proceso de canulación de la vena femoral, entubamiento de la tráquea y canulación de los conductos glandulares.

No se observó secreción basal de saliva. La saliva secretada luego de la administración de los diferentes sialogogos fue colectada y cuantificada por peso. Se obtuvieron curvas dosis-respuesta para los distintos sialogogos por medio de la inyección secuencial, vía la vena femoral, de dosis crecientes de metacolina (0,3, 1, 3 y 10 µg/kg) o substancia P (0,3, 1 y 3 µg/kg), según técnica descripta previamente por Elverdin y col., 1995. Luego, en el mismo animal, se repitió la misma curva dosis-respuesta pero en presencia de diferentes inhibidores de la NOS.

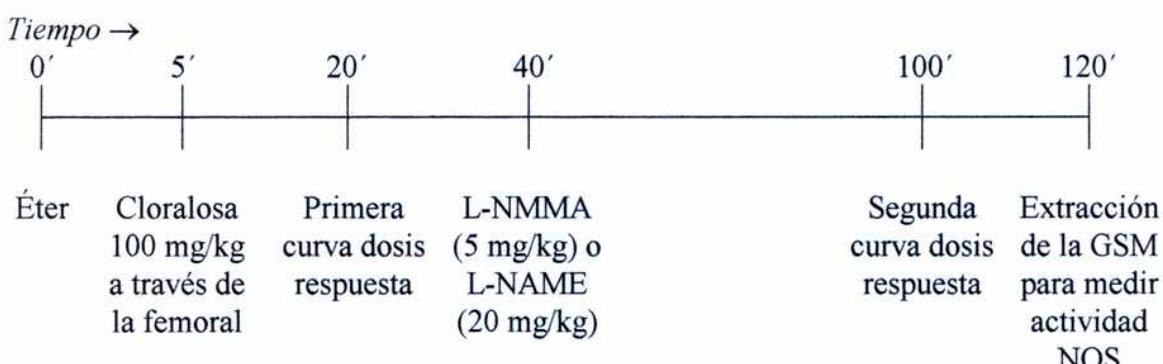
La respuesta secretora a los sialogogos utilizados no fue en ningún caso mayor a los tres minutos, se esperó dos minutos más para la inyección de la siguiente dosis.

Para investigar el rol del NO en la secreción salival, las ratas fueron inyectadas, vía femoral, con diferentes inhibidores de la NOS. Para ello se utilizaron los inhibidores competitivos N^G-nitro arginina metil éster (L-NAME) en una dosis de 20 mg/kg o N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA) en una dosis de 5 mg/kg. La inyección de estos inhibidores fue una hora antes de llevar a cabo la segunda curva dosis-respuesta en cada animal.

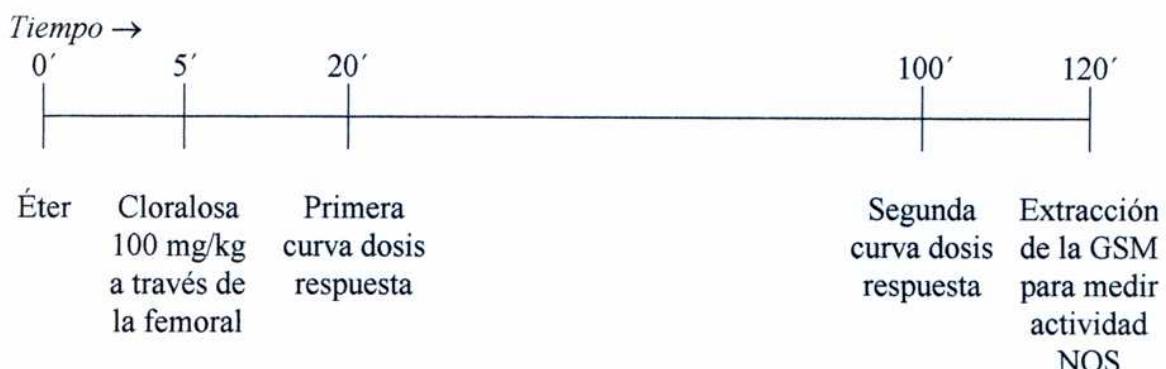
Los resultados se expresaron como µl de saliva secretada (media ± error standard), asumiendo la densidad de la saliva de 1 g/ml. La evaluación estadística se hizo calculando las diferencias antes y después de la administración de los diferentes inhibidores de la NOS en cada animal. Cada punto fue evaluado por el test de Student pareado. Los valores de P<0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Esquema de los experimentos dosis-respuesta con metacolina o substancia P:

1.- *Comparación entre las curvas antes y después de la inhibición de la NOS:*



2.- Comparación entre dos curvas sucesivas sin inhibición de la NOS:



Este segundo grupo experimental permite descartar que las diferencias entre una y otra curva se deban a la inhibición de la NOS y no a modificaciones sufridas por la preparación durante el transcurso del experimento.

Metodologías referentes al tercer objetivo: se determinó la actividad de la NOS en la GSM por el método de conversión de [¹⁴C]-arginina en [¹⁴C]-citrulina por acción de esta enzima.

Como la arginina es convertida en NO y citrulina en cantidades equimolares por acción de la NOS, se midió la formación de citrulina marcada a partir de [¹⁴C]-arginina en el homogenato crudo del tejido. Las GSM extraídas fueron congeladas por 24 a 48 hs a -70 °C, luego se homogenizaron en 1 ml de buffer HEPES (20 mM), con el agregado de dithiotretilol (1mM) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Todo el procedimiento se llevó a cabo a una temperatura aprox. de 0°C. Para medir la actividad NOS dependiente de Ca⁺⁺, este catión fue agregado a una concentración final de 0,45 mM. Se guardaron muestras de 20 µl de cada homogenato para la posterior determinación de proteínas por el método de Lowry. Al homogenato se le agregó la [¹⁴C]-arginina (aprox. 200.000 cpm/tubo) y se incubó durante 15 minutos en un baño termostático tipo Dubnoff a 37 °C y 50 ciclos por minuto oxigenado con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Despues de la incubación se centrifugaron los homogenatos (10.000 x g por 10 minutos y a 4 °C), y los sobrenadantes se sembraron en columnas de intercambio catiónico (con 1 ml de Dowex 50W-X8), que retiene la arginina y deja pasar la citrulina, y se midió la cantidad de [¹⁴C]-citrulina eluida por cada columna, en contador de centelleo líquido. Utilizando medios con y sin calcio, se determinó la actividad de las isoformas de NOS constitutivas e inducible (Weiner y col., 1994). Para

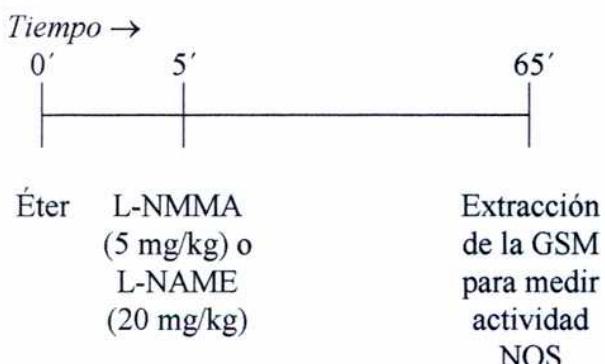
ello fue necesario primero establecer la dosis de etilen glicol-bis (β -aminoetil éter) N,N,N',N'-acido tetraacético (EGTA) necesaria para quesar el calcio que queda en el homogenato.

En la saliva existen cantidades apreciables de urea, lo cual es indicativo de la presencia de un ciclo de la urea activo en la GSM. Dado que la arginina también sustrato de la arginasa, fue necesario utilizar L-valina para inhibir dicha enzima. En estas condiciones la citrulina medida proviene exclusivamente de la acción de la NOS. Con este propósito, se realizó una curva de inhibición de la formación de citrulina a distintas dosis de L-valina.

Para la medición de la actividad de la NOS se utilizaron las glándulas provenientes de los animales utilizados para la medición de la secreción salival bajo diferentes condiciones experimentales. Se efectuaron además los siguientes controles:

Tales controles para la medición de la actividad de la NOS fueron:

3.- Efecto de inhibidores de la NOS:



4.- Control de cloralosa:



5.- *Actividad basal:* Animales sin tratamiento alguno, cuyas glándulas fueron extraídas para medir la actividad de la NOS. Estos animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Estadística: los datos fueron analizados por análisis de la varianza de una vía y el test de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls para réplicas desiguales. Las diferencias con valores de $P<0,05$ se consideraron significativas.

