

Tesis Doctoral

Caracterización de la sialoadenitis en los ratones NOD: participación del óxido nítrico en la disfunción secretoria

Rosignoli, Florencia

2004

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 Master's and Doctoral 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:

Rosignoli, Florencia. (2004). Caracterización de la sialoadenitis en los ratones NOD: participación del óxido nítrico en la disfunción secretoria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3698_Rosignoli

Cita tipo Chicago:

Rosignoli, Florencia. "Caracterización de la sialoadenitis en los ratones NOD: participación del óxido nítrico en la disfunción secretoria". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3698_Rosignoli

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Caracterización de la sialoadenitis en los ratones NOD: participación del óxido nítrico en la disfunción secretoria.

Autor: Lic. Florencia Rosignoli
Directora: Dra. Claudia Pérez Leirós.

Año: 2004

103698

Resumen

La autoinmunidad es una causa importante de enfermedad en los seres humanos. El síndrome de Sjögren es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por una pérdida progresiva de la secreción salival y lagrimal. La cepa de ratones diabéticos no obesos (NOD) es el modelo murino más ampliamente utilizado para el estudio de esta enfermedad debido a que el desarrollo de la sialoadenitis está acompañado por una disminución de la respuesta secretoria.

Estudios en las glándulas salivales sugieren que el óxido nítrico podría tener un papel en la regulación de la secreción salival. Por tal motivo nuestro objetivo es investigar si la disfunción secretoria de los ratones NOD está asociada a alteraciones en la actividad de la óxido nítrico sintasa y su relación con la aparición de infiltrados linfocitarios en las glándulas o la expresión de citoquinas en las mismas.

Los resultados expuestos indican que las glándulas salivales de ratones NOD presentan una menor actividad de NOS a partir de las 12 semanas comparada con la de ratones BALB/c de la misma edad y ratones NOD de 8 semanas. La disminución es total en el caso de las glándulas submaxilares. El efecto sobre la NOS coincide con una reducción del flujo salival estimulado por pilocarpina sola o pilocarpina y VIP. Ambos efectos preceden al aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias en las glándulas y en el suero y a la aparición de infiltrados linfomononucleares en las glándulas.

Además los resultados apoyan la hipótesis de una regulación negativa de la NOS por CaM KII, como el mecanismo responsable de la disminución de la actividad observada.

Palabras claves: Autoinmunidad; NOD; Óxido nítrico sintasa; Citoquinas; Calcio calmodulina quinasa II.

Abstract:

Autoimmunity is an important cause of disease in human beings. Sjögren's syndrome is a chronic autoimmune disorder characterized by histological and functional alterations of exocrine glands that result in a severe dryness of the mouth and the eyes. The non obese diabetic (NOD) mouse model of Sjögren's syndrome is the widest model used due to the fact that the development of sialoadenitis is associated to a decrease of salivary secretion.

Studies in salivary glands suggest that nitric oxide could play a role in the regulation of the salivary secretion. Our objective is to determine if the secretory dysfunction of NOD mice is associated to alterations in the activity of nitric oxide synthase and if this is previous to the appearance of lymphocytic infiltrates or cytokine expression in the glands.

Our results show that the salivary glands of NOD mice present a diminished activity of NOS compared with BALB/c of same age and NOD mice of 8 weeks old. The loss of activity is complete in submandibular glands. The effect of NOS is associated with a reduction of the salivary flow stimulated by pilocarpine or pilocarpine and VIP. Both effects precede the increase of the levels of proinflammatory cytokines in glands and serum and the appearance of infiltrates in the glands.

In addition the results support the hypothesis of a negative regulation of NOS by CaMKII, as the responsible mechanism for the decrease of the activity observed.

Key words: Autoimmunity; NOD; Nitric oxide synthase; Cytokines; Calcium calmoduline Kinase II.

A mi mamá por todo el apoyo en estos años.
A mis hermanos Lucas y Leda.
A Juan Manuel

Agradecimientos:

Esta tesis no hubiera sido posible sino fuera por la colaboración de muchas personas.

En especial a

Dra. Claudia Pérez Leirós, por haberme iniciado en el camino de la investigación, haberme brindado la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio y enseñarme con mucha paciencia todo lo que sé.

Gabriela Lombardi, por una amistad de más de 10 años que no se puede expresar en palabras.

Valeria Roca y Mario Calafat por su ayuda en la realización de parte de los experimentos de esta tesis.

Dr Roberto Meiss por haberme iniciado en el complejo estudio de la inmunohistoquímica.

Dra. Rosa Gomariz y a todo su grupo por haberme abierto las puertas y hecho sentir como una más de su grupo.

Dra. Nesse, a su grupo y a todo Análisis Biológicos por el tiempo compartido con ellos.

Dr. Omar Pignataro por la marcación del GMPc.

Bioterio de la Facultad, y en especial a la técnica **Micaela Ricca** por el excelente cuidado y la atención de la cepa NOID.

Al grupo de **los participantes de los desayuNOS** por sus aportes siempre enriquecedores.

Sra Estela Pérez por haber embellecido esta tesis con sus esquemas de transducciones intracelulares.

Miriam, Mariano, Fernando los chicos de mantenimiento y limpieza por embellecer el laboratorio y estar siempre dispuestos a dar una mano.

A los Chicos, Fer, Gaby, Mat, Nacho, Ana, Ana Laura, Vichy, Mer, Ale.... ustedes saben ...

Ministerio de Salud por el otorgamiento de la beca "Carrillo-Oñativia".

Fundación Antorchas por el otorgamiento de una beca para completar el doctorado.

El contenido de este trabajo de tesis ha sido parcialmente publicado en:

Nitric oxide synthase I and VIP-activated signaling are affected in salivary glands of NOD mice. **Rosignoli F** and Pérez Leirós C. *J. Neuroimmunology*. 2002; 130: 109-116.

Alterations in Nitric Oxide Synthase Activity and Expression in Submandibular Glands of NOD mice. **Rosignoli F**, Goren N, Pérez Leirós C. *Clinical Immunology* 2001; 101 (1): 86-93.

Abreviaturas:

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BH₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Sero Albúmina Bobina
CaM	Calmodulina
CaMKII	Calcio Calmodulina Kinasa II
CEE	Comunidad Económica Europea
GADPH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1	Interleuquina-1
IL-12	Interleuquina-12
IL-6	Interleuquina-6
IP₃	Inositol-1, 4, 5-trifosfato
KRB	Krebs Ringer-bicarbonato
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-ester
L-NMMA	N ^G -monometil L arginina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NADPH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
NANC	No adrenérgicos no colinérgicos
NMDA	N-metil-d-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOD	Diabéticos No Obesos
NOS	Óxido nítrico sintasa

P	Parótida
PBS	Buffer Fosfato Salino
PKA	Proteína Kinasa A
PKC	Proteína Kinasa C
PSP	Proteína secretoria de parótida
SLE	Lupus eritematoso sistémico
SM	Submaxilar
SS	Síndrome de Sjögren
TNF-α	Factor de necrosis tumoral –alfa
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

Índice

	Página
Introducción	1
MODELOS EXPERIMENTALES PARA ESTUDIAR EL SÍNDROME DE SJÖGREN	6
RATONES DIABÉTICOS NO OBESOS (NOD)	7
Anormalidades en las glándulas salivales	8
Mecanismos involucrados en la fase efectora de los procesos autoinmunes	9
Defectos en el sistema inmune	10
Estructura y composición de los focos de infiltración	11
RATONES MRL/lpr	12
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES	15
Localización	15
Organización estructural de las glándulas salivales	16
Control nervioso de la secreción salival	18
Secreción de agua y electrolitos	21
Secreción proteica	22
BIOSÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO	23
Estructura y función de las isoformas de NOS	25
Inhibición de la actividad de NOS	26
Regulación de la biosíntesis de óxido nítrico	28
Regulación de la localización de las isoformas de NOS	28
Miristoilación, palmitoilación	28
Caveolina	28
Regulación de la actividad de NOS	29
Disponibilidad de Sustratos y Cofactores	30
Fosforilación	30
PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA SECRECIÓN	31
Síntesis de óxido nítrico en azícos	32
Óxido nítrico sintasa y papel del NO en glándulas salivales	33
Hipótesis y objetivos	35
Materiales y Métodos	37
Animales	37
Estudios histológicos	37
Determinación de la concentración sérica de glucosa	39
Medición del flujo salival	40
Determinación de la secreción de amilasa y proteínas en saliva	40
Determinación de citoquinas	41
Determinación de la actividad de óxido nítrico sintasa	42
Determinación de niveles de GMP cíclico	43
Expresión de isoformas de NOS	44

Inmunodetección de proteínas fraccionadas y transferidas a nitrocelulosa (<i>immunoblotting</i>)	44
Inmunohistoquímica	46
Determinación de la formación de urea como índice de la actividad de la arginasa	46
Expresión de niveles de ARN mensajero de NOS I	47
Extracción de ARN	47
Transcripción reversa y amplificación de fragmentos de ADN copia	48
Análisis Estadístico	49

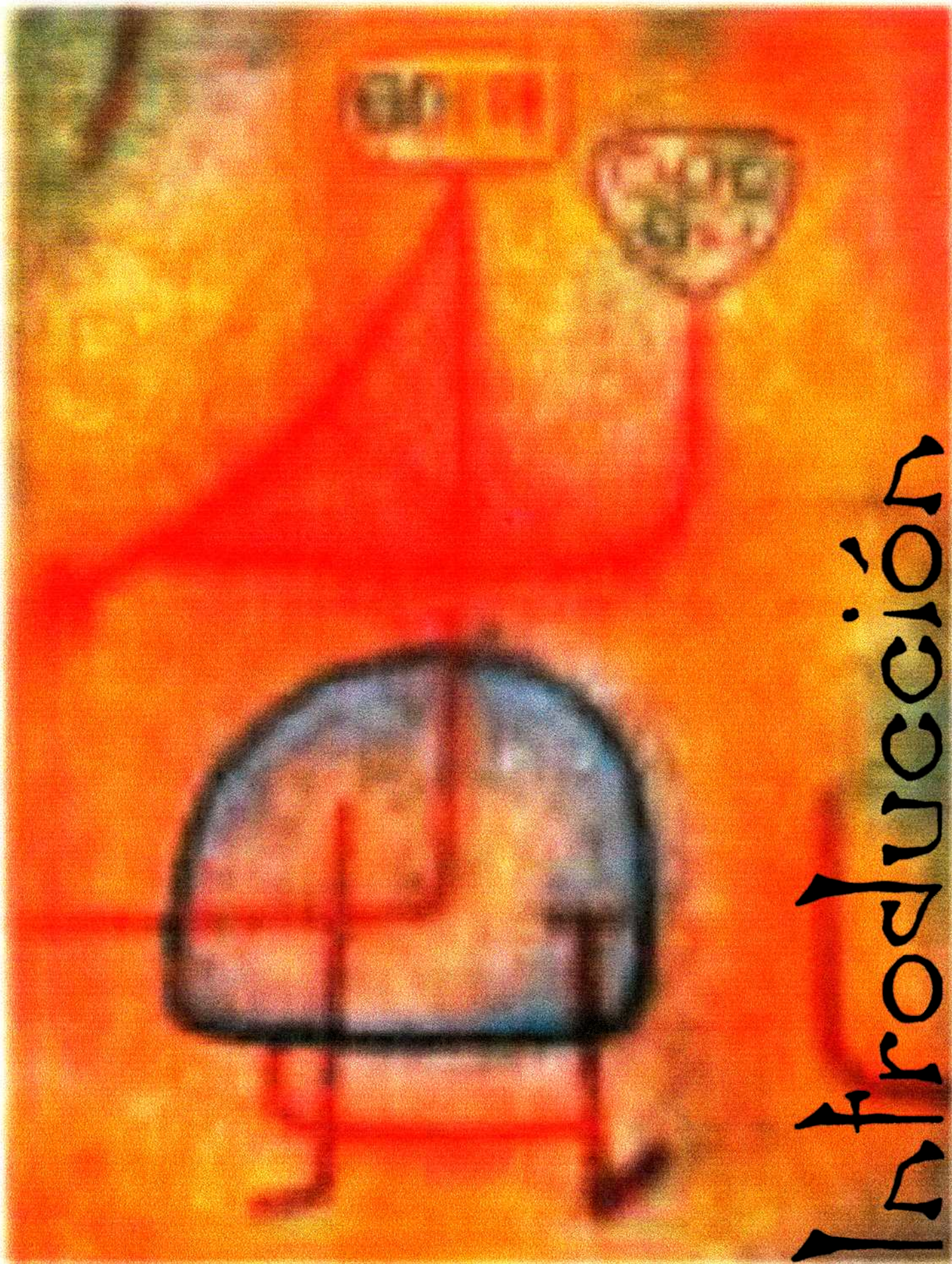
Resultados y Conclusiones 50

Caracterización de la sialoadenitis en los ratones NOD.	51
Histología de Glándulas Salivales	51
Secreción salival	55
Expresión de Citocinas	57
Actividad de Óxido Nítrico Sintasa	60
Señalización mediada por óxido nítrico	63
Medición de niveles de GMPe	63
Alteración en la expresión y localización de una o varias de las isoformas de NOS en las glándulas salivales.	65
Expresión de isoformas de NOS por inmunodetección sobre nitrocelulosa	65
Localización de la isoforma NOS I por inmunohistoquímica	66
Alteración en la transcripción del ARNm de NOS I	67
Regulación de la actividad de la NOS por disponibilidad de sustrato o cofactores de la enzima.	68
Disponibilidad de sustrato y cofactores de la NOS	68
Utilización de la arginina por otras vías metabólicas	70
Regulación de la actividad por fosforilación mediada por quinasas	71
Regulación post-traduccional por PKC	71
Regulación post-traduccional por CaMKII	72

Discusión 77

Bibliografía 87

Introducción





Introducción

A principios de siglo, Paul Ehrlich acuñó la expresión “*horror autotoxicus*” para describir la capacidad del sistema inmunitario de un individuo de reaccionar contra antígenos propios y producir una lesión tisular. Esta observación había sido hecha por los inmunólogos desde el momento en que se reconoció la especificidad del sistema inmunitario para los antígenos extraños. Cuando Macfarlane Burnet propuso la hipótesis de la selección clonal unos 50 años después, añadió el corolario de que los clones de linfocitos autorreactivos se eliminaban durante el desarrollo para evitar las reacciones inmunitarias.

La autoinmunidad, en general, resulta de un fallo o ruptura de los mecanismos que normalmente son responsables del mantenimiento de la autotolerancia y, en los últimos 25 años, se han propuesto múltiples factores que interactúan entre sí y pueden combinarse en el desarrollo de estas enfermedades. Entre los principales mecanismos efectores responsables se cuentan los autoanticuerpos circulantes, los complejos inmunes y las células T.

La autoinmunidad es una causa importante de enfermedad en los seres humanos. Sin embargo, el término autoinmunidad no siempre se emplea en forma precisa, por ejemplo, al llamar autoinmunitarias a algunas enfermedades en que la respuesta inmunitaria contra antígenos extraños está acompañada por lesión tisular. Además, es necesario tener en cuenta que la presencia de anticuerpos o células T reactivas contra antígenos propios puede ser la causa y no la consecuencia de la lesión tisular.

Las enfermedades autoinmunitarias pueden ser específicas de órgano o sistémicas, en un extremo las primeras se caracterizan por las respuestas dirigidas contra antígenos de distribución tisular restringida, que conducen a lesiones en determinados órganos, mientras que las sistémicas presentan respuestas frente a antígenos ampliamente diseminados con producción de complejos inmunes circulantes. En la enfermedad de Hashimoto, un ejemplo de enfermedad específica de órgano, hay una lesión específica de tiroides con infiltración de células mononucleares (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas), además de la producción de anticuerpos circulantes con especificidad absoluta para ciertos constituyentes de la glándula tiroides. En el otro extremo, las enfermedades autoinmunitarias sistémicas o no específicas de órgano, en general pertenecen a la clase de trastornos reumáticos como por ejemplo el lupus eritematoso sistémico (LES) (Tabla 1).

Específicas de órgano		No Específicas de órgano
Tiroiditis de Hashimoto		
Mixedema primario		
Enfermedad de Graves		
Anemia perniciosa		
Gastritis atrófica Autoimmune		
Enfermedad de Addison		
Miastenia grave		
Diabetes mellitus insulino dependiente		
Síndrome de Googpasture		
Pénfigo vulgar		
Penfigoide		
Ofalmia simpática		
Uveitis facogénica		
Esclerosis múltiple		
Anemia hemolítica Autoimmune		
Púrpura trombocitopénica idiopática		
Leucopenia idiopática		
Cirrosis biliar primaria		
Colitis ulcerosa		
Síndrome de Sjögren		
Artritis Reumatoidea		
Esclerodermia		
Lupus eritematoso discoide		
Lupus eritematoso sistémico		

El síndrome de Sjögren ocupa un lugar particular dentro de las enfermedades reumáticas ya que además de las manifestaciones clínicas y serológicas asociadas con las enfermedades sistémicas, se describen trastornos específicos de órgano. Los pacientes con síndrome de Sjögren presentan una respuesta inflamatoria crónica y la función alterada de las glándulas salivales y lagrimales causando sequedad en la boca (xerostomía) y los ojos (keratoconjuntivitis sicca). También pueden encontrarse afectados otros órganos, dando por resultado una amplia gama de síntomas posibles.

A black and white portrait of a middle-aged man with dark hair, wearing glasses, a white shirt, and a dark tie. He is looking slightly to the right of the camera with a neutral expression. The background is a plain, light color.

3



En la actualidad se reconocen dos formas de manifestación de esta enfermedad:

El síndrome de Sjögren primario, caracterizado por la sequedad de las mucosas aunque no asociado a otras enfermedades autoinmunes, y el síndrome de Sjögren secundario, que se diagnostica en presencia de otra enfermedad autoinmune. Además de afectar las glándulas lagrimales (dacryoadenitis) y salivales (sialoadenitis) (foto 2) también puede afectar la secreción en otros órganos, como es el caso del estómago, el páncreas, los intestinos, y puede causar sequedad en otras mucosas como la de la nariz, la garganta, las vías aéreas y el tracto vaginal. Finalmente, los pacientes con síndrome de Sjögren padecen una fatiga extrema inhabilitante que interfiere seriamente con su vida diaria y pueden presentar trastornos nerviosos y vasculitis, entre otras manifestaciones extraglandulares (tabla 2).



Foto 2: Paciente con Síndrome de Sjögren. Las glándulas salivales pueden hincharse en el síndrome de Sjögren (según lo demostrado por las flechas). Foto extraída de Arthritis Research Campaign.

Un gran número de autoanticuerpos ha sido identificado en el síndrome de Sjögren primario y secundario, reflejando una activación de células B y una menor tolerancia en el comportamiento de estas células (Manthorpe, 1979; Watanabe, 1999). En algunos casos la presencia de estos anticuerpos está relacionada con la extensión y severidad de la enfermedad. Los autoanticuerpos no específicos de órgano anti-Ro/SSA y anti-La/SSB son los que

se encuentran mejor caracterizados (Jonson, 2001). La mayoría de los sueros Ro positivos reaccionan con una proteína de 52 kDa llamada Ro52. Esta proteína se localiza en la membrana de las células apoptóticas que pueden ser un buen blanco para la respuesta inmune (Ohlsson, 2002). Otros anticuerpos que se han identificado en suero de pacientes con síndrome de Sjögren incluyen los anticuerpos antinucleares (ANAs), los dirigidos contra anhidrasa carbónica (Inagak, 1991; Kino-Ohsaki, 1996), subunidades proteosomales (Freist, 1999), α -fodrina (Haneji, 1997) y contra el receptor muscarínico M_3 (expresado en glándulas salivales y lagrimales) (Bacman, 1996; Pérez Leirós, 1999).



Subgrupo	Órganos	Anormalidades Patoanatómicas	Anormalidades Patofisiológicas	Síntomas
Enfermedades Exocrinas superficiales	Enfermedad Orales exocrinas	Sialoadenitis, Stomatitis sicca	Hiposalivación, dissalivación	Boca seca
	Enfermedad Ocular exocrina	Dracoadenitis, keratoconjuntivitis sicca	Hipolagración, dislacrimación	Ojos secos
	Enfermedad Nasal exocrina	Rinitis sicca	Hipo/ dis secreción	Nariz seca
	Enfermedad laríngeo-traqueal exocrina	Laringo-traqueitis sicca	Hipo/ dis secreción	Garganta seca, Voz tomada, Tos seca
	Enfermedad Faringo-esofágica exocrina	Faringitis sicca, esofagitis sicca	Hipo/ dis secreción	Garganta seca, dificultades para tragar
	Enfermedad Cutánea exocrina	Dermatitis sicca	Hipo/ dis sudoración	Piel seca
	Enfermedad Genital exocrina	Vaginitis sicca		Vagina seca
Enfermedades de órganos internos exocrinos	Enfermedad Pulmonar exocrina	Bronquitis, bronquilitis alveolitis, intersticial neumonitis	Obstrucción, defectos ventilatorios, reducida capacidad de pulmonar	Dispnea, tos seca
	Enfermedad pancreática exocrina	Pancreática	Hiper e Hipo amilasemia	Mayormente subclínicas
	Enfermedad Gastrointestinal Exocrina	(Atrofia) gastritis		Elevada dispepsia
	Enfermedad Renal exocrina	Intersticial nefritis	Efectos tubulares	Mayormente subclínicas
	Enfermedad Hepatobiliar exocrina	Hepatitis (peri) colangitis	Hiperenzinemia	Mayormente subclínicas

Tabla 2: Terminología de las manifestaciones de enfermedades exocrinas en el síndrome de Sjögren, y su relación con los signos y sintomatología. Extraída de la organización del síndrome de Sjögren

La mayoría de las enfermedades autoinmunes afecta en mayor medida a mujeres. En algunas, como es el caso del síndrome de Sjögren, esta disparidad es mucho más marcada, ya que las mujeres representan alrededor del 90 por ciento de los pacientes. (Talal, 1985; Manthorpe, 1997). El predominio de esta enfermedad en mujeres parece estar relacionado con algunas de las características inmunoreguladoras de las hormonas sexuales.

Dado que, como con la mayoría de las enfermedades autoinmunes reumáticas, la etiología y patogénesis de este síndrome son en parte desconocidas, no hay hasta ahora signos o síntomas específicos que se puedan



Introducción

utilizar para diagnosticarlo claramente. Sin embargo durante los últimos 20 años se han desarrollado varios criterios de diagnóstico de esta enfermedad: el de Copenhague (Manthorpe, 1986); el japonés (Homma, 1986); el griego (Skopouli, 1986); el Californiano-Fox (CF) (Fox, 1986), y el de la Comunidad Económica Europea (CEE) (Vitali, 1994). En la actualidad los criterios mas comúnmente utilizados son el Californiano-Fox y de la Comunidad Económica Europea que incluyen los test para la determinación de la tasa de flujo salival y ligesimal, biopsias de glándulas salivales menores y presencia de autoanticuerpos específicos.

Las diferencias entre los distintos criterios utilizados para el diagnóstico explican la carencia de un acuerdo universal en términos de conocimiento del síndrome de Sjögren.

Hasta la fecha, el tratamiento de los pacientes con síndrome de Sjögren sigue siendo empírico y sintomático, dada su condición devastadora que afecta al paciente no sólo físicamente sino también emocional y socialmente (Valtydóttir, 2000; Strömbeck, 2000).