Resultados

Distribución de diferentes isoformas de NOS en la GSM de la rata

La actividad NADPHd fue detectada en las siguientes estructuras: fibras nerviosas que rodean vasos sanguíneos, acinos y conductos; membrana apical de los conductos excretores y la porción inicial del conducto estriado; citoplasma de conductos excretores, estriados y túbulos contorneados granulares (Fotos 2 y 3).



Foto 2: en esta foto se aprecia la actividad NADPHd (característica de todas las isoformas de NOS) en un corte de GSM de rata.

A) Actividad NADPHd en la membrana apical y citoplasma del conducto estriado.

B) Actividad NADPHd más difusa en el citoplasma de túbulos contorneados granulares.



Foto 3: a mayor aumento se puede apreciar un corte transversal de un conducto estriado teñido con NADPHd. Nótese la intensa actividad presente en la membrana apical y la reacción menor en el citoplasma basal.

La presencia de la NOS pudo ser demostrada tanto por actividad NADPHd como por inmunoreactividad en diversos segmentos del sistema de conductos de la GSM. Esta actividad era masiva en comparación con la de las fibras nerviosas o los macrófagos. En los conductos se pudo diferenciar entre NOS asociada a membranas e inmunoreactividad citoplasmática. La NOS asociada a la membrana fue demostrada por la actividad NADPHd y por inmunoreactividad contra los tres diferentes antisueros NOS-M > NOS-N > NOS-NP (ver fotos 3 a 8). La NOS citoplasmática fue demostrada por la actividad NADPHd, pero su inmunoreactividad estuvo restringida a solo dos antisueros NOS-N y NOS-M (ver fotos 4 a 9).



Foto 4: corte revelado con el anticuerpo NOS-NP (dirigido contra un péptido correspondiente a la NOS neuronal). Se puede apreciar la marca exclusivamente en las neuronas que inervan los acinos.

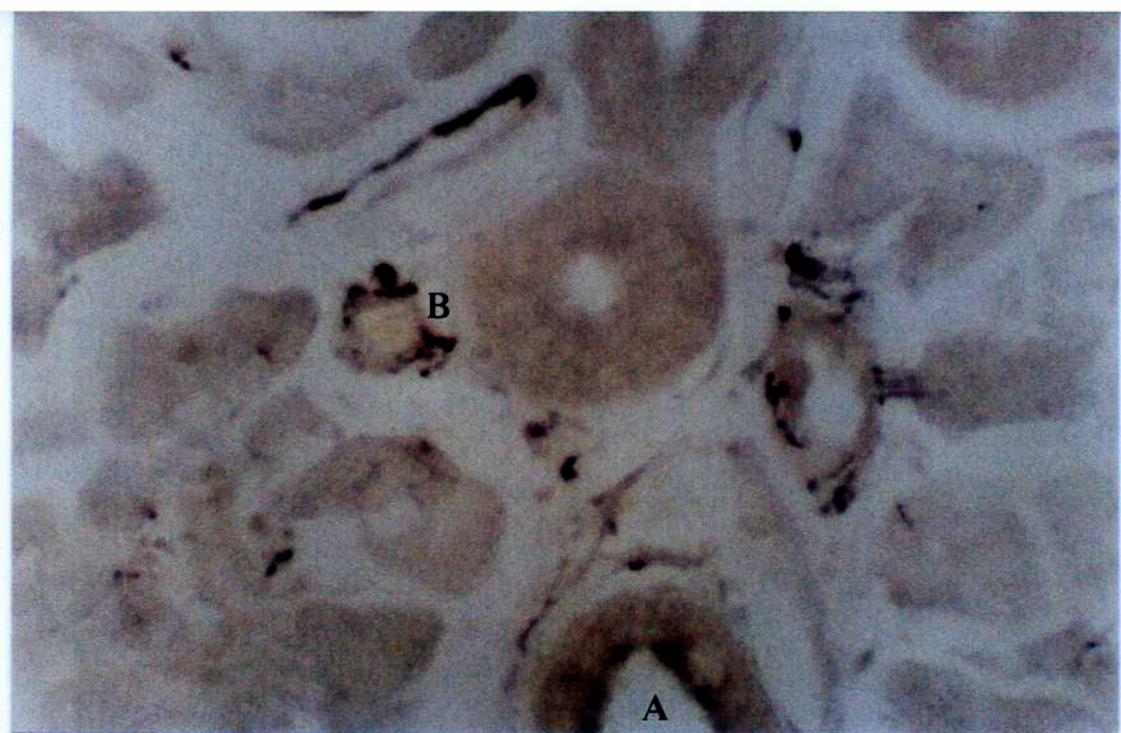


Foto 5: revelando con NOS-NP se puede apreciar:
A) Leve marca en la membrana apical de un conducto excretor.
B) Marca apreciable en la inervación de los vasos sanguíneos.



Foto 6: corte revelado con el antisuero NOS-N (este antisuero reconoce a la NOS neuronal aislada de cerebro de rata). Se ve una importante marca en la membrana apical y citoplasma del conducto estriado, así como cuando revelamos con el antisuero NOS-N.



Foto 7: utilizando NOS-N se puede apreciar una significativa marca citoplásrica en un conducto contorneado granular.



Foto 8: corte transversal de un conducto estriado revelado con el antisuero NOS-M (antisuero que reconoce un péptido correspondiente a la iNOS purificada de macrófagos). Nuevamente se aprecia la disposición apical de la marca en el conducto.



Foto 9: utilizando el antisuero NOS-M se puede ver una importante marca en el citoplasma de las células del conducto contorneado granular, al igual que cuando utilizamos el antisuero NOS-N.

Tabla 2: valores de marcación inmunohistoquímica en cortes de glándula submaxilar de rata. (+++, muy intenso; +++, intenso; ++, moderado; +, débil; -, ausente).

	NADPHd	NOS-NP	NOS-N	NOS-M
Fibras nerviosas	++	++	++	-
Membrana apical de conductos estriados y excretores	++++	+	++	+++
Citoplasma de conductos estriados y excretores	++	-	+	+
Citoplasma de conductos contorneados granulares	++	-	++	++
macrófagos	+	-	-	+

Las diferencias observadas entre los antisueros NOS-NP y NOS-N, los cuales deberían reconocer la misma isoforma neuronal, se podrían explicar por algunas de las siguientes posibilidades: (a) el antisuero NOS-N preparado contra la NOS purificada de cerebro de rata podría tener mayor afinidad por la isoforma neural que el antisuero NOS-NP, generado contra un pequeño péptido de la misma isoforma; (b) el antisuero NOS-N presentaría una reacción cruzada con alguna otra isoforma de NOS, muy relacionada con la isoforma neuronal. Un candidato posible sería la isoforma endotelial, que se encuentra miristoilada y por lo tanto se ancla a la membrana (Busconi et al., 1993). Sin embargo, el antisuero NOS-N no reaccionó con células endoteliales vasculares. También se pudo observar que el antisuero NOS-M, elevado contra un péptido de la isoforma macrofágica tenía la inmunoreactividad más intensa. De ese modo se puede concluir que la actividad NOS asociada a la membrana reflejaría la presencia de varias isoformas o la presencia de una nueva variante enzimática que reacciona en forma cruzada con todos los antisueros utilizados.

La presencia de NOS citoplasmática fue demostrada por NADPHd, pero la inmunoreactividad estuvo restringida a los antisueros NOS-N y NOS-M. Se pueden hacer en este caso las mismas asunciones que anteriormente. Se trataría de dos isoformas o de una nueva variante enzimática.

Efecto del L-NAME y L-NMMA sobre la secreción salival inducida por metacolina

La metacolina indujo un aumento del flujo salival dependiente logarítmicamente de la dosis, con una dosis efectiva mínima (DEM) de $0,3 \mu\text{g/kg}$ ($3 \times 10^{-9} \text{ M}$) (Gráfico 1). La respuesta fue significativamente disminuida por la inyección de L-NAME (20 mg/kg) 60 minutos antes de la inyección de metacolina en la segunda curva.