MODELOS EXPERIMENTALES PARA ESTUDIAR EL SÍNDROME DE SJÖGREN

Los primeros intentos de producir modelos animales de esta enfermedad se realizaron en ratas, conejos y cobayos a los que se les provocó una sialoadenitis experimental (Beutner, 1961; Chan, 1964; White, 1976; Takeda, 1983). Sin embargo, los anticuerpos contra glándulas submaxilares de un animal no eran capaces de provocar una inflamación de las mismas en otro (Beutner, 1961). En un modelo experimental producido en cobayos por inoculación de un homogenato de glándulas submaxilares emulsionado con adyuvante de Freund completo, el 50 % de los animales mostraron una débil inflamación en las glándulas (Chan, 1964). Una sialoadenitis más severa con inflamación crónica periductal con infiltrados celulares y una ocasional pérdida de acinos se indujo también en cobayos mediante la administración de una mezcla de un complejo de $[\text{Fe}(\text{CO})_5]^{3+}$, la vacuna de *Bordetella pertussis* y un extracto salino de glándulas salivales (Whaley, 1974). Pero la mayor desventaja de estos modelos experimentales era que frecuentemente carecían de estudios de los mecanismos autoinmunes básicos, como una caracterización de células mononucleares en los infiltrados glandulares y el estudio de autoanticuerpos.



La información más relevante proviene de la década del 80 con el surgimiento y estudio de modelos experimentales de exocrinopatías espontáneas autoinmunes. Cada modelo murino exhibe características únicas de sialoadenitis y/o dacryoadenitis, que se pueden explotar para estudiar un aspecto particular del síndrome de Sjögren. Estas características pueden incluir los eventos que conducen a la iniciación de la reacción autoinmune, así como los mecanismos responsables de la perpetuación del proceso autoinmune. El conocimiento de las características específicas de cada modelo de la enfermedad permitirá la comprensión de los mecanismos que participan desarrollo del proceso autoinmune.

Dentro de los modelos murinos más ampliamente utilizados se encuentran las cepas de ratones diabéticos no obesos (NOD) y la MRL/lpr (Leiter, 1998), también en menor medida se utiliza la F1 de un híbrido entre la cepa New Zealand Black y New Zealand White (NZB/W) que desarrollan espontáneamente infiltrados en las glándulas salivales y labiales.

Los fenómenos autoinmunes presentes en las glándulas salivales de ratones NZB/W F1, pueden ser comparables con los ratones MRL/lpr. Sin embargo, las observaciones en ratones de NZB/W se pueden comparar con las cepas parentales NZB y NZW, para determinar los factores que contribuyen al desarrollo de las enfermedades autoinmunes en ese modelo del ratón (van Bolksland, 2002).

RATONES DIABÉTICOS NO OBESOS (NOD)

El ratón diabético no obeso (NOD) (figura 3) surgió originalmente como una sublínea de los ratones ICR (Makino, 1980) a partir de la progenie de una hembra que desarrolló espontáneamente diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM). La crianza selectiva de la progenie de esta hembra diabética produjo la obtención de ratones NOD/Lt.

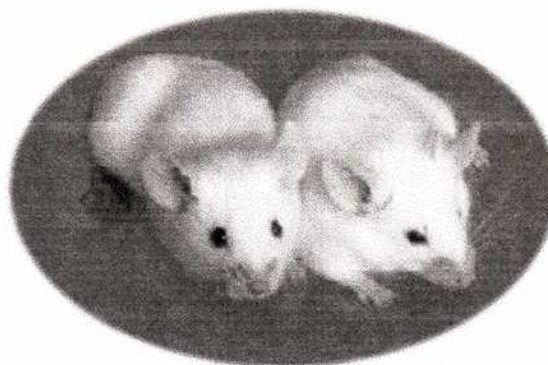


Foto 3: Cepa de ratones NOD. Fotografía extraída del laboratorio Jackson.

Originalmente se observó la presencia de infiltrados linfocitarios en el páncreas, luego se describieron infiltrados linfocitarios en glándulas submaxilares (Miyagawa, 1986), lagrimales y tiroides (Bernard, 1992; Takahashi, 1997).



Introducción

La diabetes en ratones NOD/Lt se caracteriza por la insulinitis. Una disminución marcada del contenido pancreático de la insulina ocurre en hembras alrededor de las 12 semanas de la edad y varias semanas más tarde en los machos. El inicio de la diabetes está marcado por la glucosuria moderada y por una glucosa plasmática superior a 250 mg/dl en condiciones sin ayuno previo. Estas manifestaciones aparecen después de las 20 semanas dependiendo de las condiciones ambientales (Leiter, 1998)

La incidencia de la diabetes y la sialoadenitis en hembras NOD es más alta que en machos, mientras que la dacryoadenitis se detectó más frecuentemente en machos (Pozzilli, 1993; Toda, 1999). El desarrollo de la sialoadenitis en el ratón NOD es acompañado por una disminución de la respuesta secretoria. Esto no se observa en la mayoría de los otros modelos murinos para el síndrome de Sjögren, y no es debido a la pérdida de regulación de la glucosa de la sangre en los ratones diabéticos (Hu, 1992; Humphreys-Beher, 1994), ya que estos dos procesos autoinmunes que conviven en el páncreas y en las glándulas submaxilares se ha demostrado que pueden ocurrir independientemente en el mismo animal (Gerling, 1992; Larger, 1995; Robinson, 1998a; Robinson, 1998b).

Anormalidades en las glándulas salivales

El comienzo de una reacción autoinmune puede ser debido a una anomalía en el sistema inmune y/o en el órgano blanco hacia el cual se dirige esta reacción. Se han obtenido evidencias que sugieren la existencia de anomalías genéticamente programadas en las glándulas exócrinas de los ratones NOD que pueden contribuir a la iniciación de la reacción autoinmune.

Primero, se ha demostrado que células dendríticas se acumulan en las glándulas submaxilares de los ratones NOD antes del desarrollo de los infiltrados linfocitarios (van Blokland, 2000). Estas células son excelentes presentadoras de antígeno que pueden activar linfocitos T vírgenes, y se les puede atribuir un rol en la iniciación de la sialoadenitis (Stingl, 1995; Peters, 1996). Sin embargo, no se observó esta acumulación de células dendríticas en glándulas submaxilares de ratones MRL/lpr o controles, (van Blokland, 2000). Tampoco fue identificada la señal responsable de la migración de células dendríticas a las glándulas, pero las anomalías metabólicas y/o del crecimiento de las células epiteliales de las glándulas submaxilares podrían desempeñar un papel en este proceso.

En segundo lugar, el análisis bioquímico de las muestras de saliva de ratones NOD-scid (que carecen de linfocitos B y T) reveló una variación en la composición proteica con respecto a los animales controles. Una isoforma



Introducción

anormal de la proteína secretoria de parótida (PSP) fue detectada en la saliva de NOD-scid y PSP fue expresada ectópicamente en glándulas submaxilares de NOD-scid (Robinson, 1996).

Tercero, la actividad creciente de cisteínproteasas y una elevada expresión de metaloproteasas que degradan la matriz celular fue observada en glándulas salivales de ratones NOD y NOD-scid (Robinson, 1997; Yamachika, 1998). Cuarto, los estudios realizados en glándulas submaxilares de ratones NOD neonatos demostraron un aumento en la expresión de proteínas que se relacionan con apoptosis (Fas, FasL, y Bcl-2), una disminución en la expresión de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, y una alteración de la morfología glandular (Cha, 2001). En conjunto, estos resultados sugieren que la alteración de la homeostasis en las glándulas submaxilares de los ratones NOD tendría un componente genético, y que puede contribuir al desarrollo de la sialoadenitis desde el período fetal.

Mecanismos involucrados en la fase efectora de los procesos autoinmunes

Se ha propuesto que la pérdida de la función secretoria que acompaña al desarrollo de la sialoadenitis de los ratones NOD es dependiente de linfocitos, ya que no fue observada en los ratones NOD-scid (Robinson, 1996). También se postuló un papel de los anticuerpos séricos por medio de observaciones realizadas en ratones NOD.Ig μ ^{null}, que carecen de linfocitos B, debido a que mantienen una normal función secretoria a pesar del desarrollo de infiltrados (Robinson, 1998 b).

La inoculación de suero de ratones NOD de 6 meses de edad en ratones NOD de 6 semanas dio lugar a una disminución de la respuesta secretoria en los ratones aceptores (Esch, 1998). Los autoanticuerpos presentes en el suero de los ratones NOD incluyen anticuerpos dirigidos contra tiroides, antígenos de células pancreáticas, células epiteliales acinares y ductales de la parótida y de glándulas submaxilares (Bernard, 1992; Humphreys-Beher, 1993; Leiter, 1998; Yu, 2000). Un bajo porcentaje de ratones, presentan anticuerpos contra una ribonucleoproteína SS-A/Ro de 52-kDa, sin embargo no fueron detectados anticuerpos dirigidos contra SS-B/La (Skarstein, 1995).

En seres humanos, una forma de la proteína citoesquelética α -fodrina de 120-kDa ha sido implicada en la patogénesis del síndrome de Sjögren (Haneji, 1997). Anticuerpos contra esta proteína de 120-kDa también se han encontrado en el suero de los ratones NOD, y la presencia de estos anticuerpos se correlacionó con la aparición de los infiltrados linfocitarios en glándulas salivales (Yanagi, 1998).



También se ha sugerido una interacción entre los anticuerpos y los receptores muscarínicos de acetilcolina M_3 en la fase efectora de la sialoadenitis en el ratón NOD (Robinson, 1998 b). Estos autoanticuerpos anti-receptor muscarínico M_3 ya habían sido descritos en el suero de pacientes con síndrome de Sjögren (Bacman, 1996, Pérez Leirós, 1999). Los receptores muscarínicos de acetilcolina son responsables del mantenimiento del flujo salival y se propuso que la interacción con estos autoanticuerpos podría explicar la disminución de la función secretoria en los NOD (Robinson, 1998 b). De hecho, la inoculación de anticuerpos anti- M_3 en NOD-scid dio lugar a una disminución de la respuesta secretoria (Nguyen, 2000).

Durante la fase inicial de la sialoadenitis se postuló que la apoptosis podría jugar un rol importante ya que se detectaron un número creciente de células epiteliales de glándulas submaxilares que se encuentran en estado apoptótico en ratones NOD de 18 semanas y en ratones NOD-scid (Kong, 1998). Sin embargo, en NOD-scid no se produce una disminución de la respuesta secretoria, con lo cual se podría cuestionar una contribución de la apoptosis a esta disfunción. En contraste con las observaciones de Kong, van Blokland y colaboradores (2003) no han podido detectar un aumento en el números de células apoptóticas en glándulas submaxilares de ratones NOD, pero sí fue observado un aumento en la expresión de Fas y FasL. Sin embargo esta controversia también existe en la participación de mecanismos apoptóticos en el desarrollo del síndrome de Sjögren en los seres humanos (Ohlsson, 2001).

La actividad de metaloproteasas se ha demostrado aumentada en saliva y en homogenatos de glándulas salivales de NOD de 20 semanas y en ratones NOD-scid. La expresión del ARN mensajero de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 se encontraba elevada en glándulas parótidas y submaxilares de ratones NOD con respecto a los controles (Yamachika, 1998). Estas enzimas, capaces de degradar los componentes extracelulares de la matriz, pueden conducir a la muerte de las células epiteliales, pudiendo estar implicadas en la fase inicial del proceso autoinmune.

Defectos en el sistema inmune

Los defectos en el sistema inmune de los NOD se cree que pueden contribuir a la iniciación de la respuesta autoinmune. En los ratones NOD se informó que las células presentadoras de antígeno tienen menor capacidad para estimular a las células T supresoras, mientras que conservan la capacidad de activar a las células T autorreactivas (Serreze, 1988; Piganelli, 1998). Este



Introducción

resultado se puede relacionar con una presentación antigénica por parte de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II relativamente inestable, una disminución en la expresión de CD86 en las células presentadoras de antígeno, una disminución en la producción del glutatión intracelular y de IL-1 por los macrófagos de los NOD, o con el metabolismo realzado de prostanoïdes en los macrófagos de los NOD (Serreze, 1988; Carrasco-Marin, 1996; Piganelli, 1998; Clare-Salzler, 1998). La estimulación de los linfocitos T con anti-CD3 da lugar a la regulación positiva de CD28 y de CTLA-4. Esto puede dar lugar a la incapacidad de controlar las respuestas de células T, y aumentar la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes (Dahlen, 2000).

Recientemente, se informó que la producción de citoquinas por parte de los macrófagos peritoneales de los NOD que fueron estimulados con LPS fue deficiente. Los macrófagos NOD estimulados con LPS produjeron niveles mayores de IL-12 con respecto a los controles (Alleva, 2000). Se observó que las células dendríticas de los NOD expuestas a diversos estímulos poseen una hiperactivación de NF- κ B, dando por resultado la expresión creciente de IL-12 (Weaver, 2001). La producción elevada de IL-12 por células presentadoras de antígeno en estos ratones podría dar lugar al corrimiento de la respuesta T hacia el fenotipo Th1 observado, predisponiendo al desarrollo de la autoinmunidad órgano-específica. Además, se demostró que la hiperactivación de NF- κ B da lugar a la estimulación de la capacidad estimulante creciente de las células T CD8⁺ y de las células dendríticas de los ratones NOD (Poligone, 2002).

Estructura y composición de los focos de infiltración

La composición de los infiltrados linfocitarios en glándulas submaxilares y lagrimales de los ratones NOD poseen un predominio de los linfocitos T CD4⁺ sobre los CD8⁺ y sobre linfocitos B (Takahashi, 1997; Yanagi, 1997; Robinson, 1998 c).

El desarrollo de los infiltrados linfocitarios en las glándulas submaxilares también coincide con la expresión creciente del ARN mensajero de las citoquinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IFN γ , y TNF α (Robinson, 1998 c, Yanagi, 1998; Yamano, 1999). Por inmunohistoquímica también se pudo visualizar la localización y expresión de citoquinas como IL-2, IL-10, IFN γ y TNF α en los linfocitos de los focos de infiltración de ratones de 20 semanas, pero no de IL-4 (Yamano, 1999). Esto hallazgos concuerdan con observaciones realizadas en pacientes con síndrome de Sjögren (Fox, 1994;



Introducción

Ogawa, 1995; Brookes, 1996; Ajjan, 1998; Sun, 1998). La expresión transgénica de un receptor soluble de TNF α en ratones NOD dio lugar a una infiltración perceptiblemente más baja de las glándulas exócrinas, sugiriendo un papel importante de TNF α en el desarrollo de los infiltrados linfocitarios en estas glándulas (Hunger, 1996).

En infiltrados linfocitarios de glándulas lagrimales de ratones NOD se detectó la expresión del ARNm de la quimioquina IP-10 (CXCL10) y de RANTES (CCL5) a partir de las 8 semanas de edad al igual que la aparición de infiltrados linfocitarios (Tomwall, 1999). El tratamiento de los ratones NOD con un anticuerpo contra RANTES a partir de la 6ª hasta la 11ª semana de edad dio lugar a una reducción significativa de la inflamación en la glándula lagrimal, sugiriendo una contribución importante de esta quimioquina al desarrollo de la dacrioadenitis.

Sin embargo, la expresión del ARNm de RANTES no se modifica en glándulas submaxilares de ratones NOD o NOD-scid antes del desarrollo de sialoadenitis y sí, en cambio, se observó un aumento de esta quimioquina, MIP-1 α y MCP-1 en glándulas submaxilares después del desarrollo de infiltrados linfocitarios en ratones NOD. Estos resultados indican que RANTES, MIP-1 α y MCP-1 pueden contribuir a la exacerbación de la respuesta autoinmune en glándulas submaxilares de ratones NOD.

Las anomalías intrínsecas en las glándulas salivales de los ratones NOD, junto con los defectos en el sistema inmune de este modelo murino, pueden conducir a la iniciación de la sialoadenitis. Los estudios en los ratones derivados del NOD en los cuales las anomalías en las glándulas salivales o en el sistema inmune se normalizan revelarán la contribución de ambos aspectos a la respuesta autoinmune.

RATONES MRL/lpr

Los ratones MRL/lpr surgen originalmente como modelo de lupus eritematoso sistémico (SLE) (Andrews, 1978). Estos ratones nacen a partir de la cepa de ratones MRL/n. Ambas subcepas se diferencian únicamente por la presencia o la ausencia de la mutación del gen lpr (linfoproliferación) que involucra el dominio extracelular del gen Fas (Watanabe-Fukunaga, 1992). La autoinmunidad también se produce en ratones MRL/Mp, pero el inicio de las manifestaciones de esta enfermedad es más lento y da lugar a una forma más suave de la misma, indicando que la mutación lpr acelera las causas de la enfermedad (Theofilopoulos, 1985; Carlsten, 1990). Se observó que posee una



Introducción

proliferación linfoide anormal con hiperactividad de las células B, presencia de autoanticuerpos, y complejos inmunes circulantes, conduciendo a una glomerulonefritis por complejos inmunes. Se describió que presentan una alta incidencia de inflamación sinovial y periarticular, similares a las producidas por la artritis reumatoide humana (Andrews, 1978; Hang, 1982). En un alto porcentaje de los ratones se detectaron infiltrados mononucleares en las glándulas salivales y lagrimales (Hang, 1982, Hoffman, 1984).

Una diferencia sustancial con la cepa de ratones NOD es que la infiltración en las glándulas salivales de los ratones MRL/lpr da lugar a la destrucción del tejido glandular, y ésta no es acompañada por una disminución en la respuesta secretoria (Hoffman, 1984).

La sialoadenitis en las glándulas submaxilares de ratones MRL/lpr se manifiesta alrededor de los 2 meses de edad en adelante, con igual incidencia en ambos sexos (Toda, 1999). La infiltración se desarrolla en las glándulas salivales mayores (submaxilares parótidas y sublinguales) pero en las últimas aparece más tardíamente y es menos pronunciada que en glándulas submaxilares (Jonsson, 1987). La infiltración focal en la glándula lagrimal de los ratones MRL/lpr es perceptible a partir del primer mes de edad en adelante, y ocurre más frecuentemente en las hembras (Jabs, 1991; Toda, 1999). Con lo cual, el cuadro histopatológico de la sialoadenitis en el ratón de MRL/lpr es notablemente diferente del patrón de la sialoadenitis de los ratones NOD y los humanos (Tabla 3).

Diversas características de los modelos murinos de síndrome de Sjögren en ratones MRL/lpr, ratones NOD y de la enfermedad en humanos se resumen en la tabla 3. Se puede observar que en el modelo MRL/lpr, el desarrollo de sialoadenitis y dacryoadenitis se asocia a fenómenos autoinmunes sistémicos y no es acompañado por una disminución en la secreción exócrina. El ratón NOD exhibe características de autoinmunidad específica de órgano, y los autoanticuerpos pueden contribuir a la disminución del flujo salival y lagrimal.



**Características de la sialoadenitis en ratones NOD y MLR/lpr
comparadas con el síndrome de Sjögren en humanos**

	Ratón NOD	Pacientes con SS	Ratón MRL/lpr
Distribución por Sexos	Sialoadenitis F>M Dacryoadenitis F > M	F>M	Sialoadenitis F=M Dacryoadenitis M> F
Otros órganos involucrados	Riñón Glándula Tiroides Páncreas Tejido nervioso Intestino grueso Músculo	Riñón Glándula Tiroides Páncreas Tejido nervioso Vasos sanguíneos Hígado Vejiga Estómago Sistema respiratorio Corazón articulaciones	Riñón Vasos sanguíneos Articulaciones
Composición de los infiltrados linfocitarios	Glándulas SM: cel T CD4 ⁺ > cel T CD8 ⁺ > cel B	Glándulas Salivales menores: cel T CD4 ⁺ > cel T CD8 ⁺ > cel B	Glándulas SM: cel T CD4 ⁺ > cel T CD8 ⁺ ; cel B
Autoanticuepros	Anti-SS-A/Ro 52 kDa Anti-120-kD α -fodrin Anti-R M ₃ muscarínicos Anti R β -adrenérgicos Anti-tiroides Anti antígenos de células β	Anti-SS-A/Ro 52 kDa Anti-SS-A/Ro 60 kDa Ab Anti-SS-B/La Factor reumatoide Anti-120-kD α -fodrin Anti-R M ₃ muscarínicos Anti-R M ₁ muscarínicos	Anti-SS-A/Ro 52 kDa Anti-SS-A/Ro 60 kDa Factor reumatoide
Pérdida de función secretoria	Sí	Sí	No

Tabla 3: Comparación de las principales características entre dos de los modelos de Síndrome de Sjögren y la enfermedad en humanos. Modificado de Pathogenesis of Sjögren's Syndrome: Characteristics of Different Mouse Models for Autoimmune Exocrinopathy (van Bocklands : 2002)



Introducción

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES

El término “glándula salival” es utilizado para referirse a cualquier tejido que descarga un producto de secreción hacia la cavidad oral (Young, 1979).

Se considera que las glándulas salivales forman parte del sistema digestivo debido a que se encuentran asociadas a la cavidad oral y en muchos casos elaboran las enzimas digestivas (Tandler, 2001). Sin embargo, numerosas evidencias demuestran que la secreción salival posee una importancia crítica para la defensa de los tejidos blandos de la cavidad oral como también de los dientes y de la parte superior del tracto digestivo (Edgar, 1992; Tabak, 1995). Además, también se ha sugerido que en diversas especies la secreción salival posee otras funciones entre las que destacan la adaptación en la secreción de feromonas para atracción sexual, la marcación territorial, mecanismos de defensa como la secreción de venenos o neutralización de toxinas en alimentos, el control de la flora bacteriana y efectos terapéuticos como cicatrizante (Tandler, 2001). De todos modos, la principal función de la saliva es humedecer y lubricar la cavidad oral y los alimentos, iniciando su digestión.

Localización

La saliva obtenida de la cavidad bucal es una mezcla de las secreciones de distintas glándulas salivales, entre las que se hallan las glándulas mayores llamadas parótidas, submaxilares y sublinguales. Además existen las denominadas glándulas menores que según su localización son labiales, bucales, linguales y palatinas. (Bloom, 1980) (esquema 1).

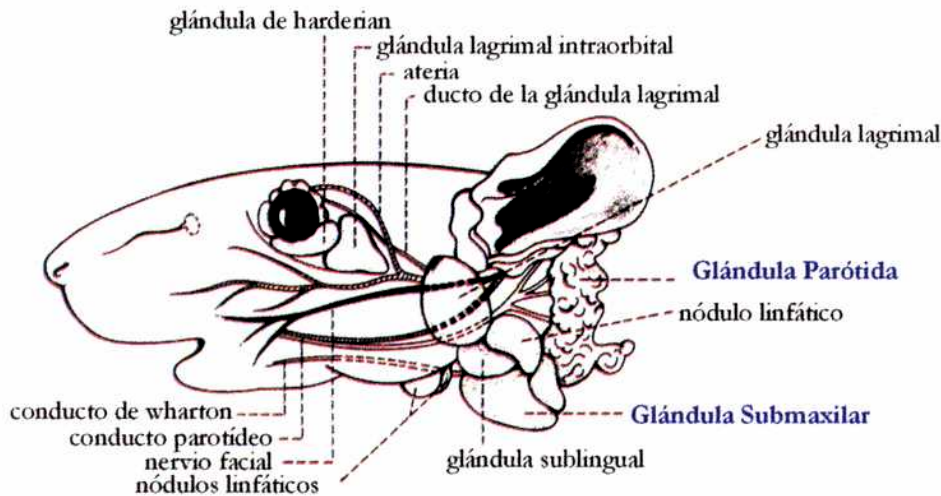
Las glándulas parótidas se encuentran situadas subcutáneamente en ambos lados de la cara, por detrás de la oreja, y se extienden desde el arco cigomático por arriba, hasta el ángulo de la mandíbula por debajo. Cada una se encuentra conectada a la cavidad bucal por un conducto parotídeo o conducto de Stenon.

Las glándulas submaxilares y sublinguales se localizan en el espacio que se encuentra entre la mandíbula y los músculos que forman el piso de la boca. Las glándulas submaxilares descargan su secreción en el piso de la boca a través del conducto de Wharton. A su vez, la descarga de la secreción de las

Introducción



glándulas sublinguales se produce a través de un conducto que termina en el conducto de Wharton de la glándula submaxilar.



Esquema 1: Glándulas superficiales de la cabeza y el cuello (vista lateral)

Organización estructural de las glándulas salivales

Las glándulas salivales están organizadas alrededor de un sistema de conductos ramificados que transportan la secreción hacia la cavidad bucal. Las células secretoras se encuentran dispuestas en acinos alrededor de las ramificaciones menores del sistema de conductos, formando numerosos lobulillos individuales que pueden considerarse unidades de secreción (esquema 2). Cada acino está limitado por una membrana basal definida y un epitelio acinar que contiene dos tipos de células secretoras: las células serosas y las células mucosas. Las glándulas parótidas, en la mayoría de las especies, están compuestas enteramente por acinos serosos, mientras que las submaxilares y las sublinguales son mixtas y contienen ambos tipos celulares aunque en distinta proporción. En las glándulas submaxilares predominan las células serosas mientras que en las sublinguales la proporción es menor. (Ham, 1975)

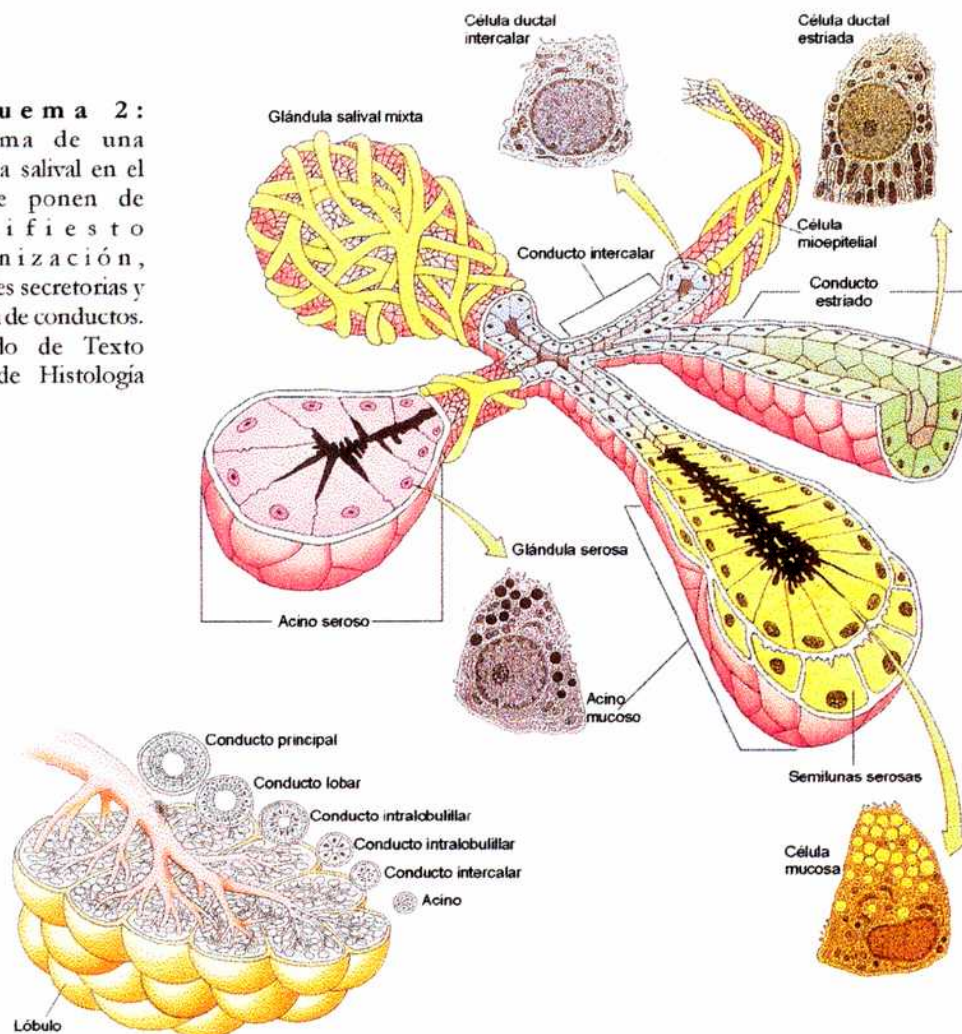
La organización histológica y citológica de estas glándulas exócrinas refleja la existencia de mecanismos para la síntesis y transporte de proteínas y glucoproteínas, como también para el transporte de agua y electrolitos hacia la cavidad bucal. La estructura de las células serosas es de forma piramidal conteniendo núcleos basales y límites celulares poco definidos. Su citoplasma basal y perinuclear es basófilo, y su citoplasma apical contiene gránulos de secreción que varían en número de acuerdo con el estado funcional. En un nivel ultraestructural, las células serosas poseen características típicas de las

Introducción



células que producen proteínas para exportación: un abundante retículo endoplasmático (RE) rugoso y gránulos de secreción ubicados dentro de las membranas del complejo de Golgi. En cambio, las células mucosas de las glándulas salivales son variaciones de las células caliciformes intestinales. El citoplasma puede estar lleno de numerosas gotas de mucígeno. Estas gotas reaccionan intensamente con el ácido peryódico del reactivo de Schiff (PAS) ya que contienen glucoproteínas neutras. La ultraestructura de las células mucosas muestra que la mayor parte del citoplasma supranuclear se encuentra ocupado por gotas de secreción que derivan del gran complejo de Golgi supranuclear. A medida que la secreción se acumula, las mitocondrias y el RE rugoso quedan relegados al citoplasma lateral y basal (foto 4).

Esquema 2:
Esquema de una glándula salival en el que se ponen de manifiesto organización, unidades secretoras y sistema de conductos. Extraído de Texto Atlas de Histología





Introducción

Control nervioso de la secreción salival

En general, el sistema nervioso autónomo (SNA) regula la función de las estructuras que no se encuentran bajo el control voluntario y que funcionan fuera del nivel del conocimiento. Por lo tanto, respiración, circulación, digestión, secreciones de algunas glándulas exócrinas son reguladas en parte o por completo por el sistema nervioso autónomo. La función exócrina de las glándulas salivales consiste en dos procesos integrados: la producción del fluido secretado y la regulación de la exocitosis. Ambos procesos se encuentran bajo control del sistema nervioso autónomo.

El control del sistema nervioso autónomo a menudo comprende una retroalimentación negativa por fibras aferentes que llevan información a los centros en el hipotálamo y la médula. Estos centros controlan el flujo del sistema nervioso autónomo que se divide anatómicamente en dos grandes sistemas: el sistema simpático y el parasimpático. Estos sistemas, en general, tienen acciones opuestas, sin embargo, contrariamente a lo que se observa en otros órganos, en las glándulas salivales de mamíferos estas dos divisiones no actúan antagonicamente sino en forma cooperativa contribuyendo de manera diferenciada a la producción de saliva (Emmelin, 1987; Garret, 1987 a y b).

El neurotransmisor principal de todas las fibras preganglionares y de las fibras postganglionares parasimpáticas (fibras colinérgicas) es la acetilcolina. Las fibras adrenérgicas constituyen la mayor parte de las fibras simpáticas postganglionares. El neurotransmisor principal liberado en estas fibras adrenérgicas es la noradrenalina. La noradrenalina produce sus acciones sobre los órganos efectores al actuar sobre adrenorreceptores del tipo α o β . En cambio, las terminales nerviosas de las fibras colinérgicas liberan acetilcolina que, en los órganos efectores, activa receptores muscarínicos. En las glándulas salivales de rata se ha identificado una población mayoritaria de receptores muscarínicos del subtipo M_3 , y una minoritaria de receptores del subtipo M_1 (Laniyonu, 1990; Rosignoli, 2002). De la rama simpática del sistema nervioso autónomo, las glándulas salivales presentan receptores adrenérgicos del subtipo α_1 , α_2 ; β_1 y β_2 (Gallacher, 1982; Soltoff, 1993).

La activación de los receptores M_3 conduce a la activación de fosfolipasa C (Laniyonu, 1990; Dai, 1991), producción de inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP_3) (Hughes, 1989; Larsson, 1989), incremento en la concentración intracelular de calcio (Irvine, 1985; Merritt, 1987; Nautorfte, 1987; Gray, 1988; Menniti, 1991), aumento de la producción de óxido nítrico (Lohinai, 1995; Pérez Leirós, 1999; Rosignoli, 2002) y producción de GMPc (Sugiya, 1998; Michikawa, 1998; Pérez Leirós, 2000; Rosignoli, 2002) (esquema 3).

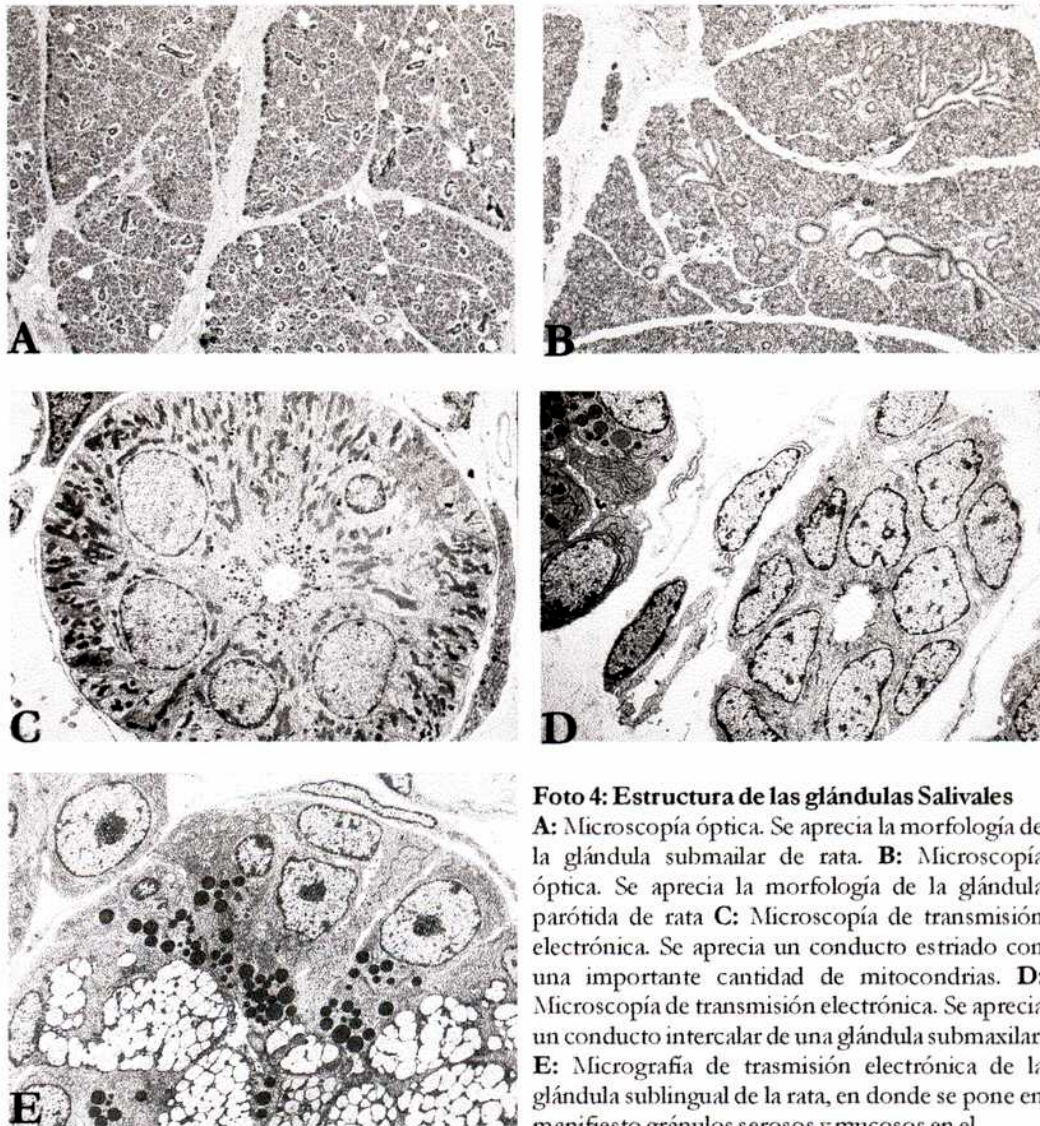
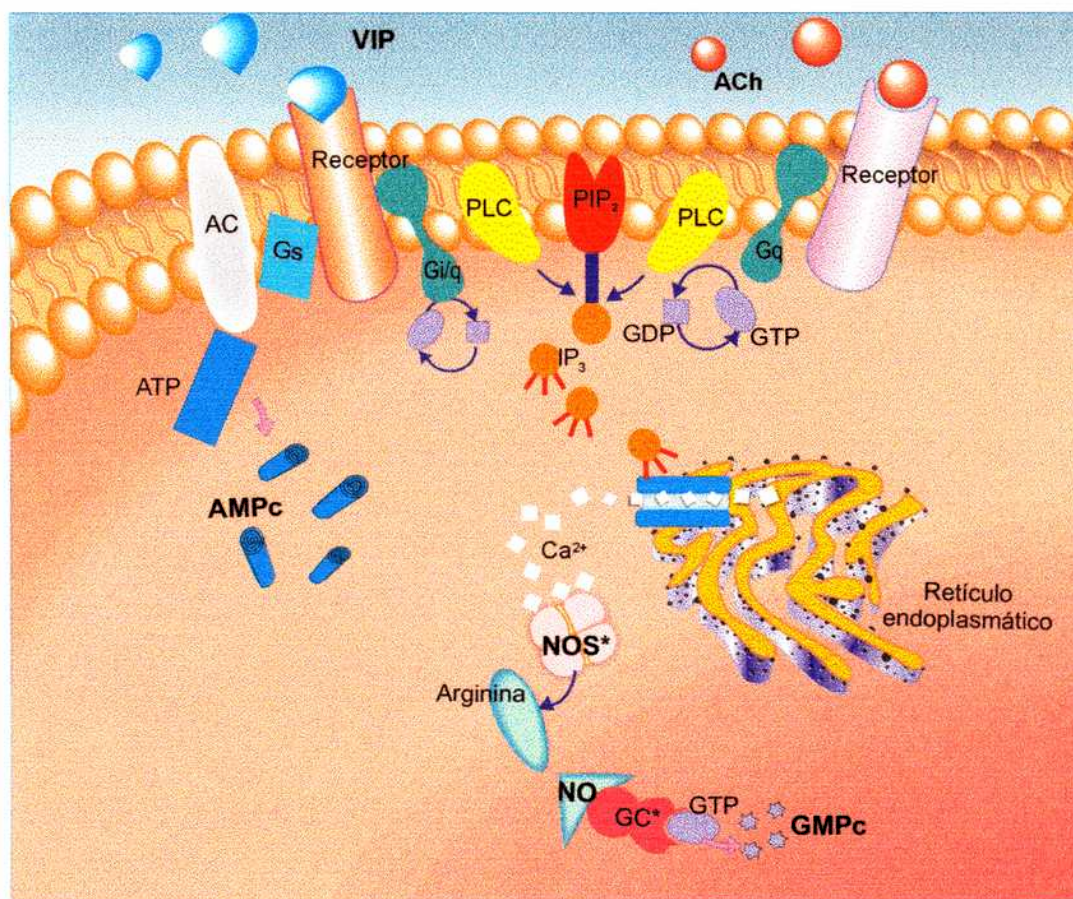


Foto 4: Estructura de las glándulas Salivales

A: Microscopía óptica. Se aprecia la morfología de la glándula submailar de rata. **B:** Microscopía óptica. Se aprecia la morfología de la glándula parótida de rata **C:** Microscopía de transmisión electrónica. Se aprecia un conducto estriado con una importante cantidad de mitocondrias. **D:** Microscopía de transmisión electrónica. Se aprecia un conducto intercalar de una glándula submaxilar. **E:** Micrografía de trasmisión electrónica de la glándula sublingual de la rata, en donde se pone en manifiesto gránulos serosos y mucosos en el

citoplasma de sus células acinares y un abundante retículo endoplasmático. Fotos extraídas de la Escuela de Medicina Dental, Universidad de Connecticut.

Por su parte, la activación de los receptores α_1 adrenérgicos también lleva a la producción de IP_3 con el consiguiente aumento del calcio intracelular (Nautrofte, 1987; Brinck, 1989). En cuanto a la estimulación de los receptores β -adrenérgicos, media un aumento en los niveles intracelulares de AMPc en glándulas parótidas de ratas (Schramm, 1970; Rosignoli, 2002). Numerosos grupos han mostrado que esta activación que incrementa los niveles de AMPc en glándulas parótidas (Batzri, 1973; Butcher, 1975), produce también un aumento del calcio intracelular (Scott, 1985; Mills, 1991; Watson, 1990).



Esquema 3: Señalización intracelular de receptores muscarínicos y de VIP en glándulas salivales.

La visión del sistema nervioso autónomo con dos neurotransmisores principales, acetilcolina y noradrenalina, se ve profundamente modificada a fines de la década del 70 con el descubrimiento de diversos péptidos neurotransmisores en el sistema nervioso central. En buena parte esto es debido al trabajo de Burnstock y sus colaboradores que en la década de 1960 y en adelante, estudiaron la existencia de respuestas autonómicas dependientes de otros mecanismos de transmisión que no eran las clásicas vías colinérgica y adrenérgica (Burnstock, 1986). Este fenómeno se llamó transmisión no adrenérgica no colinérgica (NANC). Sin embargo este fenómeno, en realidad, ya había sido descrito en el siglo pasado como respuestas “resistentes a atropina” en la estimulación parasimpática. Estas observaciones incluyen el incremento del flujo sanguíneo en las glándulas salivales por Heidenhain en 1872 (Heidenhain, 1872) y la contracción de la vejiga urinaria por Langley y Anderson en 1895 (Langley, 1895) entre otros. Actualmente se reconoce que dentro de la transmisión NANC se encuentran sustancias como purinas, ATP o adenosina, eicosanoides y péptidos como encefalina, sustancia P, neuropéptido Y, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y somatostatina que son liberados por diferentes terminaciones nerviosas junto con el neurotransmisor



Introducción

principal (Goodman & Gilman, 1996). Por ejemplo, el VIP se localiza de manera selectiva en neuronas colinérgicas periféricas que inervan glándulas exocrinas, y el neuropéptido Y se encuentra en las terminaciones nerviosas simpáticas.

Estas sustancias pueden despolarizar o hiperpolarizar a las terminaciones nerviosas o a las células postsinápticas. Más aún, los resultados de estudios histoquímicos, inmunocitoquímicos y autorradiográficos han demostrado que más de una de estas sustancias se encuentra en las mismas neuronas que contienen uno de los transmisores aminos clásicos (Bartfai, 1988). Estas observaciones sugieren que, en muchos casos, la transmisión sináptica está mediada por la descarga de más de un neurotransmisor.

Los estudios iniciales de Hökfelt y colaboradores (Lundberg, 1979), que demostraron la existencia del VIP y acetilcolina en las neuronas autonómicas periféricas, despertaron interés por la posibilidad de cotransmisión peptidérgica en el sistema nervioso autónomo. Las investigaciones posteriores han confirmado la relación frecuente de estas dos sustancias en las fibras autonómicas, incluso las parasimpáticas que inervan a los vasos sanguíneos y a las glándulas exócrinas y en las neuronas simpáticas colinérgicas que inervan a las glándulas sudoríparas (Lindh, 1990). En el sistema donde se ha estudiado con mayor amplitud la función del VIP como neurotransmisor es en la transmisión parasimpática que regula la secreción salival.

Secreción de agua y electrolitos

En roedores las glándulas salivales no segregan saliva en ausencia de un estímulo secretomotor, y cuando se estimula, segregan grandes cantidades durante un período corto. En 1861 Carl Ludwig reconoció que la secreción no era un filtrado plasmático sino que para generarla era fundamental la inducción de cambios celulares desencadenados por estimulación autonómica. Esto fue posteriormente confirmado con la demostración que las glándulas aisladas pueden secretar por largos períodos, inclusive cuando las mismas no son perfundidas por el sistema vascular (Bonting, 1980).

Tomó mas de cien años para hacer avances significativos en la composición de los mecanismos que gobiernan la secreción del volumen salival. En 1954 Thaysen y col (1954) demostraron que el contenido de solutos salivales aumentaba conforme a la tasa de secreción. Sus observaciones en las relaciones entre Na^+ y Cl^- salival y el aumento de la tasa de secreción, permitieron postular un modelo de secreción compuesto por dos etapas: Primero se formaría una saliva primaria rica en el contenido de Na^+ que secundariamente se modificaría en los conductos por medio de la reabsorción



Introducción

de NaCl de manera análoga a la reabsorción de glucosa observada en los túbulos proximales renales. Thaysen extendió sus hipótesis postulando que la secreción primaria sería, en su contenido electrolítico, isotónica con respecto al plasma (constante en Na^+ , K^+ y Cl^-), y que la estimulación secretomotora aumentaría la tasa de secreción sin alterar su componente electrolítico primario (Thaysen, 1960). También postuló que la saliva primaria se modificaría durante el pasaje por la sección ductal (sección secundaria), secretándose K^+ y reabsorbiéndose Na^+ a través de un epitelio ductal impermeable al agua.

Desde los tiempos de Thaysen hasta nuestros días se han dilucidado diversos mecanismos involucrados en la secreción salival por medio de técnicas de micropunción (Martínez, 1966), confirmando el modelo de Thaysen. Así, se ha descrito la composición de la saliva en dos estadios, primario (isotónica) y secundario (hipotónica).

Como se mencionó anteriormente, los conductos salivales tienen la capacidad de modificar la secreción salival aportando componentes proteicos a la saliva final o modificando el contenido y nivel electrolítico salival. Son los conductos contorneados granulares los responsables de la secreción de la mayor parte del contenido proteico presente en la saliva, y los conductos estriados los más relevantes en la reabsorción e intercambio electrolítico involucrado en la formación de la saliva final hipotónica (saliva secundaria).

Acetilcolina, VIP y noradrenalina son los principales transmisores del sistema secretomotor autónomo de agua y electrolitos a través de la activación de receptores muscarínicos de acetilcolina M_3 , de VIP, VPAC_{1y} , VPAC_2 y α_1 adrenérgicos, respectivamente (Turner, 1990; Dai, 1991; Quissell, 1992). Es importante destacar que en humanos el tono basal de las glándulas exócrinas es parasimpático, es decir que acetilcolina y VIP son los principales responsables de la secreción basal de saliva y, de hecho, la terapéutica farmacológica empleada en pacientes con xerostomía se basa en drogas agonistas de receptores muscarínicos (Fox, 2001; Scully, 2003; Taylor, 2003).

Secreción proteica

Muchas proteínas son sintetizadas en los acinos glandulares y volcadas a la saliva aunque algunas proteínas y esteroides entran a la saliva a través de la ruta transepitelial. También se destacan una serie de proteínas que son sintetizadas y excretadas a la saliva desde las células ductales, entre las cuales se encuentra el factor de crecimiento nervioso (NGF), enzimas digestivas como la ribonucleasa y α -amilasa y varias proteasas (incluyendo



Introducción

enteroproteasas homeostáticas como calicreína y tonina). Los conductos también sintetizan una serie de péptidos regulatorios como glucagon y somatostatina. La secreción proteica es activada principalmente por noradrenalina y VIP (Evans, 1996; Hodges, 1997).