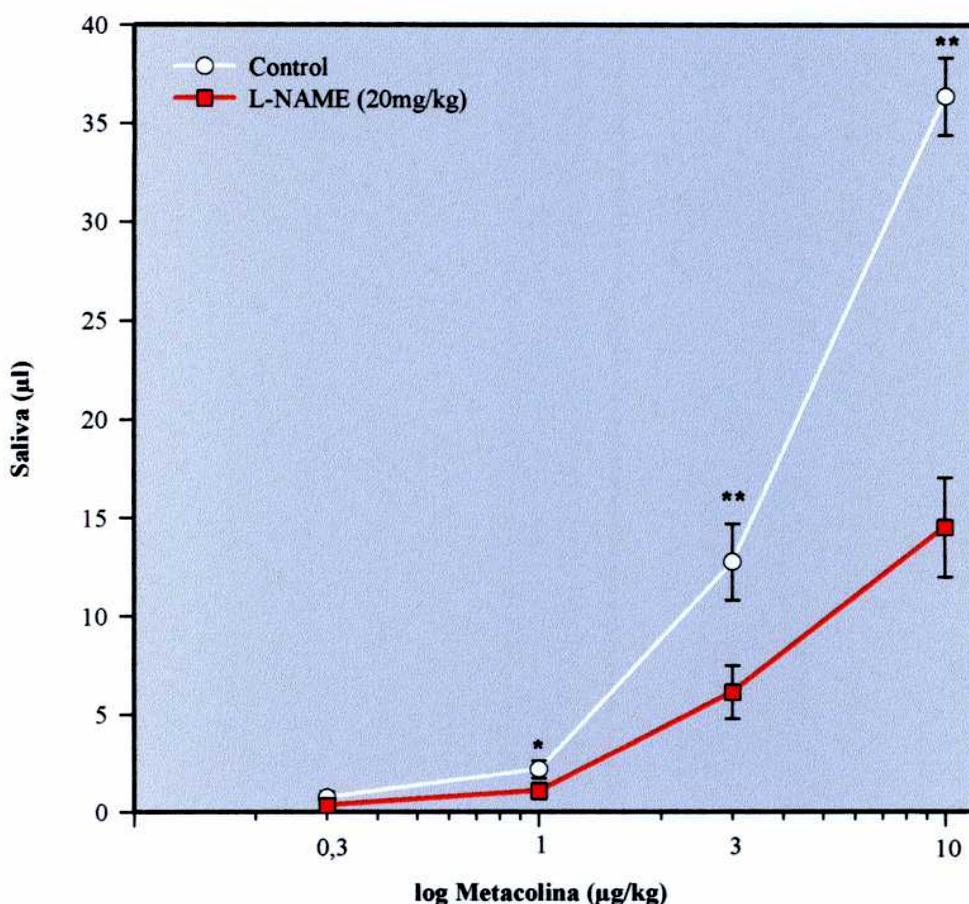


Gráfico 1: efecto del L-NAME sobre la secreción salival inducida por metacolina.
Los valores están expresados como la media \pm error standard de un ($n=4$).
* $p<0,05$ o ** $p<0,01$ comparando con el respectivo control.

El L-NAME no es un inhibidor competitivo simple de la NOS, ya que presenta una inhibición levemente reversible de la nNOS como también se han detectado efectos bloqueantes muscarínicos cuando se lo emplea en altas dosis (Buxton y col., 1993), por ese motivo y con el fin de confirmar los resultados obtenidos se decidió evaluar otro inhibidor de la NOS, el L-NMMA.

Utilizándose a dosis menores (5 mg/kg) se obtuvieron resultados similares a los con L-NAME. (Gráfico 2)

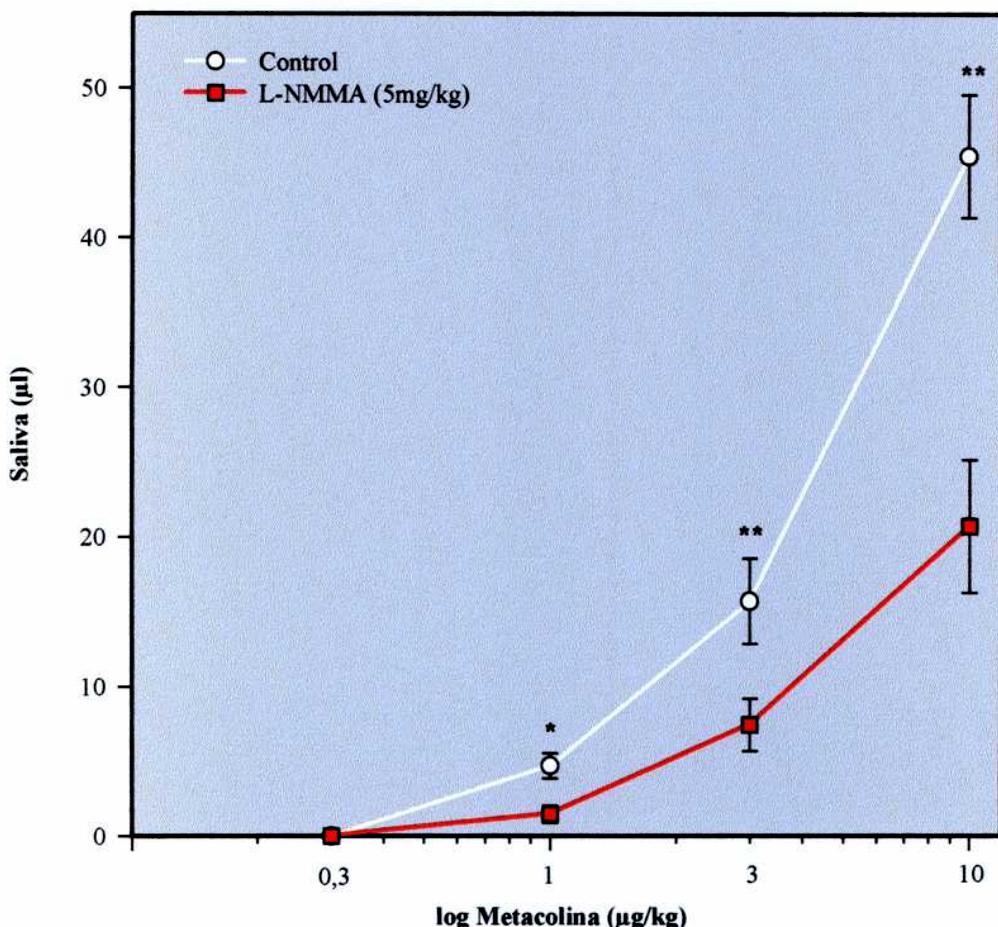


Gráfico 2: efecto del L-NMMA sobre la secreción salival estimulada por metacolina.
 Los valores están expresados como la media \pm error standard de un (n=5).
 * $p<0,05$ o ** $p<0,01$ comparando con el respectivo control.

Dado que el L-NMMA produjo una inhibición de la secreción salival similar a la producida por L-NAME (alrededor del 50% para las diferentes dosis de metacolina utilizadas), esto indicaría que posiblemente el L-NAME estuvo ejerciendo sus efectos específicos sobre la enzima y no los efectos “colaterales” como bloqueante muscarínico.

Preferentemente se continuó utilizando L-NMMA para los siguientes experimentos, dado que produjo similares resultados al L-NAME pero a menor dosis.

Efecto del L-NMMA en la secreción salival inducida por substancia P

La substancia P es un agente secretagogo más potente que la metacolina como estimulante de la secreción salival (Gráfico 3), produciendo un aumento del flujo salival dependiente logarítmicamente de la dosis, con una DEM de $0.3 \mu\text{g/kg}$ ($1.5 \times 10^{-10} \text{ M}$) comparado con $3 \times 10^{-9} \text{ M}$ de la metacolina. Un aumento de 10 veces en la dosis de substancia P o metacolina produjo un aumento aproximado de 10 veces en la secreción salival.