BIOSÍNTESIS DEL ÓXIDO NITRICO

El óxido nítrico (NO) se piensa que puede ser una de las moléculas más antiguas en la Tierra, presente ya en la primitiva atmósfera del planeta (Moncada, 1993). Hasta hace poco tiempo, el NO, un óxido de nitrógeno tóxico producido por los motores de combustión interna y las centrales eléctricas, era considerado solamente como una causa de la lluvia ácida y de la contaminación atmosférica. El científico belga Jan Baptista van Helmont (1577-1644), conocido más extensamente por su descubrimiento del dióxido de carbono, puede ser acreditado como la primera persona en sintetizar NO en el laboratorio alrededor del 1610, experimento realizado para explicar la acción de la pólvora por la teoría de la expansión gaseosa. (Brennan, 2003).

Los efectos del NO como un agente bactericida fueron investigados en los años 80, pero no fue sino hasta 1987 que el NO fue descubierto como el producto químico responsable de las acciones del factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Palmer, 1987; Ignarro, 1987). En reconocimiento de este hallazgo, se han concedido dos premios Nobel de Medicina a investigadores en el campo del NO y también fue nombrada molécula del año por la revista Science en 1992.

Aunque los trabajos iniciales se concentraron en su papel en la regulación del tono vascular, pronto se observó que el NO tenía una amplia gama y una divergencia de acciones fisiológicas y patológicas. Muchos de estos procesos todavía no se han comprendido en su totalidad. Diversas especialidades de la medicina y de la ciencia están implicadas ahora en la investigación del NO, implicado en varias condiciones médicas que incluyen desde el shock séptico a la impotencia (tabla 4).

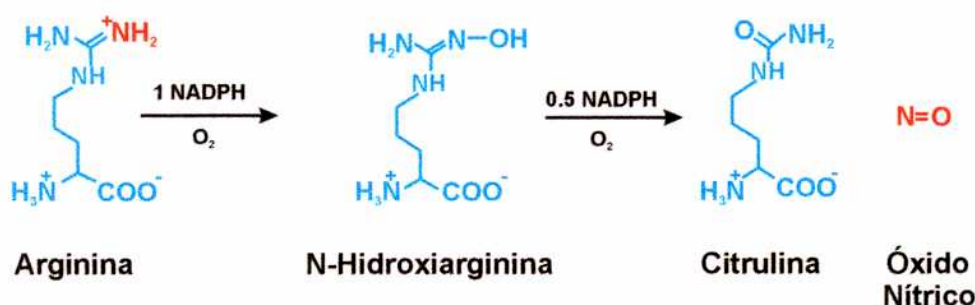


Enfermedades y condiciones que se asocian con una alteración en la producción de óxido nítrico.

Hipertensión e hipotensión	Fallo renal
Enfermedades trombóticas	Deficiencia inmune
Shock séptico	Encefalopatía inducida por HIV
Broncoespasmo	Impotencia
Hipertensión pulmonar	Depresión

Tabla 4: Enfermedades asociadas con una alteración en la producción de NO

La síntesis del NO es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que utiliza al O_2 como co-sustrato para dar como productos finales NO y citrulina. El primer paso en la biosíntesis del NO es la hidroxilación del nitrógeno de grupos guanidinio de la L-arginina. En este proceso se incorpora oxígeno molecular y se produce NO y citrulina en cantidades equimolares. La reacción es una oxidación por cinco electrones y requiere de un número de cofactores relativamente alto: calcio, calmodulina (CaM), tetrahydrobiopterina (BH_4), FAD, FMN y un grupo hemo (Knowles, 1994; Marletta, 1994; Nathan, 1994). Es relevante remarcar que el producto secundario de la reacción, la citrulina, es reciclada nuevamente a L-arginina, tan sólo incorporando un nitrógeno, muy posiblemente a través de la formación del ácido L-argininosuccínico (Hecker, 1990). Este ciclo de la urea modificado tiene dos funciones, un rol secretorio para regenerar la L-arginina para la síntesis de NO y un rol excretorio para eliminar los excesos de nitrógeno generados por el metabolismo celular (Ånggård, 1994). La reacción de síntesis de óxido nítrico procede entonces como una oxidación secuencial de L-arginina (Kerwin, 1995) (esquema 3).



Esquema 4: Síntesis del óxido nítrico

Hasta el momento se han identificado tres isoformas de la NOS. Estas fueron llamadas isoforma neural (nNOS, NOS I, NOS-1) cuya localización es

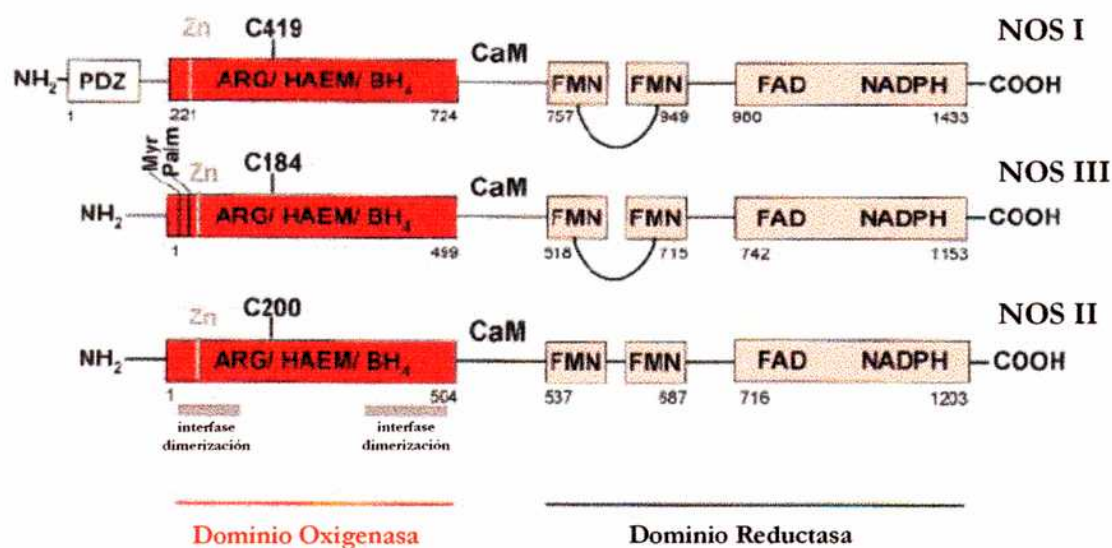


predominantemente en tejido nervioso, la isoforma inducible (iNOS, NOS II, NOS-2) detectada luego de la estimulación por diversos factores en una amplia variedad de células y tejidos y la isoforma endotelial (eNOS, NOS III, NOS-3) que se localiza mayoritariamente en células de tejido endotelial. Estas isoformas, han sido en el pasado diferenciadas sobre la base de su expresión constitutiva (NOS III y NOS I) versus su expresión inducible (NOS II). Sin embargo la detección de NOS II en tejidos en condiciones basales así como la regulación de la expresión de las isoformas “constitutivas” ante diversos estímulos sugieren que la identificación NOS I, II y III es más adecuada que las notaciones referidas a localización o expresión.

Estructura y función de las isoformas de NOS

Existen tres genes distintos de copia simple para las isoformas NOS I, II y III en el genoma haploide humano. Los genes de la NOS tienen entre un 51 y un 57 % de homología en su estructura genómica, lo que sugiere que provienen de un gen NOS ancestral común (Alderton, 2001).

Las NOS están formadas por dos homodímeros y cada polipéptido de NOS comprende dos dominios. Un dominio oxigenasa N-terminal y un dominio reductasa C-terminal, con un sitio de reconocimiento para CaM que se encuentra localizado entre los dos dominios (McMillan, 1995; Richards, 1994; Ghosh, 1995). En el dominio oxigenasa se halla parte del sitio de unión de la CaM, el sitio de unión del grupo hemo y BH_4 , y en el dominio reductasa se encuentran los dominios de unión de FMN, FAD y NADPH.



Esquema 5: Estructura de los dominios de NOS I, NOS II, NOS III. Modificado de Alderton, 2001.



El NO es sintetizado en un gran número de tejidos y participa en una variedad de funciones. La regulación de la actividad de NOS para que el NO desempeñe esta variedad de funciones es compleja. La expresión, localización intracelular y actividad de las isoformas de NOS en células y tejidos pueden ser reguladas a nivel transcripcional (Förstermann, 1998; Geller, 1998) y post-traducciona. En la tabla se resume la información sobre esta regulación por interacciones proteína-proteína, splicing alternativo de ARNm y modificaciones covalentes.

Regulación de la expresión, localización y actividad de las isoformas de NOS			
Tipo de regulación	NOS I	NOS III	NOS II
“splicing” alternativo de RNAm	Sí	No descrito	Sí
Interacciones Proteína-proteína	CaM/Ca ²⁺ , dominios PDZ, PIN, caveolin-1	CaM/Ca ²⁺ , caveolin-1 y -3, ENAP-1	CaM/Ca ²⁺ ,
Modificaciones Covalentes	Hsp90 Fosforilación	Hsp90 Miristoilación, Palmitoilación, Fosforilación	No descrito

Tabla 6: Regulación de los mecanismos de las isoformas de NOS

Inhibición de la actividad de NOS

Existe una variedad muy amplia de inhibidores de NOS que son usados como herramientas en bioquímica y farmacología. De éstos los más extensamente usados son N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), y aminoguanidina. La tabla 6 demuestra la potencia relativa de algunas de estas drogas para inhibir la actividad de las tres isoformas de la NOS.

La mayoría de los inhibidores identificados hasta ahora son competitivos con el sustrato L-arginina. También se ha descrito que su forma de acción depende de las condiciones *in vivo* o *in vitro*, así como del tiempo de incubación y el mecanismo de inhibición. Es frecuente que posean una dependencia con el tiempo para la inhibición de las diferentes isoformas de la NOS (Bryk, 1999). Por ejemplo, la preincubación del inhibidor con la enzima y los sustratos (Ej. 15 minutos) da una predicción mucho mejor de la eficacia y



Introducción

de la selectividad en tejidos intactos e *in vivo*. Sin la preincubación, puede conducir a una subestimación muy significativa de la potencia de los inhibidores de inicio lento. Puesto que los tiempos de la exposición *in vivo* en uso experimental o clínico probablemente serían de 30 minutos es crucial determinar la dependencia del tiempo para predecir la potencia y selectividad de los inhibidores (Alderton, 2001).

En la búsqueda de inhibidores selectivos de NOS I (Babu, 1998), se han descrito algunos aminoácidos que son parcialmente selectivos para los NOS I respecto de NOS III y NOS II. Por ejemplo, el S-etilo, S-metil-L-thiocitrullina (Furfine, 1994; Narayanan, 1995) y vinil-L-NIO (Babu, 1998) presentan un tipo de inhibición dependiente del tiempo, con una selectividad significativa para NOS I frente a las enzimas purificadas NOS III y NOS II. Sin embargo, tanto S-etilo como S-metil-L-thiocitrullina poseen menor selectividad en experimentos *in vivo* en tejidos enteros de rata, planteando preguntas sobre su utilidad como herramientas farmacológicas. (Furfine, 1994; Narayanan, 1995; Babu, 1998). Otro que se ha usado como inhibidor de la NOS I es el compuesto 7-nitroindazole (7-NI) debido a que este compuesto inhibe algunos procesos asociados a la isoforma neural sin causar aumento de la presión arterial (un efecto biológico atribuido a la isoforma endotelial). Sin embargo no se debe describir como inhibidor selectivo de la NOS I ya que en presencia de la enzima purificada no se pudo demostrar ninguna selectividad frente a las otras isoformas (Handy, 1998).

IC ₅₀ (μM)			
Inhibidor	NOS II	NOS I	NOS III
L-NNA	3.1	0.29	0.35
L-NMMA	6.6	4.9	3.5
7-NI	9.7	8.3	11.8
Amino-guanidina	31	170	330
GW273629	8.0	1000	78
GW274150	1.4	145	466

Tabla 6: Selectividad de los inhibidores de NOS. La IC₅₀ se define comúnmente como la concentración de la droga en la cual la respuesta ha disminuido hasta el 50% de la respuesta total.

El mecanismo de acción de los inhibidores de la NOS II se basa en el requerimiento de la enzima activa y del sustrato NADPH permitiendo que la



Introducción

inhibición proceda por un atascamiento relativamente débil de la enzima. El inhibidor más ampliamente usado es la aminoguanidina, sin embargo no se debe describir como inhibidor selectivo (Misko, 1993; Wolff, 1995; Bryk, 1999) ya que esta droga tiene selectividad parcial para la NOS II respecto de la NOS III, y la selectividad es mínima para la NOS I. Más aún, hay que tener en cuenta que la aminoguanidina posee una amplia gama de otros efectos, como por ejemplo, inhibe la formación del producto final de glucosilación de la diamina oxidasa, el metabolismo de poliaminas (Bieganski, 1983; Seiler, 1985; Nilsson, 1996) y de la catalasa (Ou, 1994) y también tiene efectos antioxidantes (Giardino, 1998; Yildiz, 1998). Otros inhibidores de la NOS II utilizados son los derivados de las acetamidas como el N⁵-iminoethyl-L-ornithine (L-NIO), el de N⁶-iminoethyl-L-lisina (L-NIL) (McCall, 1991; Wolff, 1995; Garvey, 1997; Grant, 1998), GW273629 y GW274150 (Alderton, 2000; Knowles, 2000). El GW273629 y GW274150 son los dos últimos inhibidores que se han identificado derivados de una serie de aminoácidos de acetamida. Poseen un grado muy alto de selectividad para la NOS II con respecto a NOS III y NOS I (Young, 2000). Ambos son aminoácidos sustituidos en el sulfuro de la acetamida que compite con la L-arginina.

Regulación de la biosíntesis de óxido nítrico

Regulación de la localización de las isoformas de NOS

Miristoilación, palmitoilación

La NOS III es la única isoforma que posee como modificaciones postraduccionales la miristoilación y la palmitoilación (Liu, 1995). Estas modificaciones redundan en la localización de la enzima predominantemente asociada a la membrana plasmática, pero no suponen cambios significativos en la actividad de la enzima.

Caveolina

Los dominios oxigenasa de la tres isoformas de la NOS contienen motivos de unión a las caveolinas, que son una familia de proteínas que se encuentran implicadas en una variedad de funciones celulares que incluyen eventos de transducción de señales. La caveolina-1 se puede unir a la NOS III y la caveolina-3 se une a la isoforma neuronal inhibiendo la síntesis de NO y esta inhibición es reversible por Ca²⁺/CaM (Venema, 1997).

Además, los 220 aminoácidos de la región N-terminal de la NOS I contienen el dominio PDZ. La asociación de la NOS I a la membrana de las



Introducción

neuronas se realiza por este dominio (Brenman, 1996). A su vez, el dominio PDZ de la isoforma neural puede interaccionar con el C-terminal de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Christopherson, 1999). Las consecuencias biológicas de esta interacción no se conocen bien aún.

Regulación de la actividad de NOS

Se han descrito diversos mecanismos de regulación de la actividad de la óxido nítrico sintasa que incluyen el control a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona.

El aumento de los niveles transcripcionales de la isoforma NOS II es el que se encuentra más ampliamente estudiado, en los cuales se incluye la estimulación de macrófagos murinos por LPS e Interferón γ (Xie, 1992; Xie, 1993; Lorsbarch, 1993). También se ha descrito un control transcripcional de una isoforma sobre otra, por ejemplo, en músculo esquelético de cobayos y en cerebro de rata después del tratamiento *in vivo* con LPS o Interferón γ se observa la regulación negativa de la expresión del ARN mensajero de NOS I (Bandyopadhyay, 1997).

Controles post-transcripcionales de NOS II se han observado en macrófagos murinos que fueron tratados con TGF- β . Dicho tratamiento desestabiliza al ARN mensajero de la NOS II por lo cual decrece su traducción (Vodovotz, 1993).

Entre los mecanismos de control post-traducciona de la biosíntesis de óxido nítrico vale destacar la estabilidad de la proteína, la disponibilidad y unión de sustratos y cofactores y la fosforilación que se describen más adelante.

Por último se informó sobre la regulación de la actividad de la óxido nítrico sintasa por un inhibidor proteico (PIN) en la región N-terminal de la NOS I que contiene un sitio de unión para la proteína PIN (Jaffrey, 1996). Sin embargo la información es contradictoria en cuanto a la capacidad de esta proteína para inhibir la actividad de NOS. Los primeros trabajos sobre esta proteína indicaban que únicamente NOS I se encontraba asociada a PIN y que PIN era capaz de desestabilizar la estructura dimérica de NOS I (Jaffrey, 1996). Sin embargo, recientemente se indicó que PIN no inhibe la NOS I promoviendo su monomerización (Rodríguez-Crespo, 1998) y se le atribuye un rol en el transporte axonal de la NOS I más que como regulador de la misma (Hemmens, 1998; Rodríguez-Crespo, 1998).



Disponibilidad de Sustratos y Cofactores

Durante la síntesis del NO la flavin reductasa adquiere electrones del NADPH y los transfiere al hierro del grupo hemo, lo cual permite la unión y activación del O_2 y así catalizar la síntesis del NO (McMillan, 1995). En la NOS III y la NOS I, la transferencia de electrones del flavin al grupo hemo es gatillada por la unión de la CaM, que explica la dependencia de Ca^{2+} y CaM en la síntesis de NO por estas isoenzimas. En la NOS II de ratón la unión de CaM es esencialmente irreversible (Cho, 1992), esto es consistente con el hecho que la NOS II se encuentra constantemente activa una vez que es sintetizada.

Por otra parte la disponibilidad de sustrato L-arginina puede disminuir por dos mecanismos la actividad de NOS. Estos mecanismos son la reducción de la captación de la arginina por el tejido (Wu, 1998), y el aumento de la actividad de arginasa, una enzima que utiliza la L-arginina para dar L-orinitina y urea (Strayer, 2004).

La arginasa clásicamente es considerada una enzima del ciclo de la urea en el hígado, pero también se encuentra presente en otros tejidos que no expresan el ciclo completo de la urea como es el caso del pulmón (Que, 1998; Wu, 1998). La función biológica de la arginasa extrahepática no es del todo conocida, pero se encuentra implicada en la regulación de la síntesis de óxido nítrico y el crecimiento celular en condiciones inflamatorias. Por ejemplo, en macrófagos activados la arginasa limita la utilización de L-arginina por NOS II, inhibiendo la citotoxicidad (Boucher, 1999; Wu, 1998; Hey, 1997).

La expresión de la arginasa de tipo I, una de las dos isoformas existentes, es aumentada por las citoquinas derivadas de células Th_2 como son IL-4, IL-10 e IL-13, como también por estímulos que puedan elevar los niveles de AMPc como son las prostaglandinas E_2 (Modollet, 1995; Wei, 2000), que se encuentran involucradas en la inflamación de las vías respiratorias en el asma.

Además, el producto de la arginasa L-orinitina inhibe el transporte de la L-arginina y la actividad de NOS parece ser más sensible a la disponibilidad reducida de sustrato que la arginasa (Hammermann, 1999).

Fosforilación

Se ha demostrado que la fosforilación ejerce un efecto en la actividad de las isoformas NOS I y NOS III. Recientemente algunos laboratorios han



Introducción

identificado dos sitios específicos de fosforilación de la NOS III: la treonina-497 en la secuencia bovina y la serina-1179. En estudios en un modelo de estrés mecánico se observaron incrementos en la fosforilación de NOS III y un aumento en la actividad independiente de calcio (Corson, 1996; Fisslthaler, 2000). Otros estudios en este sistema muestran que la NOS III es fosforilada por la proteína quinasa Akt (Dimmeler, 1999; Fulton, 1999). Asimismo en diversos sistemas donde la NOS III juega un rol preponderante, se ha probado que para su fosforilación interviene el sistema de fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt produciendo un incremento en el NO sin incremento de las concentraciones de calcio intracelular (McCabe, 2000; Haynes, 2003; Peng, 2003).

En contraste, la fosforilación de NOS I conduce en la mayor parte de los tejidos estudiados a una disminución en la actividad de la enzima (Brune, 1991; Bredt, 1992; Hagashi, 1999). Estos autores han observado una regulación negativa de la actividad de NOS por fosforilación vía proteína quinasa A (PKA), C (PKC) y quinasa dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina (CaMK). Si bien existe bastante controversia sobre cuál o cuáles quinasas intervienen en la regulación, recientemente se ha demostrado en cultivos de células de cerebelo y en hipocampo que la fosforilación de NOS I por CaMK II tendría un papel clave y se ha identificado el residuo Ser 847 como el que estaría implicado en este efecto (Nakane, 1991; Hayashi, 1999; Komeima, 2000; Krainock, 2001; Osuka, 2002). En el caso particular de las glándulas salivales es muy poca la información disponible en cuanto a regulación de la actividad de NOS por fosforilación, al respecto hemos descrito recientemente una regulación negativa de la actividad de NOS por PKC en glándulas submaxilares (Pérez Leirós, 2000) y parótidas (Rosignoli, 2002b) de rata.

PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA SECRECIÓN

Uno de los principales blancos del NO es el grupo hemo de las guanilil ciclasas solubles, al cual se unen activando la síntesis de GMP cíclico (GMPc) que puede actuar en numerosos blancos celulares incluyendo los canales iónicos activados por GMPc, fosfodiesterasas dependientes de GMPc (PDE) y proteínas quinasas dependientes de GMPc (PKG) (Schmidt, 1993). Otro mecanismo por el que puede actuar el NO es la modulación de la actividad de las proteínas por nitrosilación directa de residuos de tirosina (Stoyanovsky, 1997).

Estudios de inmunohistoquímica han mostrado la presencia de óxido nítrico sintasa en las fibras nerviosas que inervan las glándulas salivales. La



Introducción

NOS se localiza en fibras nerviosas alrededor de los acinos de glándulas salivales parótidas y submaxilares de rata, conejo, hurones, gatos (Lohinai, 1995; Lomniczi, 1998; Soinila, 1996; Alm, 1997; Takai, 1999) así como en acinos de glándulas salivales labiales humanas (Pedersen, 2000,) y en glándulas lagrimales de gatos (Cheng, 2001). Otra fuente de NO en las glándulas salivales son los vasos sanguíneos, y capilares (Xu, 1997) y en trabajos recientes se informó sobre la síntesis de NO y expresión de NOS en células acinares, aunque los resultados son contradictorios (Xu, 1997; Tritsarlis, 2000; Looms, 2000; Sugiya, 2001; Looms, 2002). Tomadas en conjunto estas observaciones sugieren que el NO podría tener un papel en la regulación de la secreción salival.