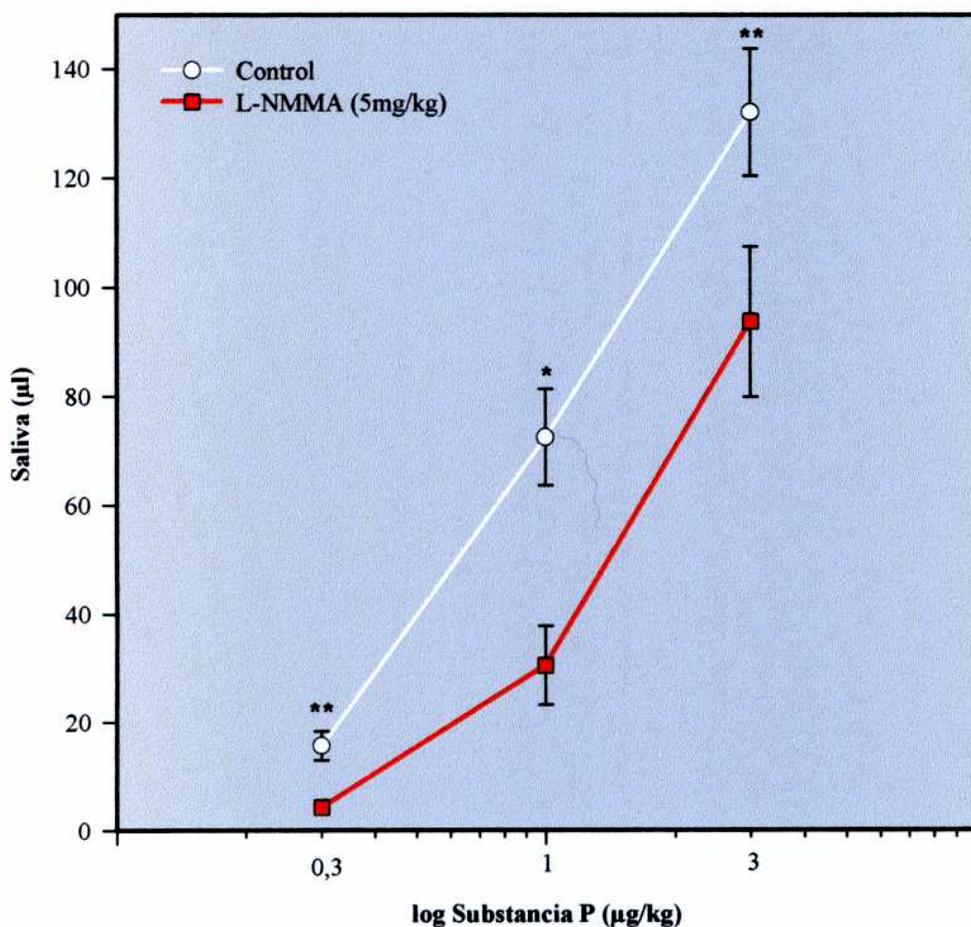


Gráfico 3: efecto del L-NMMA en la secreción salival estimulada por substancia P.

Los valores están expresados como la media \pm error standard de un (n=5).

* p<0,05 o ** p<0,01 comparando con el respectivo control.

En los grupos controles, tanto para metacolina como para substancia P, no hubo diferencias significativas entre las dos curvas de secreción separadas por una hora de anestesia sin inhibición de la NOS interpuesta (Gráficos 4 y 5).

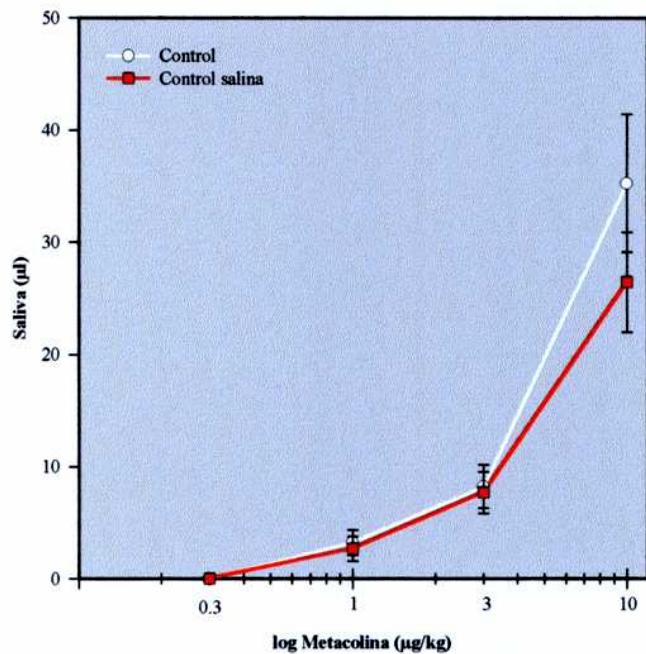


Gráfico 4: secreción salival inducida por metacolina (grupo control)
Los valores están expresados como la media \pm error standard de un (n=8).

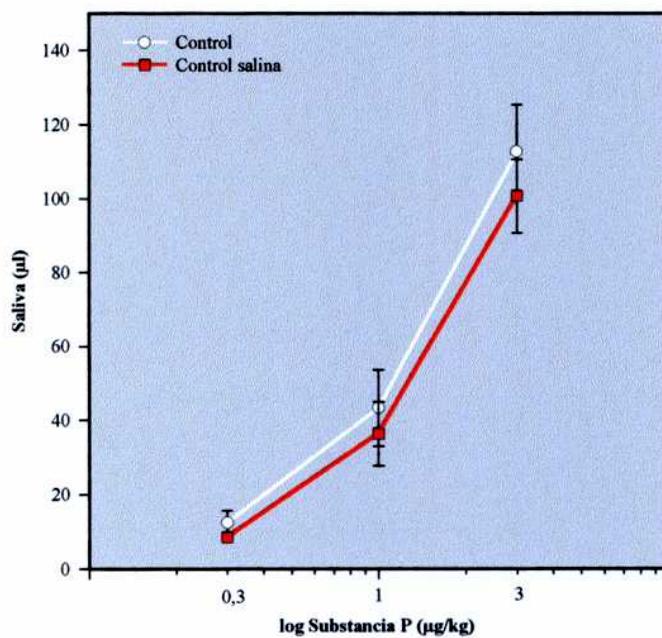


Gráfico 5: secreción salival inducida por substancia P (grupo control).
Los valores están expresados como la media \pm error standard de un (n=6).

Actividad NOS en la GSM de la rata

Como se mencionó anteriormente el método utilizado para medir la actividad de la NOS consiste en la medición de la conversión de [¹⁴C]-arginina a [¹⁴C]-citrulina. Pero dado que en la GSM se encuentra un ciclo de la urea muy activo, esto implicaría que por acción de la arginasa (enzima perteneciente a este ciclo metabólico) podrían obtenerse falsos valores de la actividad NOS. Con el propósito de evitar dicha situación se llevó a cabo una curva de inhibición de la arginasa, con diferentes dosis de L-valina (Gráfico 6).

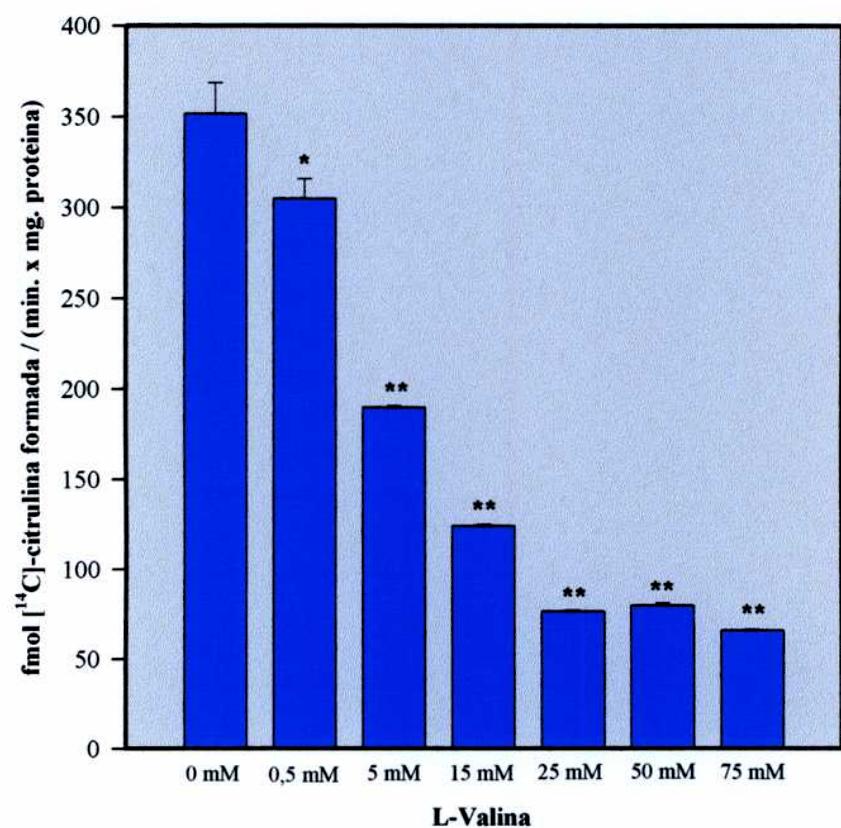


Gráfico 6: curva dosis-respuesta de L-valina sobre la conversión de ¹⁴C-arginina en ¹⁴C-citrulina en la GSM.

Los valores están expresados como la media ± error standard.

*, P<0,05; **, P<0,01. (0 mM Valina, n=6; otros grupos, n=4 por grupo)

A partir de esta curva se determinó que la dosis efectiva mínima era 25 mM de L-valina. Por lo cual todas las mediciones posteriores de la actividad NOS fueron

llevadas a cabo en presencia de L-valina 25 mM, para poder así observar solo la actividad NOS en el tejido.