Síntesis de óxido nítrico en acinos

Looms y colaboradores han demostrado que en células acinares aisladas de parótida y lagrimales de rata, así como en células acinares labiales humanas existe un proceso endógeno de síntesis de NOS utilizando un indicador de NO fluorescente como es el DAF-2 (Tritsarlis, 2000; Looms, 2000; Looms, 2002). Asimismo, cuando se estimula con noradrenalina se observan incrementos en la producción de NO, semejantes a los incrementos del calcio intracelular (Looms, 2000). Mientras que la estimulación con acetilcolina no induce aumentos similares en la producción de NO; sin embargo, induce rápidamente la liberación de calcio. Del mismo modo, el agregado de un ionóforo de calcio como la ionomicina resulta en un aumento en la concentración de calcio pero no en un fuerte aumento en la síntesis de NO, inversamente a lo que ocurre con la estimulación con noradrenalina. Basados en estas evidencias, Looms y colaboradores concluyen que la movilización de calcio no parece ser la única señal para la producción endógena de NO sino que participarían otros mediadores asociados a la estimulación de determinados receptores (Looms, 2002). Sin embargo, recientemente se ha cuestionado la utilización del DAF-2 ya que en condiciones experimentales en que se producen cambios en la concentración de calcio, el fluoróforo también es sensible al calcio. Incluso, los experimentos en los que se emplea DAF-2 poseen otras variables como la cantidad de fluorocromo incorporado por las células y el grado de hidrólisis de los enlaces de este componente (Broillet, 2001)

Los resultados obtenidos al estudiar en distintas especies las vías de señalización que involucran a la NOS en la secreción exócrina muestran discrepancias si se trabaja con células acinares o glándulas enteras, y en parótida de rata o de conejo. Sugiya y colaboradores encuentran que la actividad de NOS en parótida de conejo es activada por un agonista muscarínico colinérgico, metacolina, pero no por isoproterenol. Sin embargo la activación de la NOS por metacolina puede ser imitada por el agregado de



un ionoforo de calcio y es dependiente de la movilización del mismo (Sugiya, 2001). Asimismo, la estimulación de NOS con otro agonista muscarínico colinérgico como es el carbacol, en glándulas submaxilares de rata, depende de la activación de fosfolipasa C y de la movilización de calcio (Pérez Leirós, 2000).

Óxido nítrico sintasa y papel del NO en glándulas salivales

La purificación parcial de NOS a partir de acinos de parótida de rata muestra que la enzima puede activarse de manera dependiente de calcio y calmodulina (Mitsui, 2000). Observando la expresión de las isoformas de NOS en acinos, aproximadamente el 74 % de la actividad total se encuentra en la fracción citosólica de glándulas parótidas de rata. Análisis por western blot realizados en la fracción citosólica revelan que la proteína de 165-KDa reacciona con un anticuerpo contra NOS I (Mitsui, 2000). En forma similar, una proteína citosólica de 160 KDa de parótida de conejo también reacciona con anticuerpos para NOS I (Sugiya, 2001). En contraste, se encontraron bajos niveles de expresión de NOS I en el citosol de acinos submaxilares, aunque en estos su expresión era mayor en la periferia debajo de la membrana plasmática (Xu, 1997).

El NO que se halla en los acinos de parótida puede derivar de varios tipos celulares como las fibras nerviosas preacinares o del tejido vascular, o puede ser sintetizado en los mismos acinos después de la estimulación de ciertos receptores. Cuando los acinos de las parótidas son estimulados con un dador de NO como es el nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP), éstos responden con un incremento de los niveles de calcio intracelular (Looms, 2001). Sin embargo, no está claro aún si el NO regula la secreción en las glándulas salivales por otros mecanismos además de la modulación del calcio intracelular. Otros estudios implican al NO en la regulación secretoria, por ejemplo, utilizando un inhibidor de la síntesis de NO como es el L-NAME se observó una reducción en el contenido proteico y el flujo de la saliva inducido por un estímulo parasimpático en las glándulas salivales de rata, gato y hurón (Edwards, 1996; Tobin, 1997; Takai, 1999; Lomniczi, 1998). Del mismo modo, la inhibición de NOS con L-NAME o aminoguanidina redujo la secreción estimulada por sustancia P y LPS en ratas (Lomniczi, 1998). Sin embargo, hay cierta controversia acerca de si el NO induce la secreción por estimulación simpática.

La expresión de NOS no es detectable en fibras nerviosas simpáticas mientras que es abundante en las fibras nerviosas parasimpáticas y sensoriales de las glándulas salivales (Soinila, 1996; Alm 1997; Takai, 1999; Cheng, 2001), y se demostró que el L-NAME no afectó la secreción inducida por el estímulo



Introducción

simpático de la glándula submandibular de la rata (Takai, 1999). No obstante, la administración de L-NAME causó una reducción en la secreción proteica de las glándulas parótidas de ovejas anestesiadas. Esta reducción asciende al 63% durante el estímulo simpático, y al 92% durante el estímulo parasimpático mientras que la combinación de ambos estímulos produce una reducción del 60% (Hanna, 1998).

En este contexto, vale mencionar que la secreción proteica inducida por VIP está mediada por NO en la glándula submaxilar del gato (Buckle, 1995). El VIP es un neuropéptido que activa la síntesis del AMPc en las glándulas salivales y lagrimales (Dartt, 1984; Turner, 1990) y también refuerza la secreción inducida por otros receptores en glándulas salivales (Lundberg, 1980; Dartt, 1984). Dado que la síntesis del AMPc también es activada por el estímulo β -adrenergico, se ha propuesto que el VIP activaría la NOS por el mismo mecanismo que el estímulo β -adrenergico. Recientemente se describió que la inducción de la secreción estimulada por VIP en glándulas submaxilares y páncreas podría estar mediada por el NO, la regulación del calcio intracelular y un acople alternado del receptor de VIP con Gi y Gs, entre otros mecanismos (Luo, 1999).

Hipótesis y objetivos





Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

La actividad de la sintasa de óxido nítrico participa en la disfunción secretoria de los ratones NOD en etapas previas a la aparición de infiltrados en las glándulas y al aumento de la respuesta Th_1 .

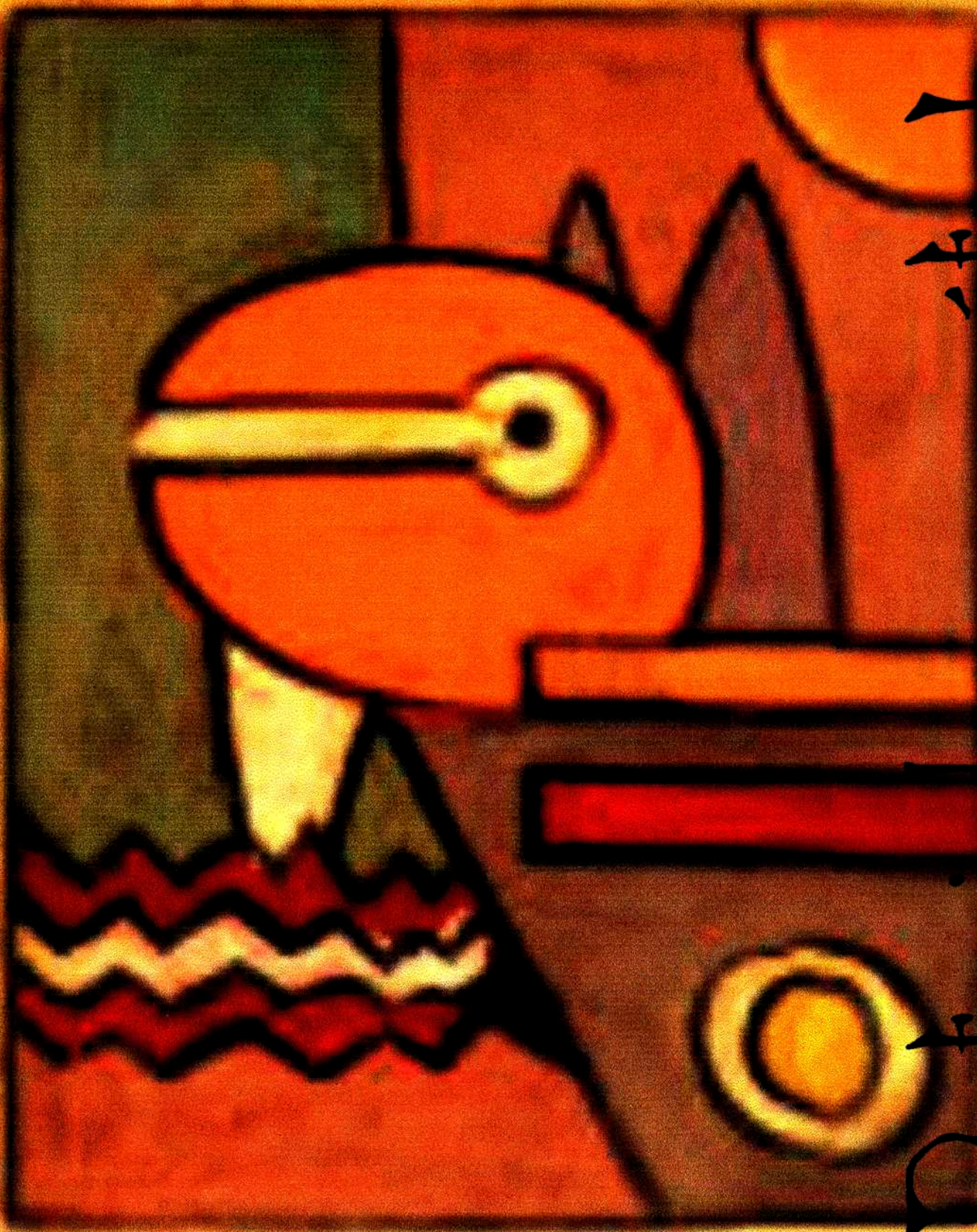
Objetivos generales:

Determinar la actividad de NOS en glándulas salivales de ratones NOD durante el desarrollo de la disfunción secretoria y en relación al inicio de la respuesta autoinmune.

Objetivos específicos:

- Investigar la participación de la vía L-arginina/NO/GMPc en las glándulas submaxilares y parótidas de los ratones NOD.
- Investigar posibles mecanismos de regulación de la biosíntesis de NO en las glándulas salivales.
- Investigar si existe asociación entre la presencia de infiltrados, el desbalance de citoquinas Th_1/Th_2 y la actividad de la NOS o la señalización mediada por NO.

Materiales y métodos





Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones de la cepa NOD (diabéticos no obesos) y como controles ratones BALB/c del mismo sexo y edad. Los animales fueron criados en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y mantenidos con ciclos de luz y oscuridad.

Todos los experimentos se realizaron con los animales ayunados por 18 horas siguiendo protocolos estándares establecidos por el Comité de Ética y Cuidado de Animales de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

En la mayor parte de los experimentos se emplearon ratones hembras de 12 a 16 semanas de edad. Sin embargo, ratones NOD de ambos sexos y de edades comprendidas entre 10 y 26 semanas y BALB/c de la misma edad y sexo se emplearon para investigar la aparición de infiltrados de células linfomononucleares en las glándulas, niveles de citoquinas en suero y tejidos, signos de disfunción secretoria y alteraciones en los mecanismos de transducción de señales asociados a la secreción en el curso de la enfermedad así como su incidencia en machos y hembras.

Estudios histológicos

Se realizaron distintas tinciones para los estudios histológicos de las glándulas salivales de ratones NOD y BALB/c en los que se investigó la morfología, la proporción y estructura de acinos y ductos, y la presencia de células inmunes.

Las glándulas submaxilares y parótidas de ratones NOD y BALB/c fueron fijadas en una solución de paraformadehído al 4% en PBS por 24 h a temperatura ambiente. Luego de la fijación se procedió a la deshidratación del tejido pasándolo por soluciones de diferente concentración de etanol y xilol. Posteriormente, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 8-10 μm con un micrótopo y se montaron sobre portaobjetos. Se realizó la coloración topográfica de hematoxilina y eosina.



Determinación de la concentración sérica de glucosa

Se midió de rutina la concentración de glucosa en el suero de los ratones NOD y BALB/c por el método de glucosa oxidasa. La enzima glucosa oxidasa oxida la glucosa a ácido glucónico y agua oxigenada que, en presencia de peroxidasa, produce la reacción oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona dando lugar a un cromógeno de color rojo cereza. Las muestras de sangre se obtuvieron por sangrado retro-orbital y se separó el suero en una microcentrífuga a 900 g durante 5 min. Se tomaron 20 μ l de suero y 2 ml del reactivo de trabajo que contiene las enzimas glucosa oxidasa (> 3000 U/l) y peroxidasa (>400 U/l), fenol 2,75 mM, y la 4-aminofenazona 1,25 mM en buffer Tris 46 mM, pH 7,4. (Wiener, Argentina) Se incubó la mezcla durante 10 min a 37 °C y posteriormente se determinó la absorbancia a 505 nm en un espectrofotómetro Beckman.

Con el objeto de monitorear el inicio de la diabetes en ratones NOD/Lt en nuestro bioterio se determinaron los niveles séricos de glucosa en los mismos y en controles BALB/c.

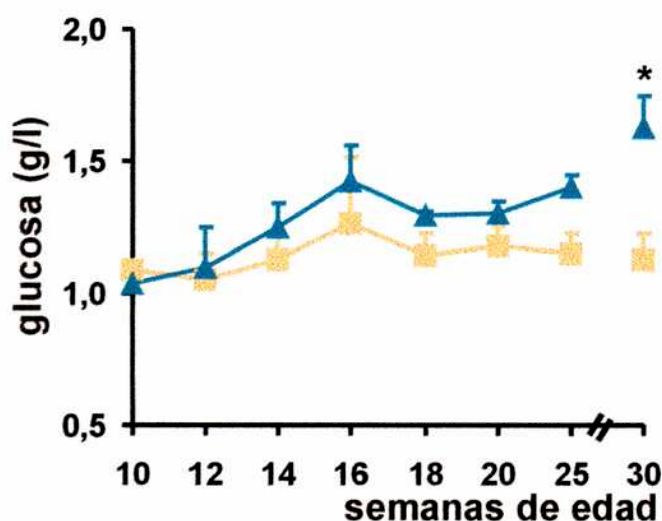


Gráfico 1: niveles de glucosa en sangre de los ratones NOD ($\blacktriangle$) y BALB/c ($\blacksquare$) en función de la edad. Los niveles de glucemia se midieron con el método de glucosa oxidasa. Los valores representan la media $\pm$ ES de al menos 5 experimentos. $P > 0,05$

El gráfico 1 representa la concentración de glucosa en sangre en ambos grupos de ratones ayunados. No se observan diferencias entre ratones NOD y controles entre las 10 y 25 semanas. En cambio, se puede observar un aumento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de glucosa en hembras NOD recién a las 30 semanas de edad. Sobre esta base, el rango de edades para el estudio de los



mecanismos que conllevan a una insuficiencia en la secreción salival se extendió hasta las 25 semanas de edad considerando a estos animales prediabéticos. Estos datos para la cepa NOD criada en la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, son comparables a los datos obtenidos en otros bioterios (Clare-Salzler M, 1998).

Medición del flujo salival

La medición del flujo salival de ratones NOD y controles se realizó por pesada de la saliva acumulada en la cavidad bucal como se describió previamente (Yamamoto, 1997). Así, la saliva se recolectó durante 12 min. con una micropipeta y se colocó en tubos eppendorf mantenidos a 4 °C. El volumen recolectado fue cuantificado por diferencia de peso de los microtubos.

No se observó secreción basal de saliva en ausencia de estímulo secretorio, por lo cual la saliva fue recogida después de inyectar por vía intraperitoneal el agonista muscarínico pilocarpina (Sigma-Aldrich, EEUU) en una concentración de 50 µg de pilocarpina cada 100 g peso corporal o la combinación de pilocarpina más péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Sigma-Aldrich, EEUU) con una concentración de 10 µg de VIP cada 100 g de peso.

Los resultados de flujo se expresaron en µl de saliva por min y por 100 g de peso corporal.

Determinación de la secreción de amilasa y proteínas en saliva

La concentración de amilasa fue determinada en la saliva recogida de cada ratón por el método de Bernfeld (1955). Para ello se midió la producción de maltosa a partir de una solución de almidón (10 mg/ml) utilizando como reactivo de color el ácido dinitrosalicílico en medio básico. El almidón es degradado por la amilasa en dímeros de glucosa los cuales presentan extremos reductores que en medio básico interactúan con el ácido dinitrosalicílico con desarrollo de color que se mide a 540 nm. Para la realización de la curva estándar se utilizaron concentraciones crecientes de maltosa (20 a 200 µg).

Una unidad de amilasa fue definida como la actividad de la enzima que degrada 1 mg de maltosa por minuto a 20 °C (Bernfeld, 1955). Los resultados



se expresaron en unidades de amilasa por ml de saliva por min y por 100 g de peso corporal.

La concentración de proteínas se determinó en las mismas muestras por el método de Lowry et al. (1951) utilizando albúmina sérica bovina como estándar. Los valores se expresaron en μg de proteínas por μl de saliva recogida por min y por 100 g de peso corporal.

Determinación de citoquinas

El contenido de citoquinas en suero, en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos y en los extractos de tejido, se determinó por el método de ELISA.

Las glándulas salivales de ratones NOD y controles fueron homogenizadas en 500 μl de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, PMSF 0,1 mM; aprotinina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, leupeptina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pepstatina A 2 μM y SBTI 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). El homogenato se centrifugó a 8.000 g 10 min a 4°C y los sobrenadantes fueron congelados en freezer de -80 °C hasta ser utilizados. Una alícuota de cada muestra fue separada para la determinación de proteínas por el método de Lowry et al. (1951) usando BSA como estándar.

Se obtuvo sangre de ratones NOD y controles por sangrado retro-orbital. Posteriormente se dejó coagular la sangre obtenida y se centrifugó a 8.000 g 10 min a 4°C y los sueros obtenidos se congelaron en freezer de -80 °C hasta ser utilizados.

Para la obtención de cultivos de esplenocitos, se extrajo el bazo de ratones NOD y controles, se lo disgregó por métodos mecánicos. Posteriormente, se eliminó por medio de un shock osmótico los glóbulos rojos presentes en el disgregado celular y se centrifugó a 1600 g por 10 min. Las células obtenidas se resuspendieron en medio RPMI, se lavaron dos veces y se incubaron 3×10^6 células durante 48 horas en placas de cultivo con el agregado de suero fetal bovino. Para estimular a los esplenocitos se les agregó al medio de incubación anticuerpos anti-CD3 y anti-CD-28 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Transcurridas las 48 horas se extrajo el medio de cultivo y se centrifugó a 1600 g por 10 min. Los sobrenadantes se congelaron en freezer de -80 °C hasta ser utilizados.

Placas de 96 posillos se cubrieron durante la noche a 4°C con un anticuerpo de captura anti-citoquina a analizar. Una curva estándar fue generada usando diluciones seriadas de la citoquina recombinante a dosar.



Posteriormente las placas fueron lavadas y bloqueadas, y se les agregó 50 μ l de muestras a analizar o 50 μ l de los estándares de la citoquina analizada según corresponda. Las muestras y los estándares fueron incubados durante la noche a 4°C. Luego se lavaron tres veces con una solución de PBS con 0.05% de Tween. La unión no específica fue reducida al mínimo bloqueando con 1% de BSA durante 1 h. Después se reiteró el lavado de los pocillos y se incubaron cada uno durante 2 horas con 100 μ l de un anticuerpo (10 ng/ml) policlonal de conejo anti-citoquina de interés conjugado con biotina diluido en PBS-tween. Nuevamente, el exceso de anticuerpo fue eliminado lavando con una solución de PBS/tween y se les agregó 100 μ l de un conjugado de peroxidasa-streptavidina-peroxidasa (2.5 μ g/ml). Las placas nuevamente fueron incubadas por una hora, y se lavaron con PBS-Tween. Por último se agregó como cromógeno al ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic) y se determinó la densidad óptica a 405 nm. La cantidad de citoquina en cada una de las muestras fue calculada en base a la curva estándar.

Determinación de la actividad de óxido nítrico sintasa

Se midió la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en glándulas submaxilares y parótidas de ratones NOD y controles usando el método descrito por Bredt y Snyder (1990) modificado. La enzima convierte la arginina en cantidades equimolares de óxido nítrico y citrulina. La técnica se basa en la determinación de la formación de citrulina marcada a partir de L-[U-¹⁴C]arginina.

Las glándulas submaxilares o parótidas extraídas de cada animal (una por tubo) fueron incubadas con 0,2 μ Ci de L-[U-¹⁴C]arginina (0,7 μ M, >300 mCi/mmol) en 500 μ l de una solución de Krebs Ringer-bicarbonato (KRB) pH 7,4 gaseado con carbógeno (95 % O₂ y 5% CO₂) en un baño a 37 °C por 30 min, en presencia o ausencia de L-N^G-mono-metil arginina (L-NMMA) 500 μ M. Después de la incubación se procedió a retirar los tejidos y homogenizarlos en 500 μ l de buffer Hepes 20 mM pH 5,5, ditiotreitól 1 mM, ortovanadato de Na 2 mM, NaF 50 mM EDTA y EGTA 1 mM a 4 °C en un homogenizador Ultra-Turrax por 30 s a 24.000 rpm, dos veces. Los homogenatos fueron sometidos a centrifugación (10 min a 8.000 g), los sobrenadantes se sembraron en columnas de intercambio catiónico (AG 50W-X8, Bio-Rad Inc, EEUU) equilibradas con el buffer de homogenización y la citrulina fue eluida con 2 ml de agua destilada. Se determinó la cantidad de [¹⁴C]citrulina eluida en un contador de centello líquido Wallac.

La actividad de la NOS fue calculada como la actividad total menos la medida en presencia del inhibidor de la actividad de la NOS, L-NMMA, y la



actividad de las isoformas dependientes de calcio fue determinada incubando los tejidos en KRB sin calcio y con 5 mM de EGTA. Cuando se usaron inhibidores, tanto de la actividad de la NOS como de proteínas kinasas regulatorias de su actividad, éstos fueron incluidos desde el principio y los estímulos (como el VIP o el carbachol) fueron agregados en los últimos 15 min en las concentraciones finales indicadas en resultados.

Para el cálculo de las constantes cinéticas se emplearon concentraciones finales de arginina entre 0,14 y 10 μ M durante 30 min

La técnica para determinar la actividad de la NOS usada en estos experimentos no requiere el agregado de cofactores y además, durante la incubación interviene el proceso de captación de arginina por transportadores de aminoácidos. Con el objeto de investigar la participación de estos factores en los efectos observados, también se determinó la actividad de la NOS en homogenatos utilizando la técnica de Bredt y Snyder (1990) original.

Las dos glándulas submaxilares o parótidas de cada animal se homogenizaron en 500 μ l de buffer Hepes 20 mM pH 7,4 con el agregado de 1 mM de EDTA, inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF 0.1 mM, aprotinina 1 μ g/ μ l, leupeptina 2 μ g/ μ l, pepstatina A 2 μ M e inhibidor de tripsina de poroto de soja SBTI 10 μ g/ μ l) y además se incluyeron inhibidores de fosfatasas (ortovanadato de Na 2 mM y NaF 50 mM) en un Ultra-Turrax por 30 s a 24.000 rpm a 4 °C. Posteriormente, a 200 μ l del homogenato se le agregó ditiotreitól 1 mM, fosfato de nicotinamida-adenín-dinucleótido (NADPH) 1 μ M, CaCl_2 1,25 mM y 0,05 μ Ci de L-[U- 14 C]arginina (1 μ M concentración final) y se incubó durante 30 min a 37 °C con gaseo de carbógeno y en presencia o ausencia de L-NMMA 500 μ M. La reacción se detuvo con el agregado de 750 μ l de una solución de Hepes 100 mM pH 5,5, EDTA 10 mM y los homogenatos se centrifugaron a 18.000 g por 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se sembraron en columnas de intercambio catiónico y se procedió de igual manera que lo descripto anteriormente. Se reservaron 20 μ l de cada homogenato para la posterior determinación de proteínas por el método de Lowry et al (1951).