Asimismo para poder discernir entre las actividades NOS dependiente e independiente de Ca^{++} es necesario quitar todo el Ca^{++} del homogenato con EGTA. Para determinar cuál es la concentración de EGTA óptima para este fin, se realizó una curva dosis-respuesta de EGTA (Gráfico 7).

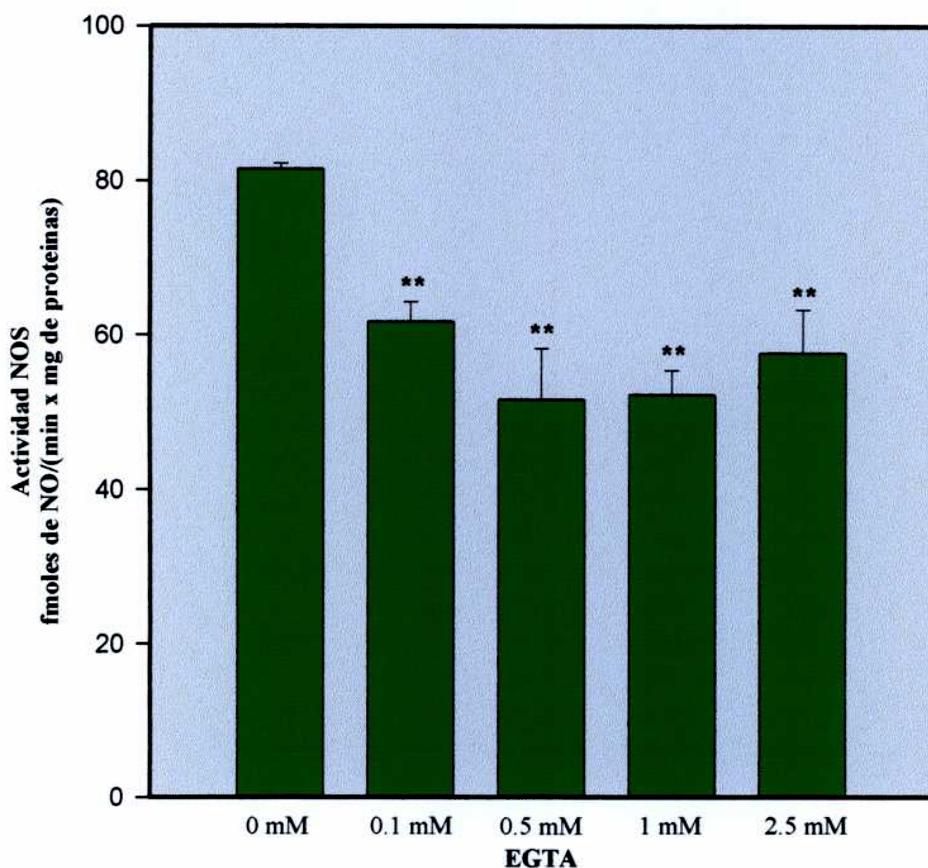


Gráfico 7: curva dosis-respuesta de EGTA sobre la actividad NOS en la GSM de rata.

Los valores están expresados como la media \pm error standard.

**, P<0,01. (0 mM EGTA, n=8; otros grupos, n=6 por grupo).

A partir de los resultados obtenidos con la curva de inhibición de la actividad NOS con diferentes dosis de EGTA, se determinó que para los posteriores experimentos donde se determinarían las actividades de los dos tipos de NOS, se utilizaría EGTA en la concentración de 1 mM.

Se determinó la actividad NOS de todos los grupos propuestos tal como fue descripto en la sección de metodologías (Gráfico 8).

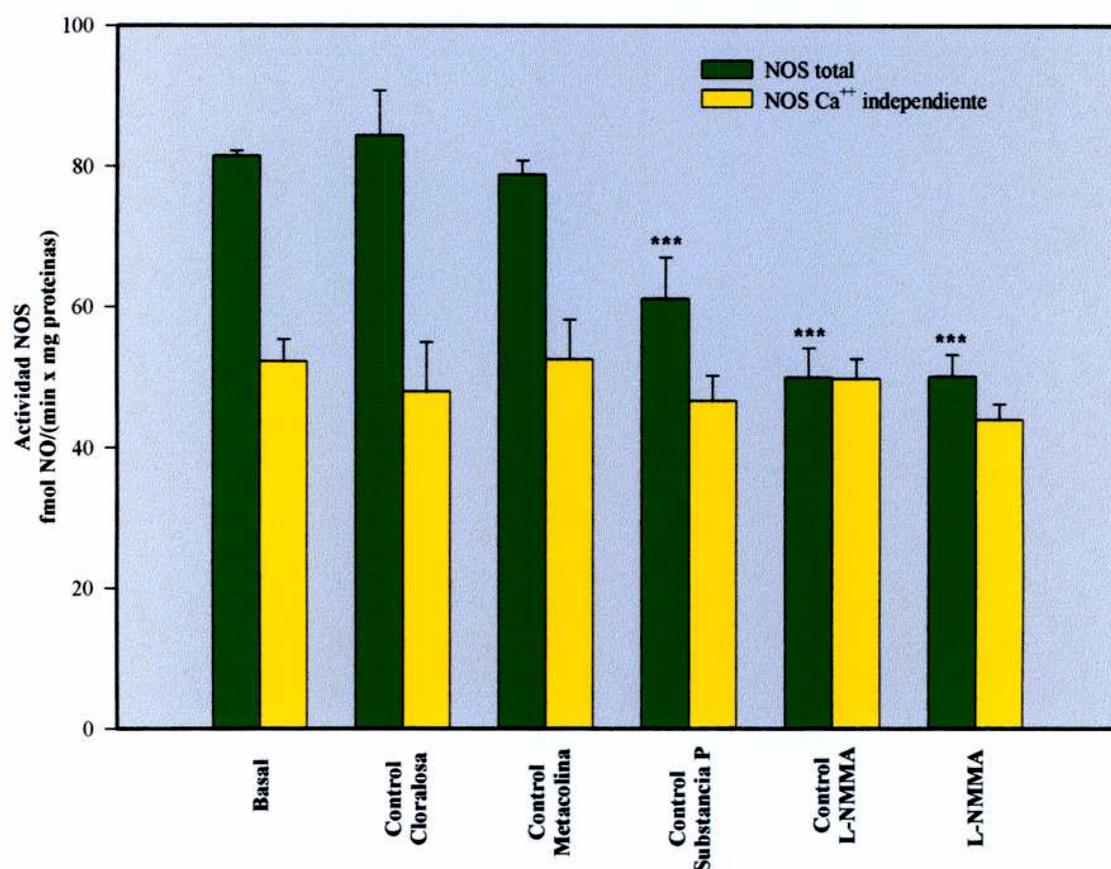


Gráfico 8: actividad NOS de animales controles y tratados con L-NMMA.

Los valores están expresados como la media \pm error standard. (Basal, n=8; L-NMMA y Control L-NMMA, n=6; Control metacolina y Control substancia P, n=5; Control cloralosa, n=4)

***, P<0,001, comparando con el grupo Basal.

El tratamiento “in vivo” con cloralosa no produjo variación en la actividad de la NOS en la GSM. Hay que tener en cuenta que se esta comparando con un grupo basal donde el animal fue sacrificado en forma subita sin preanestesia.

No hubo modificaciones de la actividad de la NOS en los controles de metacolina pero ellas fueron observadas en el control de substancia P.

La inyección de L-NMMA produjo una inhibición significativa de la actividad total de la NOS (inhibición aproximada al 40%). En ningún caso se vieron modificaciones de la actividad Ca⁺⁺ independiente. Esto demuestra que la inhibición se produjo solamente sobre las isoformas Ca⁺⁺ dependientes, donde la inhibición fue cerca del 99%.

Discusión

Tomando en cuenta la amplia distribución de la NOS en la GSM de la rata, no resulta sorprendente que su inhibición interfiriera con la secreción salival inducida por substancia P o metacolina. Aunque las células acinares no presentaban inmunoreactividad para la NOS, la isoforma neural de la NOS está claramente presente en los terminales nerviosos que inervan los acinos, mientras que tanto dicha isoforma como la inducible estaban presentes en las membranas apicales de los conductos excretores y estriados, citoplasma de conductos contorneados granulares y en menor cantidad en el citoplasma de conductos estriados y excretores.