Determinación de niveles de GMP cíclico

Se determinaron los niveles de GMP cíclico (GMPc) en las glándulas salivales enteras de ratones NOD y BALB/c por medio de un radioinmunoensayo con anticuerpos anti-3',5'-GMPc y [125 I]GMPc (>2000 Ci/mmol) que fue marcado por el Dr. Omar Pignataro (IBYME, Buenos



Aires). Las glándulas enteras fueron incubadas en 500 μ l de una solución de KRB pH 7,4 con inhibidores de proteasas como se señaló previamente y metil isobutil xantina (IBMX) 100 μ M, gaseadas con carbógeno en un baño a 37 °C por 30 min. Cuando se usaron inhibidores se incluyeron desde el principio y los estímulos se agregaron por 15 min. Después de la incubación se homogenizaron las glándulas en 2 ml de etanol absoluto y el homogenato resultante se centrifugó por 10 min a 8.000 g a 4 °C. El sedimento resultante se re-homogenizó en 1 ml de una solución de etanol:agua (2:1), y los sobrenadantes se colectaron y evaporaron a sequedad en un baño termostático a 56 °C. Los residuos fueron resuspendidos en buffer acetato 50 mM pH 6,2 para la subsiguiente determinación de GMPc.

Con el objeto de aumentar la sensibilidad del método de determinación del nucleótido cíclico, se procedió a la acetilación de las muestras y los estándares de ambos con trietilamina: anhídrido acético (2:1)

Para la determinación de los niveles de GMPc se acetilaron 50 μ l de muestra con 6 μ l de la solución de anhídrido acético y trietilamina. Posteriormente, se agregaron 100 μ l de PBS a cada muestra, realizada por duplicado, y 50 μ l de [125 I]GMPc (aproximadamente 5 fmol/tubo, >2.000 Ci/mmol) y 50 μ l de anticuerpo anti-3',5'-GMPc (Chemicon Int, EEUU) (dilución 1/3000 en 0,1% de BSA). Los tubos se incubaron 16 h a 4 °C y se les agregó 100 μ l de una solución de BSA al 10 %, 2 ml de etanol absoluto y se homogenizaron. Luego de centrifugar durante 15 min a 5.000 g a 4 °C, se descartó el sobrenadante con el GMPc no unido al anticuerpo y tras secar el precipitado para eliminar los restos de etanol, se midió la radioactividad en un contador de centelleo sólido (Wallac).

Los resultados fueron expresados en fmol de nucleótido cíclico por mg de peso húmedo del tejido.

Expresión de isoformas de NOS

Inmunodetección de proteínas fraccionadas y transferidas a nitrocelulosa (immunoblotting)

Las glándulas salivales de ratones NOID y controles fueron homogenizadas en 500 μ l de buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, tritón X-100 0,2 %, EDTA 1 mM, PMSF 0,1 mM; aprotinina 1 μ g/ μ l, leupeptina 2 μ g/ μ l pepstatina A 2 μ M y SBTI 10 μ g/ μ l). El homogenato se centrifugó a



8.000 g 10 min a 4°C y los sobrenadantes fueron congelados en freezer de -80 °C hasta ser utilizados. Una alícuota de cada muestra fue separada para la determinación de proteínas por el método de Lowry et al. (1951) usando BSA como estándar.

En algunos experimentos se estudió la expresión de estas isoformas en corteza cerebral como control positivo. Se extrajeron, homogenizaron y conservaron de forma similar a las glándulas salivales.

Las proteínas en los extractos obtenidos fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Para esto las muestras (100 µg de proteína/calle) en buffer muestra (Tris 9 mM, sacarosa 0,2 M, SDS 63,2 mM, β-mercaptoetanol 10 M, 3% de azul de bromofenol) se hirvieron durante 2 min., y luego fueron sembradas en geles de poliacrilamida 7,5 % y separadas por electroforesis a 20 mA en presencia de buffer Tris 25 mM pH 8,3, con glicina 195 mM y SDS 3,5 mM. Una vez separadas en el gel de poliacrilamida, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia Biotech, EEUU) por el método de transferencia húmeda en buffer Tris 25 mM, glicina 195 mM, SDS 1,8 mM y metanol (1:5) a 30 V durante 90 min. Las membranas fueron pre-tratadas durante toda la noche con solución de bloqueo (BSA 3 % en TBS-tween 0,05 %) y luego incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales específicos para las distintas isoformas de NOS (BD, EEUU) (dilución 1:250 para NOS I, NOS II y NOS III). Posteriormente las membranas fueron lavadas varias veces con una solución de lavado (TBS-tween 0.05%). Finalmente, se incubaron las membranas con un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, EEUU) (dilución 1: 10.000) durante 1 h a temperatura ambiente, y luego se realizaron varios lavados con la solución de lavado. El revelado se realizó utilizando una solución de 1,65 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y 3,3 mg de nitroazul de tetrazolio (NBT) en 10 ml, que en presencia de la enzima fosfatasa alcalina da un precipitado de color violáceo. Las masas moleculares relativas de las diferentes isoformas de NOS se calcularon mediante la inclusión en la electroforesis de estándares de masa molecular conocida (miosina 209 kDa, β-galactosidasa 124 kDa, BSA 80 kDa, anhidrasa carbónica 49,1 kDa, SBTI 34,8 kDa, lisozima 20,6 kDa y aprotinina 7,1 kDa de Bio-Rad, EEUU). Las bandas obtenidas se compararon con controles positivos para cada isoforma (BD, EEUU).



Inmunohistoquímica

Las glándulas submaxilares y parótidas de ratones NOD y BALB/c fueron fijadas en solución de paraformaldehído al 4% en PBS por 24 h a temperatura ambiente. Luego de la fijación se procedió a la deshidratación, inclusión en parafina y corte como se describió más arriba.

Para la realización de la detección de la isoforma de NOS I por inmunohistoquímica, los portaobjetos conteniendo los cortes de las glándulas salivales se desparafinaron e hidrataron, de igual manera que para las tinciones de hematoxilina-eosina. Posteriormente, los cortes de las glándulas salivales de ratones NOD y BALB/c se incubaron toda la noche en una cámara húmeda con anticuerpos específicos para la isoforma de NOS (B&D, EEUU) (dilución 1:100), también se realizaron controles negativos sin el agregado de ninguno de los dos anticuerpos. Una vez transcurrido ese tiempo se sometió a los cortes a lavados con PBS para eliminar los anticuerpos sobrantes, y posteriormente, se incubaron durante una hora, los cortes con un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa. El revelado se realizó utilizando diaminobenzidina (DAB).

Los cortes en que se realizó la inmunohistoquímica se procedió a una tinción de hematoxilina para visualizar los diferentes componentes del tejido celular estudiado y observar la localización de las isoformas de NOS.

Determinación de la formación de urea como índice de la actividad de la arginasa

La determinación de la actividad de arginasa se realizó espectrofotométricamente mediante la medición de la velocidad de formación de urea a partir de L- arginina. La urea reacciona con ureasa y glutamato deshidrogenasa con consumo de nicotinamida-adenín dinucleótido reducido (NADH). El fundamento de la técnica es la medición de la disminución de absorbancia a 340 nm del NADH que es proporcional a la concentración de urea presente en la muestra. Como valor de referencia se utilizó un estándar de urea (0,5 mg/ml) (Weiner, Argentina).

Las glándulas enteras fueron incubadas en 500 μ l de una solución de KRB pH 7,4 gaseado con carbógeno en un baño a 37 °C por 30 min en presencia de arginina (1,5 y 10 μ M). Al cabo de la incubación, las glándulas se homogenizaron en buffer Hepes 20 mM pH 5,5 y se centrifugaron (18.000 g 10 min a 4°C) para la posterior determinación de urea en los sobrenadantes.



En una cubeta precalentada a 37 °C con 1,5 ml de reactivo de trabajo (glutamato deshidrogenasa y uresasa (>140 U/ml), 2-oxoglutarato 5 mM, y NADH 0,31 mM en buffer Tris-HCl 100 mM pH 8) (Biosystems S.A, España) se agregaron 10 µl del sobrenadante o de estándar y se midió la absorbancia a 340 nm a los 30 s, a los 90 s y a los 150 s de iniciada la reacción en un espectrofotómetro Beckman.

Se reservaron 20 µl de cada homogenato para la posterior determinación de proteínas por el método de Lowry et al (1951). Los resultados se expresaron en µg de urea por mg de proteína/minuto.

Expresión de niveles de ARN mensajero de NOS I

Extracción de ARN

El ARN total fue obtenido de glándulas submaxilares, parótidas y corteza cerebral de ratones NOD y BALB/c. Todo el material descartable y las soluciones empleadas para estos estudios se encontraban libres de nucleasas de ARN.

La extracción del ARN se basa en la utilización del método de Chomczynski et al (1987) que emplea como reactivo de extracción una mezcla de tiocianato de guanidinio-fenol y cloroformo (TRIzol, Gibco, Life Technologies).

Una vez sacrificados los animales, las dos glándulas submaxilares o parótidas de cada animal o la corteza cerebral del mismo se colocaron en tubos de polipropileno que contenían 0,5 ml del reactivo de extracción y fueron homogenizados en un Ultra-Turrax durante 15 s a 24.000 rpm a 4 °C. Las muestras de los diferentes tejidos fueron centrifugadas a 12.000 g por 10 min para eliminar restos de grasa, membranas celulares y polisacáridos. El sobrenadante se pasó a tubos limpios y se le agregó 100µl de cloroformo, se tapó y agitó durante 15 s. Posteriormente se centrifugó 15 min a 12.000 g a 4 °C para separar la fase orgánica de la fase acuosa (donde se encuentra solubilizado el ARN). Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se le agregó 250µl de isopropanol (de esta manera se produce la precipitación del ARN) y se incubó la mezcla 10 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó 10 min a 12.000 g a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado que contiene el ARN se lavó con 75 % de etanol para eliminar restos de proteínas. En el paso final el ARN se resuspendió en agua destilada tratada con dietil pirocarbonato (DEPC).



La cantidad y pureza del ARN total obtenido se verificó por medición de la absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro y el cociente de ambas lecturas se encontró en una relación entre 1,6 a 1,8. Por último las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta ser utilizadas para la técnica de transcripción reversa y posterior reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Transcripción reversa y amplificación de fragmentos de ADN copia

La transcripción reversa se realizó sobre 5 µg de ARN total de glándulas submaxilares, parótidas o corteza cerebral de ratones NOD y controles. La síntesis de la primera cadena de ADN copia (ADNc) se realizó utilizando 200 U de la enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse transcriptasa, Amersham Pharmacia, EEUU), oligo (dT)18 como cebadores (*primers*) y dNTP's 0,5 mM de cada uno. En ciertos tubos se utilizó agua destilada con DEPC sin ARN como control de la transcripción. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 1 h, con un paso de inactivación enzimática de 5 min a 65 °C.

Una alícuota de 3 µl del volumen de reacción anterior fue utilizada para la amplificación, en un termociclador AMPLITRON II, por la técnica de PCR de los mensajeros de NOS 1 y del mensajero de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control semicuantitativo.

El ADNc se agregó a 25 µl de la siguiente mezcla de reacción: dNTP's 200µM de cada uno, *primers* específicos 800 nM de cada uno, *Taq* polimerasa 1 U (Amersham Pharmacia Biotech), buffer para PCR 1X (conteniendo 10mM Tris-HCl pH 9 y 1.5 mM MgCl₂).

Las secuencias de los *primers* (Invitrogen, EEUU) específicos fueron diseñadas basándose en las secuencias publicadas de la isoforma de NOS I murina (GeneBank GI: 397828) y a las que se hallaban publicadas por Barlett⁴⁹ et al (1999). La secuencia para la isoforma NOS I son: para el *primer* sense 5'-TGTGTGGGCAGGATCCAGTG-3', y para el *primer* antisense 5'-GGGACAGGCGCTGAACTCCA-3' (nucleótido +1340 a +1847) y los pares de *primers* para GAPDH son: para el *primer* sense 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3' y para el *primer* antisense 5'-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3'.

El programa de PCR usado fue el siguiente: se realizó un primer paso de 5 min a 94 °C, y luego 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 40 s,



Materiales y métodos

pegado de *primers* a 55 °C por 40 s, y elongación a 72 °C por 1 min, mas un paso de elongación final de 10 min a 72 °C. Para realizar la PCR para GAPDH se procedió de la misma manera que para NOS I con las mismas muestras de tejidos.

Los productos finales de amplificación fueron sembrados (10 µl) y separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, en buffer Tris-borato-EDTA. Luego de la corrida se expusieron los geles a la luz U.V., y se fotografiaron utilizando una cámara digital Kodak DC120. Posteriormente, las bandas presentes en los geles se cuantificaron mediante el programa Multi Gauge, Fujifilm y se las normalizó con los niveles de GADPH de cada muestra.

Análisis Estadístico

La significación estadística de diferencias fue determinada por la prueba t- de student con dos colas para las poblaciones independientes. Cuando las comparaciones múltiples eran necesarias, la prueba de ANOVA con contrastes de Newman-Keuls fue utilizada después del análisis de varianza. Las diferencias entre las medias eran consideradas significativas en $P < 0.05$.



Resultados y Conclusiones



Resultados y Conclusiones

Caracterización de la sialoadenitis en los ratones NOD.

Histología de Glándulas Salivales

Los ratones NOD de 15 semanas presentaron una morfología alterada de las glándulas submaxilares con un aumento en la relación ductos/acinos en las mismas, en comparación con ratones BALB/c. Esta alteración estructural a las 15 semanas estaba acompañada por disfunción secretoria, como se verá mas adelante.

Con el objeto de estudiar si este aumento en la relación ductos/acinos era progresivo con el desarrollo de la sialoadenitis se realizaron estudios histológicos en dos de las glándulas salivales mayores, como son las glándulas submaxilares y parótidas en ratones NOD de 10, 15 y 25 semanas de edad. Como controles de los experimentos se utilizaron ratones BALB/c de la misma edad. Se cuantificó en los cortes la cantidad de ductos presentes en 20 campos con un aumento de 400 X.

	Glándula Submaxilar		Glándula Parótida	
	BALB/c	NOD	BALB/c	NOD
10 sem	18,2 ± 0,7	31,0 ± 0,7*	8,9 ± 0,3	8,1 ± 0,2
15 sem	23,8 ± 0,8	33,0 ± 1,3*	9,1 ± 0,4	11,3 ± 0,5
25 sem	20,5 ± 0,4	28,4 ± 1,0*	10,8 ± 0,6	12,0 ± 0,9

Tabla 1: Número de ductos en glándulas submaxilares y parótidas de ratones NOD y controles de distintas edades. En cortes histológicos de glándulas salivales de ratones NOD y BALB/c teñidos con hematoxilina-eosina se contabilizaron la cantidad de ductos presentes en 20 campos con un aumento de 400 X. Los valores representan la media ± SEM de las mediciones en 5 ratones de cada grupo. * Diferencias significativas con respecto a los ratones controles de la misma edad, $p < 0.01$.

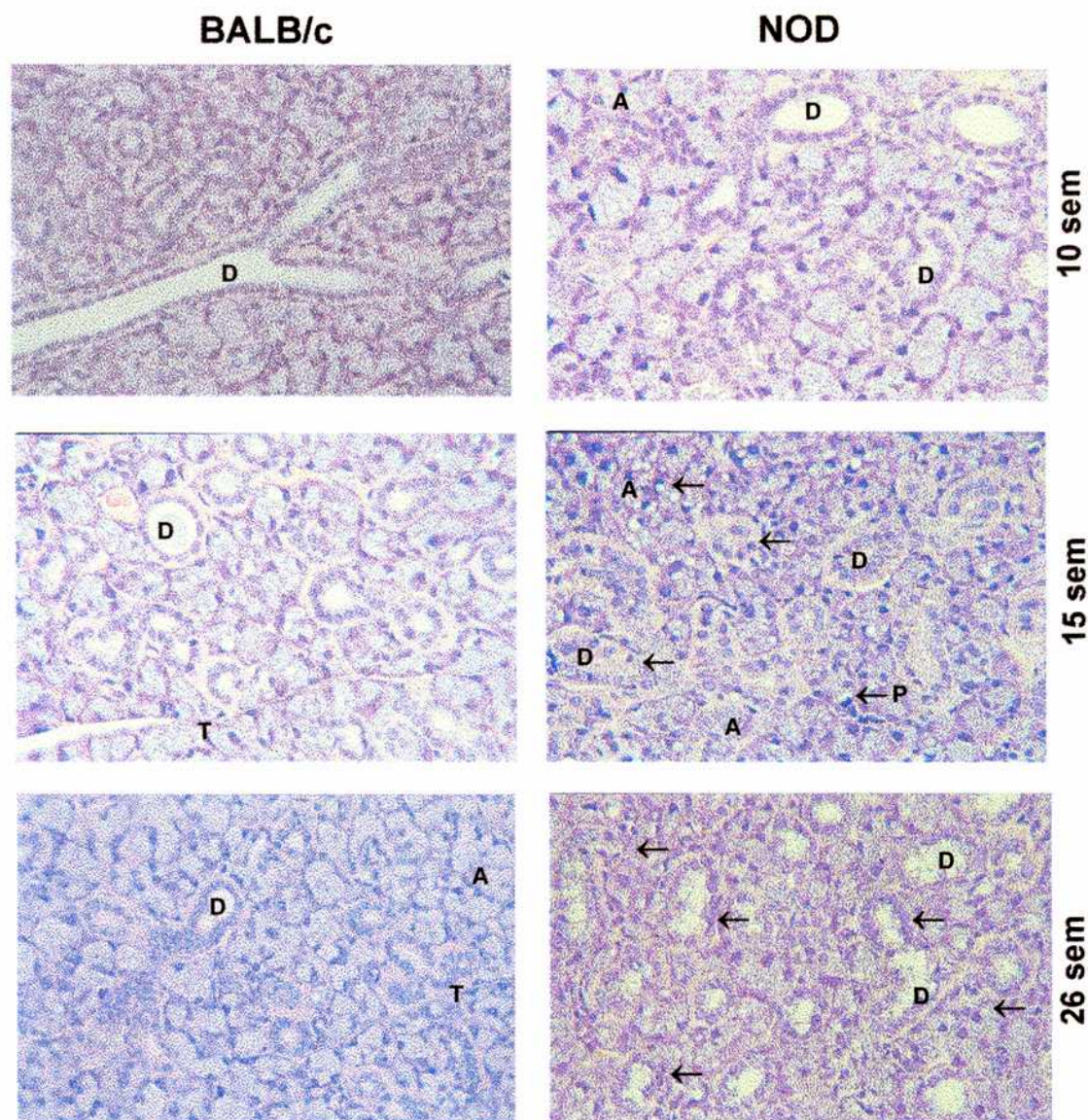


Figura 1: Estudio histológico de glándulas submaxilares de ratones NOD y controles de distintas edades. Glándulas submaxilares de ratones NOD y BALB/c de distintas edades fueron extraídas y fijadas e incluidas en parafina como se indica en materiales y métodos. Posteriormente se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y se observó la morfología de las glándulas y la relación ductos/ acinos. Las Flechas indican la destrucción del epitelio ducta y la micro y macrovacuolización de los acinos. A: acinos; D: ductos; P: núcleos picnóticos positivos; T: Tabique.

En glándulas submaxilares se puede observar (Figura 1, Tabla 1) que a 10 semanas de edad presentan un número mayor ($p<0,01$) de ductos por campo con relación a los ratones controles. No obstante esta alteración en la cantidad de ductos, la morfología de los mismos no se encuentra alterada, en cambio en los acinos se observa microvacuolización. En edades donde se hace evidente la disfunción secretoria (ver mas adelante), 12 semanas en adelante, la relación de ductos/acinos se mantiene aumentada significativamente ($p<0,01$)

Resultados y Conclusiones



con respecto a los ratones controles; sin embargo esta relación no presenta un aumento significativo con el incremento en la edad en los NOD. En esta edad (15 sem) se puede apreciar que la morfología de los ductos ha comenzado a alterarse y las lesiones empeoran en ratones de 17-18 semanas (no mostrados). Dicha alteración consiste en una pérdida de homogeneidad citoplasmática en las células que componen el epitelio de los ductos que también se hace evidente a escala nuclear. Asimismo, los acinos pasan de una microvacuolización a una vacuolización de mediano a gran tamaño y además se observan imágenes de núcleos picnóticos positivos que corresponden a imágenes apoptóticas.

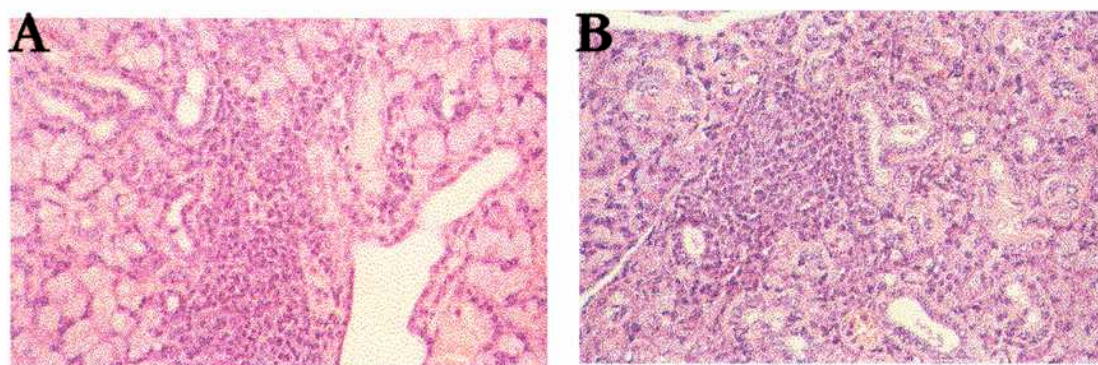


Figura 2: Observación de infiltrados linfomononucleares en glándulas submaxilares de ratones NOD. Glándulas submaxilares de ratones NOD de 25 semanas de edad fueron extraídas y fijadas e incluidas en parafina como se indica en materiales y métodos. Posteriormente se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y se observó la morfología de las glándulas y la presencia de infiltrados.

Asimismo, en estos cortes se estudió la aparición de focos de infiltración linfocitarios ya descritos en estos ratones y en biopsias labiales de pacientes en estado avanzado de la enfermedad. Estos focos no aparecen en los ratones NOD de 10 semanas de edad. Focos de infiltración pequeños y aislados se pudieron observar en 3 de los 9 ratones analizados de 15 semanas. Estos focos eran muy incipientes y su localización era periductal. Incluso, en 1 de los 3 ratones normales analizados también se observó un infiltrado aislado sugiriendo que no había diferencias en cuanto a la incidencia entre los NOD y controles. En cambio en ratones de 25 semanas se puede apreciar que la totalidad de los ratones NOD analizados presentaban focos de infiltración de localización periductal (Figura 2 A, B).