La inhibición de la actividad de la NOS por efecto de L-NMMA fue de 40 a 50%, una proporción coincidente con la inhibición de la secreción salival inducida por metacolina o substancia P. Esta inhibición fue encontrada exclusivamente sobre la NOS dependiente de Ca^{++} , lo cual demuestra la mayor afinidad del inhibidor por esta isoforma que por la NOS independiente de Ca^{++} . Esto indica la participación activa del NO en la secreción estimulada de la saliva por la GSM de la rata.

Es posible que la nNOS presente en los axones juegue un rol importante en la secreción salival, pero en esta serie de experimentos los receptores glandulares fueron activados directamente. Cualquier rol del NO bajo las presentes condiciones estuvo probablemente mediado por la NOS presente en las estructuras tubulares como fue descripto anteriormente. Dado que solo se demostró un descenso de la actividad de la NOS dependiente de Ca^{++} , la iNOS no parecería estar involucrada en este fenómeno, sin embargo el uso de otros inhibidores con mayor afinidad por esta isoforma podría demostrar su participación. La nNOS de los tejidos no neuronales podría ser activada mediante los receptores muscarínicos y/o de substancia P. Esta activación aumentaría los niveles intracelulares de Ca^{++} , que a su vez activarían la nNOS presente en las células tubulares. El NO se une al Fe^{++} de los grupos hemo, es así como el NO modula la actividad de las enzimas que contienen este grupo prostético, entre ellas la guanilato ciclase y las diferentes isoformas de la ciclo y lioxigenasa. El NO aumentaría los niveles de cGMP y/o prostaglandinas, los cuales podrían actuar sobre los sistemas de transporte iónico de las células acinares, modulando así el proceso de secreción salival.

Proceso de secreción salival

Ya en el año 1861, Carl Ludwig proponía que la secreción salival no era resultado de un filtrado plasmático, sino que el sistema nervioso autónomo provocaba cambios celulares y se evocaba de esta manera la secreción. El demostró que la estimulación nerviosa de las GSM producía secreción salival independientemente del flujo y de la presión sanguínea. En 1954 Thaysen y colaboradores estudiaron la secreción estimulada en las glándulas salivales mayores. A partir de estas observaciones se propuso el modelo de secreción salival en dos fases:

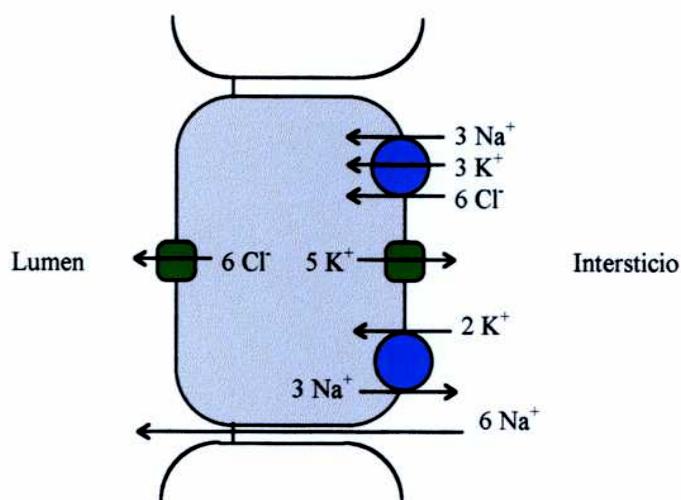
- 1) Las células acinares producen una secreción primaria isotónica. La composición electrolítica es prácticamente constante, con niveles de Na^+ , K^+ y Cl^- similares a los plasmáticos.
- 2) Los conductos excretores y los estriados modifican la secreción primaria extrayendo Na^+ y Cl^- , y añadiendo K^+ y HCO_3^- a la saliva. En los conductos no varía el volumen de la saliva ya que estos son impermeables al agua.

A medida que la saliva fluye a través de los conductos se hace progresivamente más hipotónica. Por lo tanto los conductos retiran de la saliva más iones que los que le aportan. Cuanto mayor sea la velocidad de secreción a través de los conductos estriados y excretores, más cercana a la isotonicidad resultará la saliva.

Desde los tiempos de Thaysen hasta nuestros días se han dilucidado diversos mecanismos involucrados en la secreción salival. Se ha descripto la composición de la saliva en sus estadios primario (isotónico) y secundario (hipotónico), por medio de técnicas de micropunción (Martinez y col., 1966), confirmando el modelo de Thaysen. Desde la década del sesenta se sabía que el tejido glandular era el que tenía mayor actividad Na^+ - K^+ - ATPasa (Schwartz y col., 1968), esta presencia fue recién demostrada en 1988 por técnicas de inmunohistoquímica (Winston y col., 1988). En 1984 se demostró la presencia de un canal de K^+ sensible a Ca^{++} en la membrana basolateral de la célula acinar (Petersen y col., 1984), otros canales de K^+ con diferentes características fueron descriptos en la membrana basolateral del acino, entre ellos el canal de K^+ de gran conductancia activable por voltaje y por Ca^{++} (BK) (Cook y col., 1990). Como último componente en la membrana basolateral encontramos al cotransportador de Na^+ , K^+ y Cl^- que fue descripto inicialmente como un componente necesario de la membrana para mantener la estequiométría en los movimientos iónicos

a través de la célula acinar. Se demostró que el cotransportador de Na^+ , K^+ y Cl^- era un componente activo de estas membranas a través de bumetanide marcado, un ligando específico ligando específico (Turner y col., 1988).

Del lado luminal de la célula apical solo se pudo medir conductancia al Cl^- a partir de un canal altamente regulable (Smith y col., 1992). No se pudo encontrar ningún canal de Na^+ que explique el pasaje de este ion desde el plasma hasta el lumen del acino. La mayor conductancia al Na^+ se encuentra en las uniones estrechas, por lo tanto se postula que el Na^+ pasa intercelularmente por el gradiente electroquímico que genera el canal de Cl^- presente en la membrana luminal. (Ver esquema 5).



Esquema 5: representación esquemática de una célula secretora de un acino glandular típico.

Los mecanismos intracelulares descriptos en la estimulación de la secreción salival son mayormente dos. La estimulación β -adrenérgica conduce al aumento intracelular de cAMP el cual activa proteínas quinasas que regulan la secreción salival (Baum y col., 1981). Mientras que por otra parte la estimulación muscarínica, adrenérgica y de substancia P provocan la activación del metabolismo de los fosfoinosítidos con la consiguiente movilización de Ca^{++} .

En el presente estudio las respuestas secretoras fueron inducidas por metacolina y substancia P, las cuales actúan por la vía del Ca^{++} , este catión activa los canales de K^+ (BK) y los de Cl^- (Cook y col., 1988). El diacilglicerol y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato activan la proteína quinasa C con el consiguiente aumento de la secreción proteica (Putney y col., 1988). Por otra parte los aumentos de Ca^{++} intracelulares producen un aumento del cGMP en el tejido (Butcher y col., 1976). Hay evidencias que sugieren que

el cGMP estaría envuelto en la estimulación de la Na^+ , K^+ -ATPasa, el 8-bromo-cGMP (análogo no hidrolizable del cGMP) aumenta el ingreso de K^+ a la célula acinar por un sistema sensible a ouabaína en la glándula salival (Martinez y col., 1983).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la presente serie de experimentos, se propone un modelo de la acción del NO en la secreción salival mediada por estimulación colinérgica muscarínica y a la substancia P.

Modelo de la acción del NO en la regulación de la secreción salival

Debido a la presencia de gran cantidad de componentes de transporte iónico en la GSM comunes con otros tejidos, en esta sección se intentará integrar los conocimientos sobre la regulación de los mismos y aplicarlos a la parte más desconocida de la regulación de la secreción salival, que es la intervención del cGMP y el NO en estos procesos.

En otros sistemas se ha descripto la regulación por parte del sistema NO-cGMP de los canales de K^+ , las Na^+ - K^+ -ATPasas, los canales de Cl^- y los cotransportadores de Na^+ - K^+ - Cl^- (todos son sistemas de transporte de iones descriptos en la GSM). A continuación se delinearán los antecedentes más recientes de esta regulación:

Canales de K^+ : en la membrana basolateral de la sección cortical del conducto colector del riñón de la rata se describieron dos tipos de canales de K^+ (de baja y de media conductancia). Estos canales se encuentran regulados por el sistema NO-cGMP-PKG (Horsch y col., 1995). Más aún en la membrana basolateral del túbulo colector del riñón de la rata se pudo determinar la participación del sistema NO-cGMP en la conductividad basal del canal de K^+ de baja conductancia (Lu y col., 1996); por otra parte en el conducto colector se describió la activación indirecta del transporte de Na^+ hacia el lumen por medio de la activación del canal de K^+ (presente en la membrana basolateral), mecanismo dependiente de NO (Lu y col., 1997). En otro sistema experimental donde se utilizaron cultivos de células de papila dermal humana, se determinó que el NO-cGMP se encuentra involucrado en la activación del canal de K^+ dependiente de Ca^{++} . Asimismo se ha descripto la activación por NO de los canales de K^+ dependientes de Ca^{++} del músculo liso vascular de pulmón y que esta activación se realiza vía cGMP (Hampl y col., 1995). A su vez trabajos en aorta de conejo

demostraron la participación directa del NO sobre los canales de K^+ dependientes de Ca^{++} , sin la participación del cGMP (Bolotina y col., 1994).