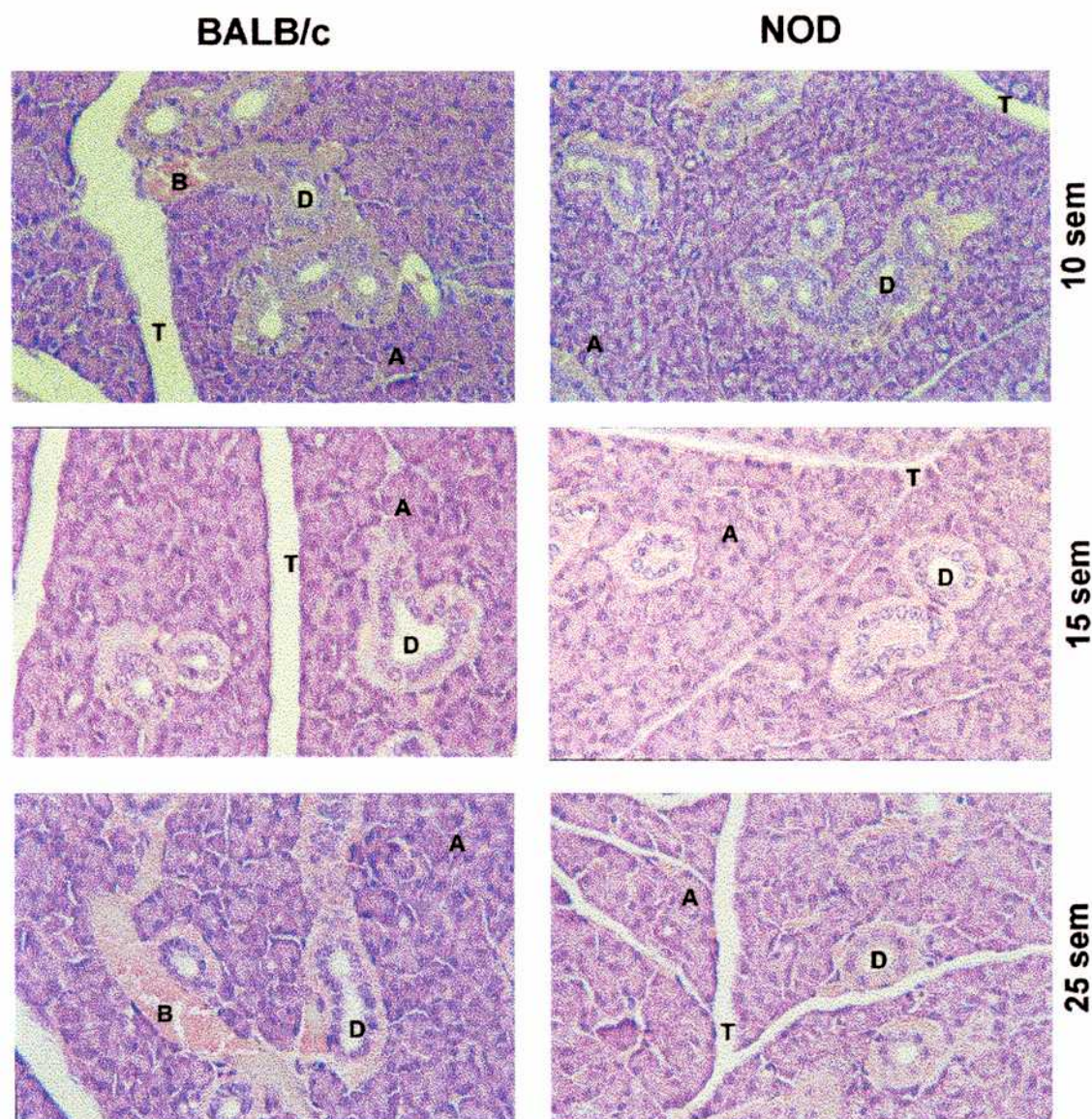


Figura 3: Estudio histológico de glándulas parótidas de ratones NOD y controles. Glándulas parótidas de ratones NOD y BALB/c de 10 15 y 20 semanas de edad fueron extraídas y fijadas e incluidas en parafina como se indica en materiales y métodos. Posteriormente se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y se observó la morfología de las glándulas y la relación ductos acinos. Las letras indican A: acinos, D: ductos; B: Bazo; T: tabique.

Al estudiar la morfología de las glándulas parótidas (Figura 3) en los ratones NOD, se observa que no presentan ningún tipo de alteración como las observadas en las glándulas submaxilares.

Una conclusión preliminar de estas observaciones es que existen diferentes fenómenos propios de cada glándula, que en este caso, se manifiestan como alteraciones histológicas únicamente en las glándulas submaxilares. Esto sugiere que dicha glándula salival tendría



Resultados y Conclusiones

un microambiente más favorable como quimioattractante para células del sistema inmune.

Secreción salival

Una de las características principales del síndrome de Sjögren es la pérdida progresiva de la función secretoria salival y lagrimal. Con el objeto de evaluar la función secretoria en las hembras NOD, se realizaron ensayos *in vivo* de flujo salival y liberación de amilasa salival. Dado que en roedores no se observa secreción basal de saliva en ausencia de estímulo secretorio, y como se comentó anteriormente la secreción salival es estimulada principalmente por el sistema nervioso autónomo parasimpático mediante la acción de acetilcolina y péptido intestinal vasoactivo (VIP), la secreción se indujo con una inyección intraperitoneal de un agonista muscarínico como es la pilocarpina o la combinación de pilocarpina más VIP.

Se realizaron experimentos para determinar la tasa de flujo salival en hembras NOD, en distintos grupos de edades: 10, 12-14 semanas y 15-18 semanas y controles BALB/c de las mismas edades. No se incluyó en los estudios de flujo salival a los ratones de 25 semanas puesto que la totalidad de los mismos presentaban focos de infiltración en las glándulas submaxilares. Además, dividimos la etapa de 15 semanas en dos partes ya que en ella hubo una progresión de cambios morfológicos de las células acinares y ductales. Así, medimos secreción salival en una etapa mas temprana, 12-14 semanas, con el objeto de detectar una posible disminución gradual de la función secretoria, y entre las 15-18 semanas donde ya los cambios histológicos eran mayores.

	BALB/c	NOD
Semanas	(µl/ min * 100 g de peso)	
10	65 ± 2	69 ± 1
12-14	68 ± 3	48 ± 5*
15-18	62 ± 3	44 ± 3*

Tabla 2: Flujo Salival en ratones NOD y controles. Ratones NOD y BALB/c con un ayuno de 12 horas fueron inyectados con Pilocarpina y la saliva fue recolectada durante 12 minutos, como se indica en materiales y métodos. Los valores son la media ± ES de al menos 4 ratones de cada cepa. * Diferencias significativas entre ratones NOD y controles ($p < 0,05$).

Resultados y Conclusiones



En los ratones NOD, mientras que a las 10 semanas no se observó reducción en la secreción estimulada con pilocarpina, en el grupo de 12-14 semanas la tasa de flujo salival inducida por pilocarpina fue significativamente menor respecto del grupo control y se mantiene esta diferencia en las edades más avanzadas.

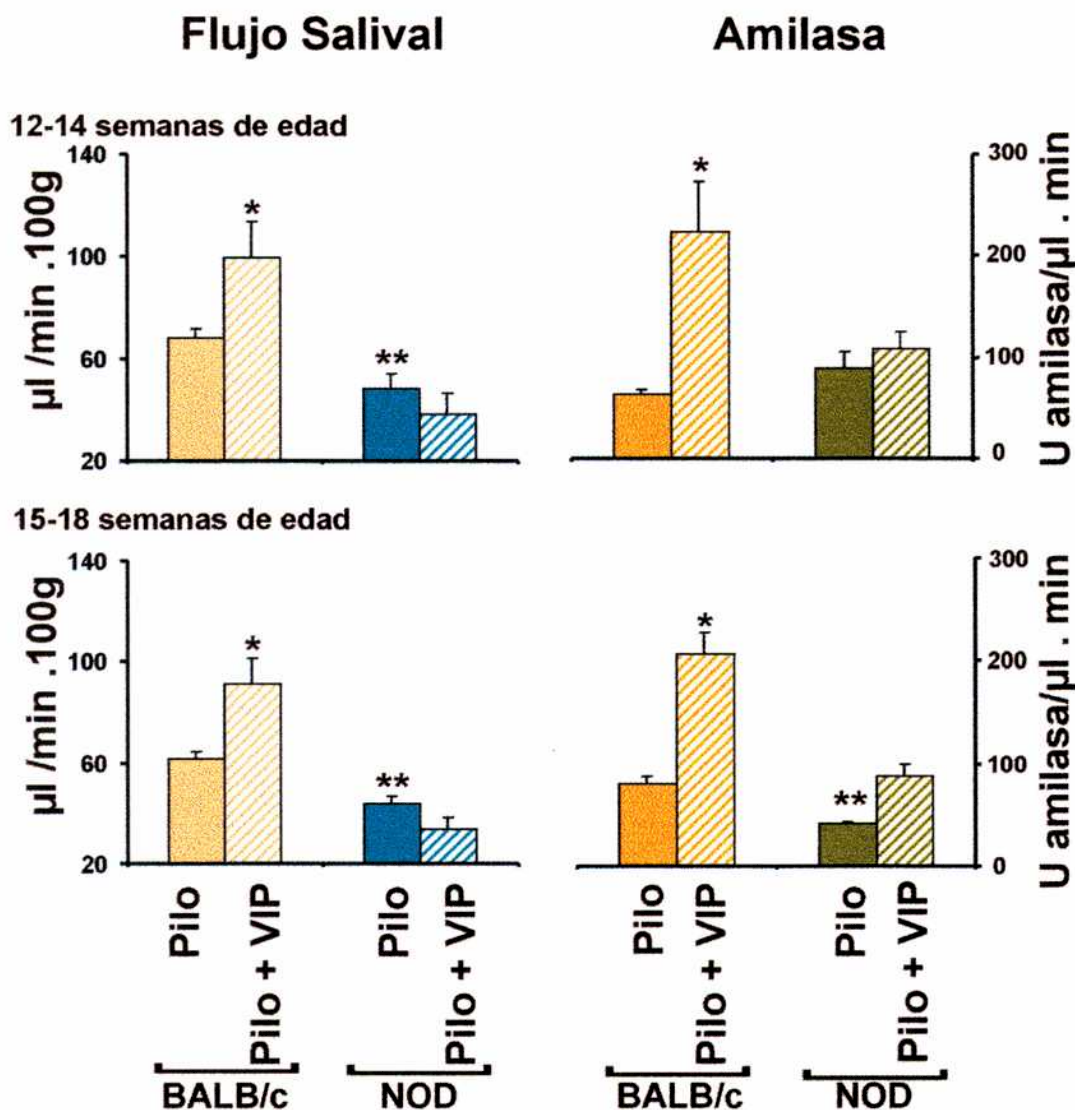


Figura 4: Flujo Salival y secreción de amilasa en ratones NOD (●) y controles (○). Ratones NOD y BALB/c con un ayuno de 12 horas fueron inyectados con Pilocarpina (Pilo) o con una mezcla de Pilocarpina y VIP (Pilo + VIP), y la saliva fue recolectada durante 12 minutos, como se indica en materiales y métodos. La figura muestra la media $\pm$ ES de al menos 5 experimentos. * Diferencias significativas entre distintos tratamientos en la misma cepa de ratones ($p < 0,001$). ** Diferencias significativas entre el mismo tipo de tratamiento pero entre las diferentes ratones NOD y controles ($p < 0,005$).



Resultados y Conclusiones

Como la disminución salival se presentaba después de la semana 12, los estudios con pilocarpina y VIP se limitaron a los dos últimos grupos de edades. Lo que se pudo observar en ratones normales es que en el caso de la secreción estimulada por pilocarpina + VIP la tasa de flujo salival y la secreción de amilasa aumentaron significativamente en todas las edades, en relación a la estimulación con pilocarpina sola (Figura 4). Sin embargo aunque el VIP aumenta la acción de la pilocarpina en los ratones BALB/c esto no sucede en los ratones NOD. Por el contrario a las 12 semanas de edad los ratones NOD no presentan diferencias significativas entre la tasa de flujo salival proveniente de la estimulación con pilocarpina de la proveniente del estímulo con pilocarpina y VIP. Esta ausencia de estimulación con VIP se mantiene en los ratones NOD del grupo etario comprendido entre 12-18 semanas.

Cuando se analiza la secreción de amilasa como índice de secreción proteica, observamos que no hay diferencias significativas a las 10 semanas (datos no mostrados) ni a las 12-14 semanas en los ratones NOD con respecto a los ratones BALB/c. Pero como se ilustra en la figura 4 en los ratones controles la liberación de amilasa aumenta significativamente al coestimular con VIP respecto al tratamiento con pilocarpina en ambos grupos de edades. En los NOD también falla la estimulación de la secreción proteica con VIP respecto a pilocarpina desde las 12-14 semanas y un efecto menor se observa en el siguiente grupo etario.

Estos resultados indican que los ratones NOD presentan un menor flujo salival que los ratones controles a partir de las 12 semanas. Por otro lado, si bien en los ratones controles hay un aumento de la secreción salival y proteica al coestimular con VIP, en este modelo de síndrome de Sjögren habría una menor respuesta ante ese estímulo.

Expresión de Citoquinas

Los defectos en el sistema inmune de los NOD se cree que pueden contribuir a la iniciación de la respuesta autoinmune. Otros autores determinaron que la producción elevada de IL-12 por células presentadoras de antígeno en estos ratones podría dar lugar a un corrimiento de la respuesta T hacia el fenotipo Th1 observado en el curso de la sialoadenitis. Por otro lado se había descrito un aumento de citoquinas Th1 en infiltrados linfocitarios de glándulas de ratones NOD de 20 semanas. Por tal motivo nuestro objetivo

Resultados y Conclusiones



fue determinar en qué momento del desarrollo de la enfermedad en los ratones NOD se producía ese desbalance de las citoquinas hacia un perfil Th_1 .

Por tal motivo medimos los niveles de dos citoquinas Th_1 como son el $TNF-\alpha$, y la IL-12 en el suero de ratones NOD de 8, 10, 12, 15 y 16 semanas. Por otro lado también medimos una de las más representativas citoquinas que se encuentra involucrada en los procesos anti-inflamatorios como es la IL-10. También realizamos un cultivo de esplenocitos estimulados con anti-CD3 y anti-CD28, para poder determinar la máxima respuesta de producción de citoquinas Th_1 y Th_2 en los sobrenadantes. Por último medimos niveles de citoquinas en glándulas salivales de ratones NOD en dos tiempos que abarcan el período donde comienza la disfunción secretoria.

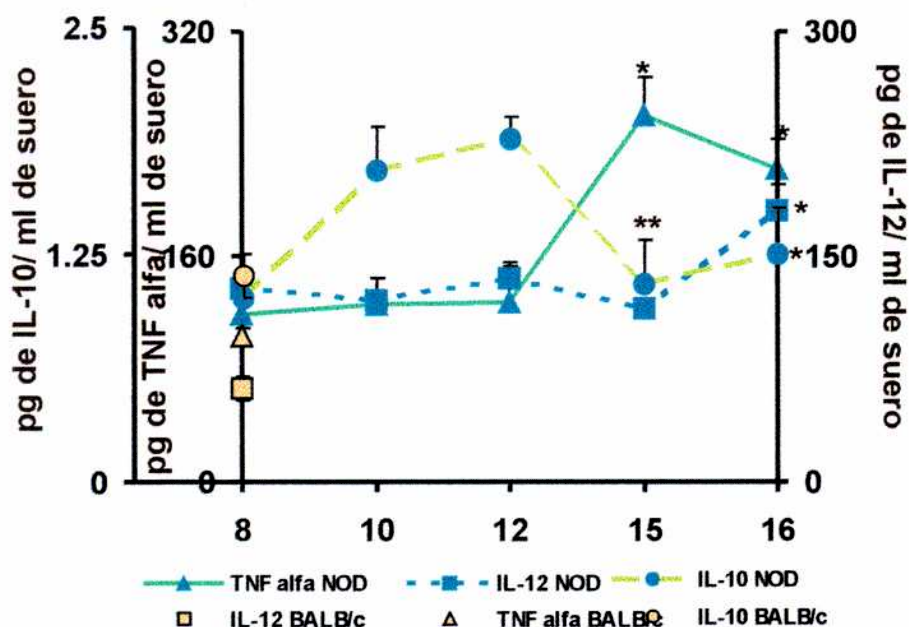


Figura 5: Niveles de citoquinas en suero de ratones NOD y BALB/c. Se obtuvo suero de ratones NOD de diferentes edades y de controles. Se midieron los niveles de citoquinas por elisas como se describe en materiales y métodos. Los valores son la media $\pm$ ES de 4 ratones. * Diferencias significativas con respecto a los ratones controles y a los NOD de 8 semanas, $p < 0.05$. ** $p < 0.05$ vs. 12 semanas.

En la figura 5 se puede apreciar que existe un incremento de los niveles de $TNF-\alpha$ en el suero de los ratones NOD a partir de las 15 semanas. Paralelamente, los niveles de IL-10 disminuyen en el suero en la misma semana. La otra citoquina Th_1 , IL-12, aumenta de forma significativa en la semana 16.

Resultados y Conclusiones



Cuando analizamos la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de NOD, podemos observar que sólo IFN- γ (Th₁) que es indetectable en sobrenadante de BALB/c aumenta más tempranamente, a la semana 12 (Figura 6). A las 15 semanas se observa un aumento de las 3 citoquinas.

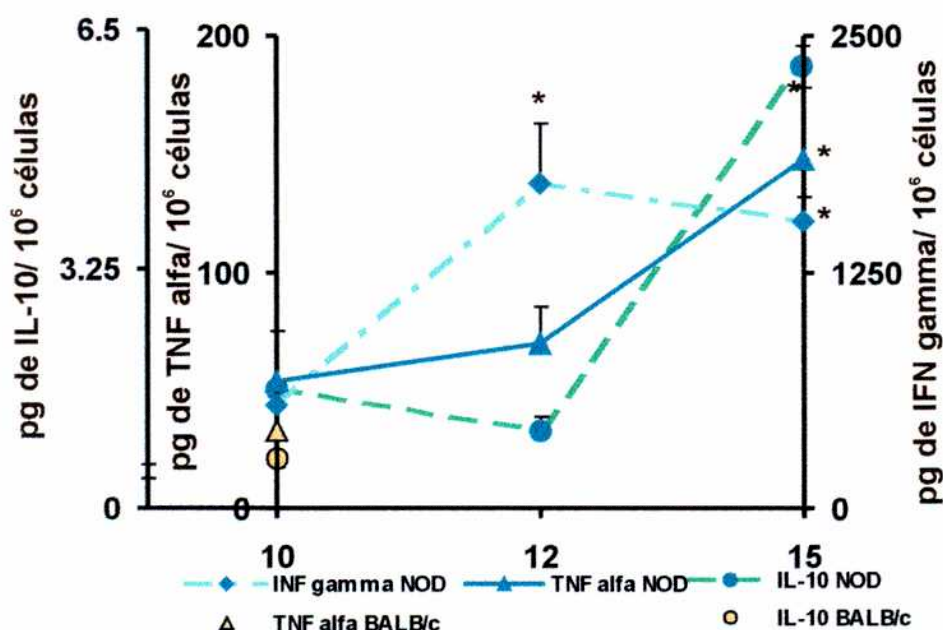


Figura 6: Niveles de citoquinas en esplenocitos de bazo de ratones NOD y BALB/c. Se obtuvieron células de bazo de ratones NOD de diferentes edades y controles. Se incubaron 48 horas con anti-CD3-CD28 y en el sobrenadante se midieron los niveles de citoquinas como se describe en materiales y métodos. Los valores son la media $\pm$ ES de 4 ratones. * Diferencias significativas con respecto a los ratones controles y a los NOD de 10 semanas, $p < 0.05$.

Sin embargo no se observan cambios en los niveles de citoquinas en las glándulas submaxilares en las dos edades estudiadas (Tabla 3). Se detectó una disminución de la IL-10 en parótida de ratones NOD a las 15 semanas.

	BALB/c		NOD			
	Submaxilar	Parótida	12 semanas		15 semanas	
			Submaxilar	Parótida	Submaxilar	Parótida
TNF α	0.31 $\pm$ 0.09	7.04 $\pm$ 2.08	0.38 $\pm$ 0.06	4.83 $\pm$ 0.90	0.21 $\pm$ 0.06	5.48 $\pm$ 0.81
INF γ	2.86 $\pm$ 1.14	15.97 $\pm$ 1.92	2.57 $\pm$ 0.39	14.99 $\pm$ 2.21	3.19 $\pm$ 0.13	26.65 $\pm$ 8.72
IL-10	0.97 $\pm$ 0.29	7.82 $\pm$ 1.84	2.15 $\pm$ 0.54	6.39 $\pm$ 0.70	1.96 $\pm$ 0.61	2.27 $\pm$ 0.61*

Tabla 3: Niveles de citoquinas en extracto de glándulas salivales de ratones NOD de 12 y 15 semanas y ratones controles de entre 12 y 15 semanas (no hubo cambios con la edad en el grupo control). Se realizaron extractos de tejidos como se describe en materiales y métodos. Posteriormente por la técnica de elisa se determinó los niveles de citoquinas presentes en los extractos. * $p < 0.05$ con respecto a los ratones NOD de 12 sem y controles.

Resultados y Conclusiones



De este grupo de experimentos podemos concluir que en los ratones NOD no existe una asociación entre el inicio de la disfunción salival, la alteración en la morfología de las glándulas salivales y el desbalance de citoquinas Th_1/Th_2 . En estos ratones la disfunción salival precede a los otros dos fenómenos estudiados.

Actividad de Óxido Nítrico Sintasa

Dado que el óxido nítrico interviene en la secreción salival mediada por receptores muscarínicos como también participa en la señalización activada por VIP en tejidos exócrinos, investigamos la actividad de la óxido nítrico sintasa en condiciones basales y estimuladas en ratones NOD de diferentes edades y sexos.

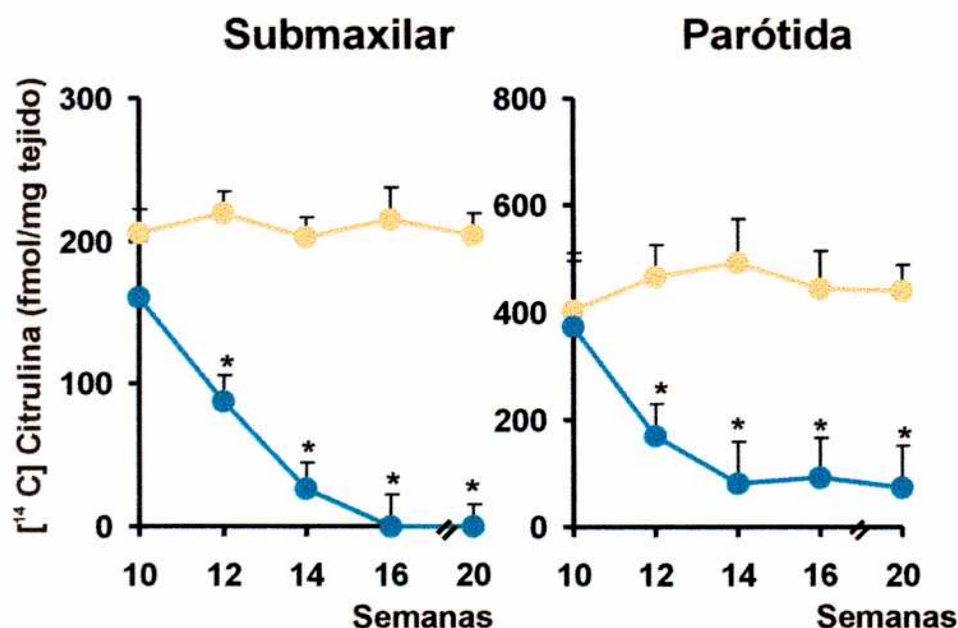


Figura 7: Efecto de la edad en la actividad de NOS en glándulas submaxilar y parótida de ratones NOD y controles. Glándulas salivales de hembras NOD (●) y BALB/c (●) fueron incubadas para la determinación de NOS como es indicado en materiales y métodos. En machos de 12 semanas ninguno de ellos presenta disminución de NOS en las glándulas salivales, en cambio a las 16 semanas de edad 1/3 de los machos analizados desarrollan la alteración. Los valores representan la media $\pm$ ES de al menos 5 experimentos. * Diferencias significativas con respecto a los valores de los ratones controles y a los NOD de 10 semanas, $p < 0.05$.