Es decir, estos antecedentes revelan que el NO podría regular la actividad de canales de K^+ dependientes de Ca^{++} . En algunos de estos canales la regulación ejercida por el NO es a través de cGMP.

Na⁺-K⁺-ATPasa: en el año 1983 Martinez y col. determinaron la activación de la bomba de Na^+ en la célula acinar de la GSM de rata por la adición de 8-bromo-cGMP (análogo no hidrolizable del cGMP), lo cual podría ser un indicio de la presencia de la vía NO-cGMP en la GSM. Por otra parte se describió la participación del NO en la activación de la Na^+ -K⁺-ATPasa de aorta de conejo, proceso independiente de la PKC (Gupta y col., 1996).

Canales de Cl⁻: en células del túbulo contorneado proximal de riñón de rata se midió la activación del canal de Cl^- por medio de la aplicación de 8-bromo-cGMP (Darvish y col., 1995). En células parietales de estómago de conejo, se pudo observar que un agente vasodilatador (ecabapide) produjo un aumento intracelular de cGMP el cual es responsable de la activación del canal de Cl^- (Sakai y col., 1996). En intestino de rata, ratón y humano se determinó que las enterotoxinas bacterianas producen un aumento del cGMP y consiguientemente una activación de la PKG (II) que se encuentra en grandes cantidades en la mucosa. Esta quinasa aumenta significativamente la conductancia del canal de Cl^- que participa en la fibrosis quística (Vaadrager y col., 1997).

Cotransportador de Na⁺-K⁺-Cl⁻: este cotransportador presente en células endoteliales vasculares bovinas está regulado por cGMP, el tratamiento de estas células con el péptido natiurético atrial (ANP) induce un aumento en cGMP y la concomitante activación del cotransportador (Fujita y col., 1989). A su vez en músculo liso de aorta de rata, se midió el aumento de cGMP por acción del ANP y la concomitante activación del cotransportador (Hedge y col., 1989).

Es importante destacar que en este trabajo no se ha encontrado inmunoreactividad alguna para las distintas isoformas de la NOS en los acinos. También es necesario recordar que todo el volumen secretado por la GSM es generado exclusivamente por los acinos, y que en los túbulos que son impermeables al agua solo se reabsorben iones. Como la inhibición de la actividad de la NOS produjo una

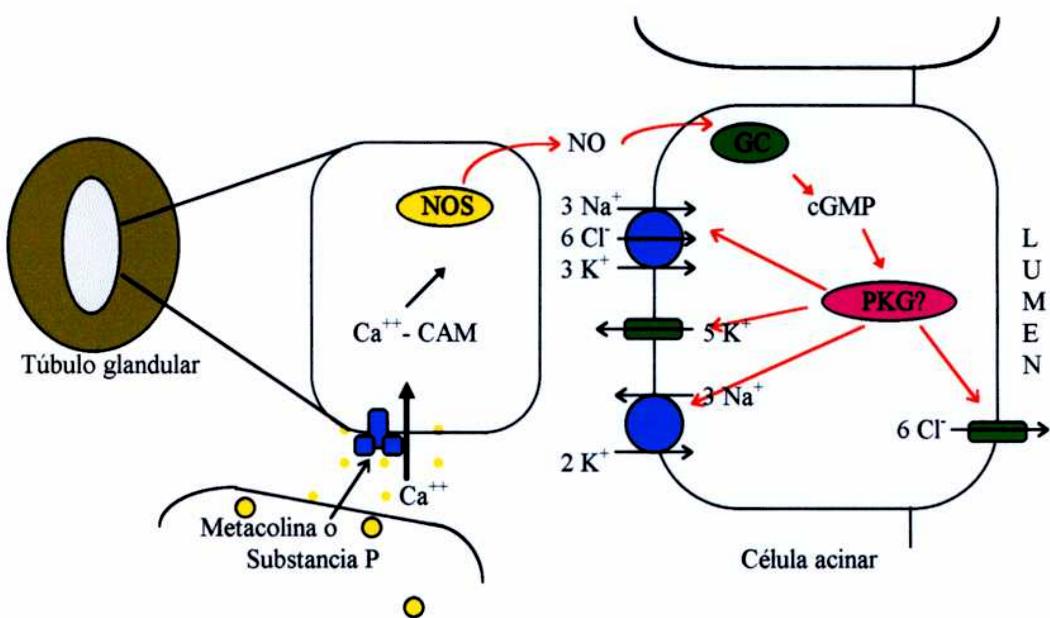
disminución de la secreción salival, es muy probable que el NO esté actuando de manera parácrina, desde los túbulos glandulares hacia los acinos. Esto activaría la guanilato ciclase, con el consiguiente aumento de cGMP y la posible activación de las proteínas quinasas dependientes de cGMP. Estas quinasas a su vez actuarían fosforilando sus posibles substratos, como por ejemplo: la $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPasa, el canal de Cl^- , el canal de K^+ y/o el cotransportador $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-Cl}^-$, todos regulados por la vía de este segundo mensajero en distintos tipos celulares como fue mencionado anteriormente. (ver esquema 6)

Para que este modelo sea válido es necesaria la presencia de receptores específicos en los túbulos glandulares, al menos para los secretagogos utilizados durante el presente trabajo (metacolina y substancia P). En los últimos años se han desarrollado técnicas rápidas para la separación de las distintas estructuras glandulares, es así como en 1996 Xu y colaboradores caracterizaron el sistema de señales del calcio a lo largo de las estructuras tubulares de la GSM de la rata. Demostraron que tanto los agonistas muscarínicos como la substancia P producían un aumento del calcio intracelular, el cual podría ser el responsable de la activación de la NOS.

A su vez hay que tener en cuenta el importante aporte de NO que produce la presencia de aproximadamente un 50% de NOS Ca^{++} independiente, esta isoforma produce NO constantemente, el cual puede ser el responsable de los niveles basales de cGMP presentes en la GSM.

Si el presente modelo es válido, se pueden desprender ciertas predicciones del mismo:

- a) Si el NO efectivamente regula los sistemas de transporte iónico del acino, también regularía también los sistemas de transporte del conducto, modificando así los niveles de los distintos iones presentes en la saliva.
- b) Para que a) sea factible, es necesaria la presencia de la Guanilato Ciclase y por consiguiente de las proteínas quinasas activables por cGMP tanto en células acinares como ductales.



Esquema 6: modelo propuesto de la participación del NO en la regulación de los mecanismos involucrados en la secreción salival.

En conclusión, se ha descripto la presencia de diferentes isoformas de la NOS en la GSM de la rata macho adulta y se ha confirmado la hipótesis de que el NO tiene un papel importante en la secreción salival. Futuros estudios se dirigirán a elucidar los sitios y mecanismos de acción del NO en las glándulas salivales. Entre ellos es de importancia estudiar los efectos de dadores de NO y bloqueantes de la NOS en la composición y volumen de la saliva secretada por la GSM, así como estudiar la presencia de distintos subtipos de receptores y proteínas involucradas en la transducción de señales en las células acinares y ductales.

Bibliografía

- Ahn KY, Mohaupt MG, Madsen KM, Kone BC. In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 1994; 267:748-757.
- Bennick A, Chau G, Goodlin R, Abrams S, Tustian D, Madapallimattan G. The role of human salivary acidic proline rich proteins in the formation of acquired dental pellicle in vivo and their fate adsorption to the human enamel surface. *Arch. oral. Biol.* 1983; 28:19-27.
- Baum BJ, Freiberg JM, Ito H, Roth GS, Filburn CR. β -adrenergic regulation of protein phosphorylation and its relationship to exocrine secretion in dispersed rat parotid gland acinar cells. *J Biol Chem* 1981; 256:9731-9736.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368:850-853.
- Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:8410-8413.
- Butcher FR, Rudich L, Emler C, Nemerowski M. Adrenergic regulation of cyclic nucleotide levels, amylase release and potassium efflux in rat parotid gland. *Mol Pharmacol* 1976; 12:862-870.
- Buxton IL, Cheek DJ, Eckman D, Westfall DP, Sanders KM, Keef KD. L-G-nitro L-arginine methyl ester and alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circ Res* 1993; 72:387-395.
- Chibuzo GA, Cummings JF. Motor and sensory centers for the innervation of mandibular and sublingual salivary glands: a horseradish peroxidase study in the dog. *Brain Res.* 1980; 189:301-313.
- Cook DI, Gard GB, Champion M, Young JA. Patch-clamp studies of the electrolyte secretory mechanism of rat mandibular gland cells stimulated with acetylcholine or isoproterenol. En: Thorn NA, Treiman M, Petersen OH, Thaysen JH, eds. *Molecular mechanisms in secretion*. Alfred Benzon symposium, no.25. Copenhagen: Munksgaard, 1988:131-151.

- Cook DI, Young JA. Cation channels and secretion. En: Young JA, Wong PYD, eds. *Epithelial secretion of water and electrolytes*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1990;15-38.
- Darvish N, Einaver J, Dagan D. A novel cGMP activated Cl^- channel in rat proximal tubules. *Am J Physiol* 1995; 268:323-329.
- Elverdin JC, Chiarenza AP, Frid AB, Giglio MJ. Effects of chronic hypoxia on the secretory responses of rat salivary glands. *Arch. oral. Biol.* 1995; 40:459-462.
- Fujita T, Hagiwara H, Ohuchi S, Kozuka M, Ishido M, Hirose S. Stimulation of Na^+ - Cl^- cotransport in cultured vascular endothelial cells by atrial natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159:734-740.
- Furchtgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
- Garrett JR, Emmelin N. Activities of salivary myoepithelial cells. A review. *Med. Biol.* 1979; 57:1-28.
- Gresik EW, Van der Noen H, Barka T. Hypertrophic and hyperplastic effects of thyroxine on the submandibular gland of the mouse. *Anat. Rec.* 1981; 200:443-446.
- Gupta S, Phipps K, Ruderman NB. Differential stimulation of Na^+ pump activity by insulin and nitric oxide in rabbit aorta. *Am J Physiol* 1996; 270:1287-1293.
- Hampl V, Huang JM, Weir EK, Archer SL. Activation of the cGMP-dependent protein kinase mimics the stimulatory effect of nitric oxide and cGMP on calcium-gated potassium channels. *Physiol Res* 1995; 44:39-44.
- Hecker M, Scssa WC, Harris HJ, Ånggård EE, Vane JR. The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium derived relaxing factors: cultured endothelial cells recycle L-citruline to L-arginine, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990; 87:8612-8616.
- Hedge SS, DeFeo ML, Jandhyala BS. Effects of natriuretic factor on cyclic GMP content in rat aortic smooth muscle: studies on the role of membrane Na^+ , K^+ -ATPase. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1989; 16: 623-629.
- Hirsch J, Schlatter E. K^+ channels in the basolateral membrane of rat cortical collecting duct are regulated by a cGMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch* 1995; 429:338-344.

Bibliografía

- Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1981; 218: 33-42.
- Lorber M. Branchings and course of the larger ducts and accompanying structures within the rat submandibular salivary gland. *Am. J. Anat.* 1991; 190:133-156.
- Lohinai Z, Szekely AD, Soos L, Feher E. Distribution of nitric oxide synthase containing elements in the feline submandibular gland. *Neurosci. Lett.* 1995; 192:9-12.
- Lohinai Z, Balla I, Marczis J, Vass Z, Kovach AG. The effect of a nitric oxide donor and an inhibitor of nitric oxide synthase on blood flow and vascular resistance in feline submandibular, parotid and pancreatic glands. *Arch. Oral. Biol.* 1996; 41:699-704.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide, a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* 1994; 120:227-237.
- Lu M, Wang WH. Nitric oxide regulates the low conductance K^+ channel in basolateral membrane of cortical collecting duct. *Am J Physiol* 1996; 270: 1336-1342.
- Lu M, Giebisch G, Wang WH. Nitric oxide induced hyperpolarization stimulates low conductance Na^+ channel of rat CCD. *Am J Physiol* 1997; 272:498-504.
- Martínez JR, Holzgreve H, Frick A. Micropuncture study of submaxillary glands of adult rats. *Pflugers Arch* 1966; 290:124-133.
- Martínez JR, Martínez AM, Cooper C. cGMP stimulates active K^+ uptake in rat submandibular slices. *Experientia* 1983; 39:362-364.
- Mayeux PR, Garner HR, Gibson JD, Beanum VC. Effect of lipopolisaccharide on nitric oxide synthase activity in rat proximal tubules. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 49:115-118.
- Nameda Y, Miyoshi H, Tsuchiya K, nakaya Y, Arase S. Endotoxin induced L-arginine pathway produces nitric oxide and modulates the Ca^{++} activated K^+ Channel in culturad human dermal papilla cells. *J Invest Dermatol* 1996; 106:342-345.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6:3051-3064.

- Needleman P, Hunter FE. Organic nitrate metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1976; 16:81-93.
- Ohtani O, Otsuka A, Lipsett J, gannon B. The microvasculature of rat salivary glands. A scanning electron microscopic study. *Acta Anat. (Basel)* 1983; 115:345-356.
- Palmer RMJ, Rees DD, Ashtob DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1988; 153:1251-1256.
- Petersen OH, Maruyama Y. Calcium activated potassium channels and their role in secretion. *Nature* 1984; 307:693-696.
- Putney JW, McKinney JS, Aub DL, Leslie BA. Phorbol ester induced protein secretion in rat parotid gland. Relationship to the role of inositol lipid breakdown and protein kinase C activation in stimulus secretion coupling. *Mol Pharmacol* 1984; 26:261-266.
- Sakai H, Ikari A, Kumano E, Takeguchi N. A cyclic GMP dependent housekeeping Cl^- channel in rabbit gastric parietal cells activated by a vasodilator reserpine. *Br J Pharmacol* 1996; 119:1591-1599.
- Schwartz A, Moore CA. Highly active NaKATPase in rat submaxillary gland bearing on salivary secretion. *Am J Physiol* 1968; 214:1163-1167.
- Sharkey KA, Templeton D. Substance P in the rat parotid gland: evidence for a dual origin from the otic and trigeminal ganglia. *Brain Res.* 1984; 304:392-396.
- Smith PM, Gallacher DV. Acetylcholine and caffeine evoked repetitive transient Ca^{++} activated K^+ and Cl^- currents in mouse submandibular cells. *J Physiol* 1992; 449:109-120.
- Springall DR, Riveros-Moreno V, Buttery L, Suburo A, Bishop AE, Merret M, Moncada S, Polak JM. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry* 1992; 98:259-266.
- Shu S, Ju G, Fan L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of nervous system. *Neurosci. Lett.* 1988; 85:169-171.
- Suburo AM, Chaud M, Franchi A, Polak JM, Gimeno MAF. Distribution of neuronal and non-neuronal NADPH diaphorase and nitric oxide synthase in the uterine horns

- of rat under different hormonal conditions. *Biology of Reproduction*. 1995; 52:631-637.
- Thaysen JH, Thorn NA, Schwarz IL. Excretion of sodium, potassium and carbon dioxide in human parotid saliva. *Am J Physiol* 1954; 178:155-159.
 - Turner RJ, George JN. Ionuc dependence of bumetanide binding to the rabbit parotid Na/K/Cl cotransporter. *J Membr Biol* 1988; 102:71-77.
 - Vaandrager AB, Bot AG, De Jonge HR. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate dependent protein kinase II mediates heat stble enterotoxin provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology* 1997; 112:437-443.
 - Vincent SR, Kimura H. histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 1992; 46:755-784.
 - Weiner CP, Lizasoain Y, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91:5212-5216.
 - Winston DC, Hennigar RA, Spicer SS, Garrett JR, Schulte BA. Immunohistochemical localization of Na^+ , K^+ -ATPase in rodent and human salivary glands. *J histochem Cytochem* 1988; 35:1139-1145.
 - Worl J, Wiesand M, Mayer B, greskotter KR, Neuhuber WL. Neuronal and endothelial nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase staining in rat and human pancreas: influence of fixation. *Histochemistry* 1994; 102:353-364.
 - Xu X, Diaz J, Zhao H, Muallem S. Characterization, localization and axial distribution of Ca^{++} signalling receptors in the rat submandibular salivary gland ducts. *J Physiol Lond* 1996; 491:647-662.



Alejandro Lomniczi

Autor



Valeria Besuhli de Rettori

Dra. Valeria Besuhli de Rettori

Directora



Angela María Subero

Codirectora