La Figura 7 muestra la actividad basal de la enzima óxido nítrico sintasa en las glándulas submaxilares y parótidas de ratones NOD de distintas edades. En ambas glándulas salivales se puede observar una disminución progresiva

Resultados y Conclusiones



de la actividad con la edad que es más evidente en las glándulas submaxilares que en las parótidas.

En vista de estos resultados decidimos trabajar con ratones hembras de 14 a 16 semanas en los que el efecto de reducción de la actividad de NOS era máximo y se manifestaba en más del 80 % de las hembras.

Con el objeto de determinar si las isoformas de NOS involucradas en este efecto son dependientes de calcio, se determinó la actividad de NOS en presencia de 5 mM de EGTA para inhibir la producción de la [14 C]-citrulina generada por las isoformas NOS I y III.

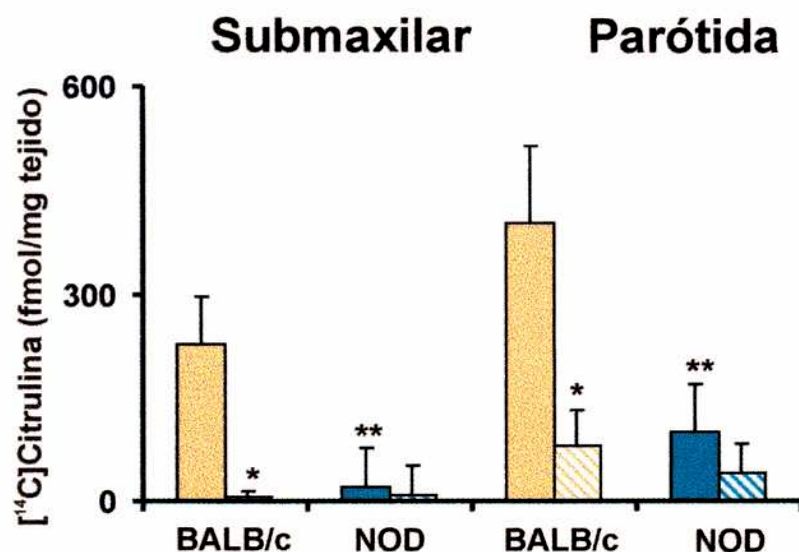


Figura 8: Actividad de NOS en glándulas submaxilar y parótida de ratones NOD y controles. Glándulas submaxilares de ratones NOD (●) y BALB/c (●) de 14-16 semanas fueron incubadas con L-[U- 14 C]-arginina. La actividad de NOS se determinó según se describe en materiales y métodos. Los experimentos se realizaron en ausencia de 5 mM de EGTA (●) o presencia (▨) como es indicado en el gráfico. Los valores representan la media $\pm$ ES de 6 experimentos. * Diferencias significativas con respecto a la actividad total en ausencia de EGTA, $p < 0.05$. ** Diferencias significativas con respecto a la actividad total en los ratones controles, $p < 0.01$.

La figura 8 muestra que las isoformas predominantes en condiciones basales en las glándulas submaxilares y parótidas de los ratones controles son dependientes de calcio dado que no se detectó actividad en presencia de EGTA. Por otro lado la figura 8 muestra que la actividad de la NOS en los ratones NOD de esta edad no es detectable y por lo tanto difiere

Resultados y Conclusiones



significativamente ($p < 0,01$) de la medida en los ratones controles. Además, no hay diferencia significativa entre la actividad medida en presencia o ausencia de EGTA. Es interesante notar que, aunque de menor magnitud, las parótidas de ratones NOD muestran un efecto similar a las submaxilares, a diferencia de lo observado en el análisis histológico en que sólo las glándulas submaxilares presentaban alteraciones estructurales.

Para establecer si la actividad de NOS era sensible a la estimulación por neurotransmisores responsables de la secreción salival, se midió la actividad de NOS en glándulas submaxilares de ratones NOD y controles en presencia de un agonista muscarínico, carbacol, como de VIP o estimulados por ambos sialogogos.

En la figura 9 se puede observar que en los ratones BALB/c el carbacol no aumenta significativamente la actividad de NOS. Asimismo, en estos ratones se pudo observar un aumento significativo de la actividad de NOS con 10^{-8} M VIP y con la estimulación conjunta de carbacol y VIP. Sin embargo la actividad de óxido nítrico sintasa en las glándulas submaxilares de los ratones NOD no se modificó en presencia de estos estímulos. En glándulas parótidas los resultados fueron similares.

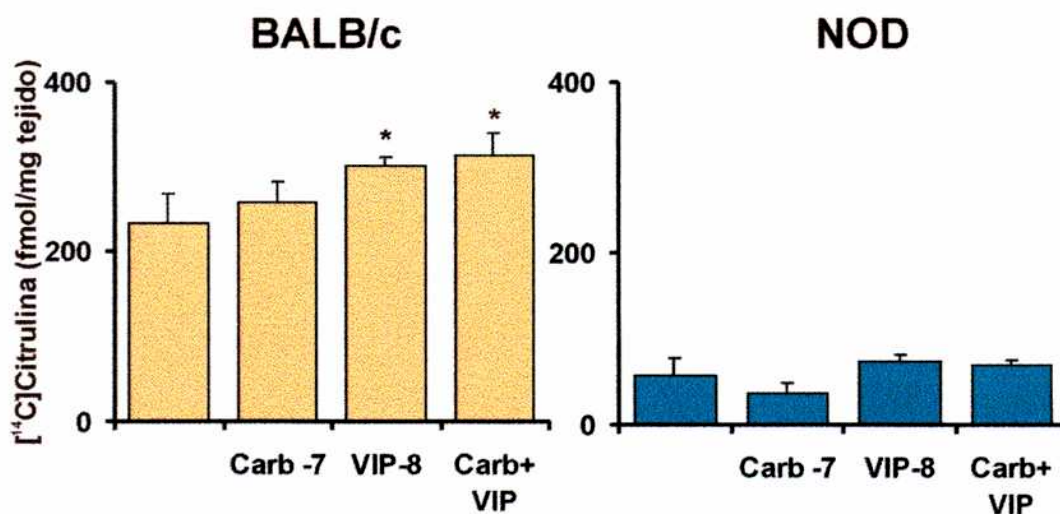


Figura 9: Efecto del VIP y carbacol en la actividad de NOS en glándulas submaxilar de ratones NOD y controles. Glándulas submaxilar de NOD (●) y BALB/c (●) fueron incubadas con el sustrato y carbacol 10^{-7} M o VIP 10^{-8} M o una mezcla de ambos según corresponda. Posteriormente se realizó la determinación de NOS, como es indicado en materiales y métodos. Los valores representan la media $\pm$ ES de al menos 5 experimentos. *Diferencias significativas con respecto a valores basales, $P < 0,05$.

Resultados y Conclusiones

Señalización mediada por óxido nítrico

Medición de niveles de GMPc

Uno de los blancos de acción del óxido nítrico es la activación de guanilil ciclasa soluble, produciendo un aumento en la concentración de GMPc intracelular y promoviendo la secreción de agua y electrolitos, y proteínas. Por tal motivo medimos la acumulación de este nucleótido cíclico en glándulas submaxilares y parótidas de ratones NOD de 15 semanas en condiciones basales y luego de la estimulación con VIP (Figura 10).

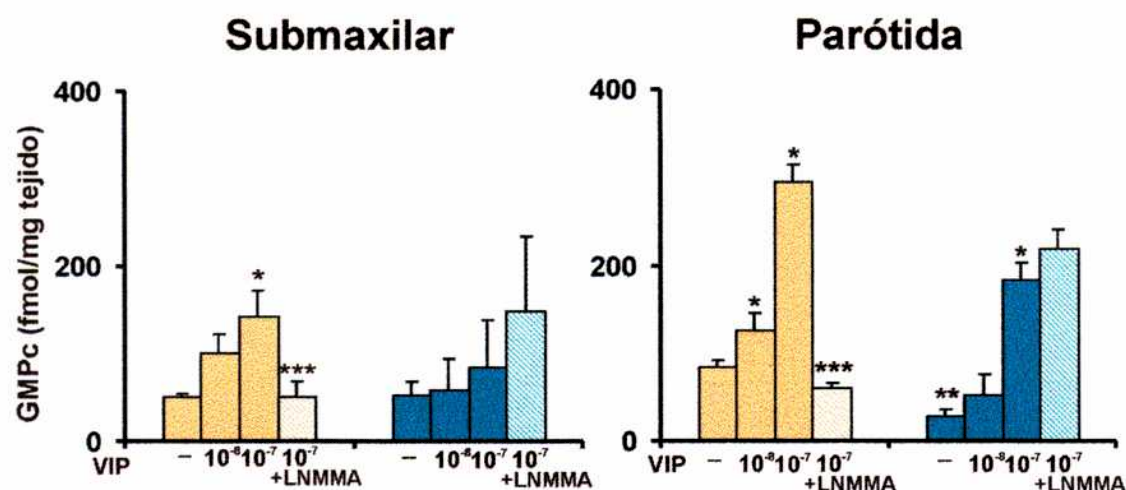


Figura 10: Efecto del VIP en la acumulación de GMPc en glándulas submaxilar y parótida de ratones NOD y controles. Glándulas salivales de NOD (●) y BALB/c (●) fueron incubadas con concentraciones crecientes de VIP para la posterior determinación de los niveles intracelulares de GMPc, como es indicado en materiales y métodos. Los valores representan la media $\pm$ ES de al menos 5 experimentos. *Diferencias significativas con respecto a valores basales, $p < 0.05$. ** Diferencias significativas entre el mismo tratamiento con respecto a los ratones controles, $p < 0.05$. *** Diferencias significativas con respecto a la misma concentración de VIP pero sin el inhibidor de NOS, $p < 0.001$.

Se observó un aumento de la acumulación de GMPc en ambas glándulas salivales de ratones BALB/c estimuladas con el neurotransmisor. Sin embargo, las glándulas submaxilares de los ratones NOD no responden al VIP a esas concentraciones y las parótidas de estos mismos ratones presentan menor respuesta al VIP que los ratones controles. Con el objeto de evaluar la participación de la NOS en la producción y acumulación de GMPc se incubaron las glándulas con VIP en presencia de LNMMA para inhibir la actividad de la NOS. En los ratones controles el aumento de los niveles del nucleótido cíclico fue inhibido significativamente ($p < 0.001$) por LNMMA, sugiriendo que el aumento de GMPc se debe a la acción del óxido nítrico. Sin



Resultados y Conclusiones

embargo, si bien estimulando con VIP se produce un aumento en los niveles de GMPc en las glándulas parótidas de los ratones NOD, esta acumulación de GMPc no es debida a la acción del óxido nítrico ya que no existen diferencias significativas en el tratamiento con VIP 10^{-7} M en presencia y ausencia de LNMMA.

Los niveles de GMPc estimulados por VIP se midieron en presencia de atropina $1 \cdot 10^{-7}$ M para comprobar si el efecto del VIP era indirecto, a través de un cambio de afinidad de los receptores muscarínicos de acetilcolina. No se observaron diferencias significativas en los niveles de GMPc con y sin atropina (datos no mostrados) sugiriendo un efecto directo del VIP para activar la acumulación de este mensajero cíclico.

Resumiendo los resultados expuestos hasta aquí, podemos decir que en las glándulas submaxilares de los ratones NOD no se detecta actividad de la óxido nítrico sintasa en condiciones basales ni ante la estimulación de receptores muscarínicos o de VIP. El efecto comienza a las 12 semanas y es similar, aunque de menor magnitud, en parótidas. Asimismo, en las glándulas de estos ratones no se observa acumulación de GMPc mediada por NO en respuesta al VIP.

Con el objeto de investigar posibles mecanismos responsables de este efecto sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa en las glándulas submaxilares, planteamos las siguientes hipótesis:

- A. Alteración en la expresión y/o localización de una o varias de las isoformas de NOS en las glándulas salivales.**
- B. Alteración en la transcripción del ARNm de la o las isoformas involucradas.**
- C. Regulación de la actividad de la NOS por disponibilidad de sustratos o cofactores de la enzima.**
- D. Regulación de la actividad por fosforilación mediada por quinasas**



Resultados y Conclusiones

Alteración en la expresión y localización de una o varias de las isoformas de NOS en las glándulas salivales.

Expresión de isoformas de NOS por inmunodetección sobre nitrocelulosa

El siguiente paso consistió en identificar las diferentes isoformas de la NOS y las posibles alteraciones en alguna o algunas de ellas en las glándulas salivales de los ratones NOD. Para ello se realizaron homogenatos de glándulas salivales, y los extractos de las mismas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y a una posterior inmunodetección con anticuerpos monoclonales específicos contra las tres isoformas de la NOS (immunoblotting). Además del control positivo para cada isoforma, provisto por el fabricante junto con los anticuerpos, se utilizó como control positivo un extracto de corteza cerebral de los mismos animales de los cuales se habían extraído las glándulas salivales.

La figura 11 muestra una modificación en el patrón electroforético de la NOS I en glándulas submaxilares de ratones NOD. En cambio en la parótida de los ratones NOD se observó una disminución de la intensidad de la banda. La modificación en el patrón electroforético de NOS I no se observa en el cerebro de estos animales.

Para lograr la inmunodetección de las isoformas NOS II y NOS III con el método de detección de fosfatasa alcalina, se debió aumentar la concentración proteica de los homogenatos para sembrar en cada calle del gel. Se pasó de 75-100 µg/calle a 150-200 µg/calle, confirmando de este modo los resultados de otros autores sobre la expresión mayoritaria de NOS I en este tipo de tejido exócrino. Como muestra la figura 11, no se observaron diferencias significativas en la expresión de la isoforma NOS II, ni en la NOS III entre BALB/c y NOD en ninguno de los tejidos estudiados. Incluso no se detectó la presencia de NOS II en glándulas submaxilares de ratones NOD ni en los controles por este método.

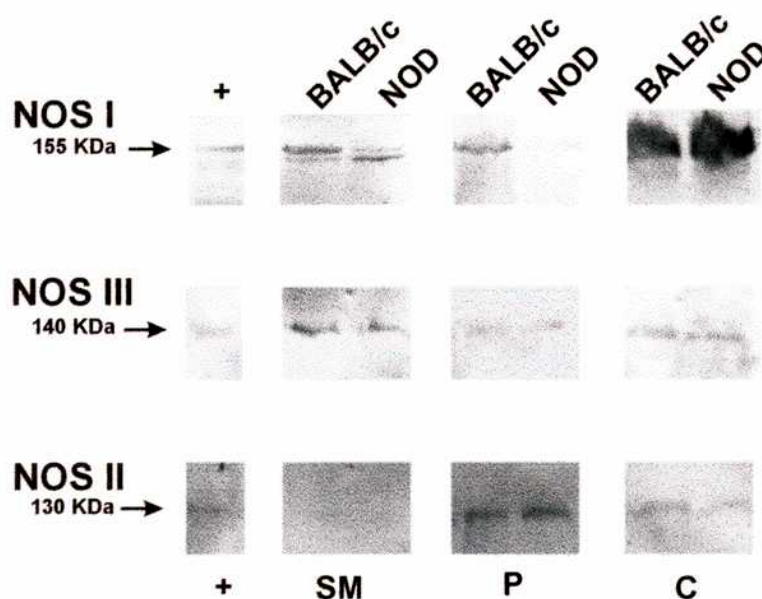


Figura 11: Expresión de las isoformas de NOS en glándulas salivales y cerebro de ratones NOD y BALB/c. Los extractos de tejidos de ratones NOD y BALB/c fueron obtenidos como se describe en materiales y métodos. Extractos de glándulas submaxilares (SM), parótidas (P), corteza cerebral (C) y control positivo (+) fueron sometidos a una SDS-PAGE 7,5% y posteriormente a ensayos de inmunoblotting con anticuerpos monoclonales específicos para las isoformas NOS I, II, III. Las flechas indican las bandas correspondientes a cada isoforma, con el peso molecular relativo en kDa. El resultado mostrado es representativos de al menos 5 experimentos similares

Localización de la isoforma NOS I por inmunohistoquímica

Basándonos en los resultados de actividad acerca de la participación de isoformas dependientes de Ca^{+2} , y en los resultados de inmunodetección sobre nitrocelulosa donde el perfil electroforético de la isoforma NOS I se encontraba alterado, nos centramos en el estudio de esta isoforma en glándulas submaxilares y determinamos su localización y distribución en cortes de tejido glandular.

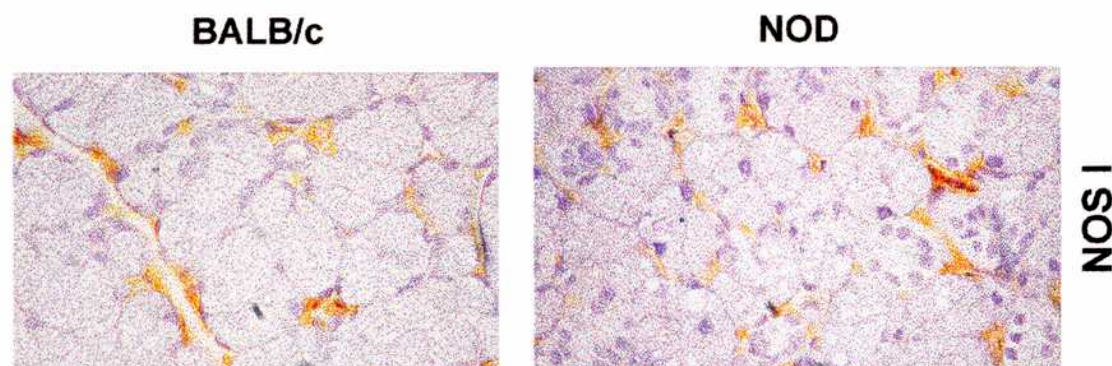


Figura 12: Inmunohistoquímica de NOS I en glándulas submaxilares de ratones NOD y controles. Glándulas submaxilares de ratones NOD y BALB/c fueron extraídas y fijadas e incluidas en parafina como se indica en materiales y métodos. Posteriormente se realizaron inmunodetección de NOS I con anticuerpos como se describe en materiales y métodos.

No se observan diferencias en la localización de la isoforma NOS I en las glándulas submaxilares de los ratones NOD y los controles (figura 12). Resultados idénticos se observaron en glándulas parótidas para esta isoforma, indicando que la menor actividad de NOS observada en los ratones NOD no se debe a una diferente expresión o localización en las glándulas salivales.

Alteración en la transcripción del ARNm de NOS I

En vista de la alteración observada en el patrón electroforético proteico de la NOS I, nos preguntamos si los niveles de ARN mensajero (ARNm) de esta isoforma podrían estar alterados en las glándulas de los ratones NOD. Se realizaron ensayos de RT-PCR en extractos conteniendo ARNm de las glándulas salivales de ratones NOD y BALB/c, y como control positivo se utilizó corteza cerebral de los mismos animales.

Como se observa en la figura 13, no hay diferencias significativas en los niveles de ARN mensajero en las glándulas submaxilares y parótidas de las dos cepas de ratones, por lo cual la menor actividad y diferente patrón de expresión no pueden ser atribuibles a variaciones en los niveles del mensajero de NOS I. Por tanto nos orientamos al estudio de una posible regulación negativa de la actividad de NOS por diferencias en la disponibilidad de cofactores, por la menor accesibilidad del sustrato o por modificaciones post-traduccionales capaces de inhibir la actividad de la enzima, como se propuso para la fosforilación por PKC o CaMKII.

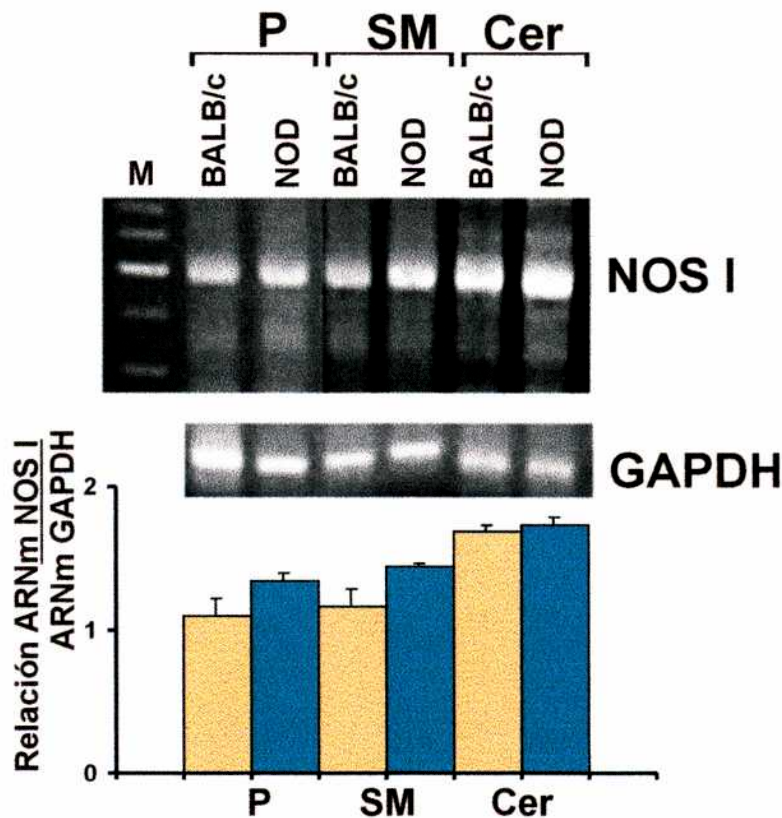


Figura 13: Expresión del ARN mensajero de la isoforma NOS I en glándulas salivales y corteza cerebral de ratones NOD y BALB/c. Los ARNs de tejidos de ratones NOD y BALB/c fueron obtenidos como se describe en materiales y métodos. ARN de glándulas submaxilares (SM), parótidas (P), corteza cerebral (Cer) fueron sometidos a una RT-PCR con *primers* específicos para NOS I y GAPDH. Los resultados son representativos de 4 experimentos similares y las barras indican las áreas relativas de las bandas obtenidas en esos 4 experimentos.

Regulación de la actividad de la NOS por disponibilidad de sustrato o cofactores de la enzima.

Disponibilidad de sustrato y cofactores de la NOS

La NOS requiere la presencia de diversos cofactores para su actividad, y una deficiencia en alguno de estos puede producir una disminución en la actividad de la enzima. Otro factor que podría reducir la actividad enzimática es un menor acceso al sustrato, por ejemplo por una deficiencia en el transporte del sustrato al medio intracelular.

Resultados y Conclusiones



Se realizaron estudios para comprobar si algunos de estos fenómenos eran responsables de la disminución de la actividad de la NOS que se observa en los ratones NOD de alrededor de 15 semanas. Para ello se modificó la técnica de medición de la actividad de óxido nítrico sintasa. La técnica empleada hasta el momento permitía medir la conversión de arginina en citrulina en el tejido intacto en lugar de en un extracto, es decir, no supone el agregado de cofactores en forma exógena sino que el tejido, en un medio fisiológico y oxigenado permanentemente, utiliza los cofactores disponibles en el medio intracelular. Del mismo modo, el aporte de arginina marcada exógena también se encuentra sujeto a los mecanismos de transporte del aminoácido a través de la membrana. Por todo esto y en el marco de la hipótesis de que la menor actividad de NOS estuviera relacionada con una menor disponibilidad de cofactores o de sustrato, realizamos la determinación de la actividad de NOS en un extracto de tejido glandular en presencia de cofactores agregados de forma exógena al medio de incubación.

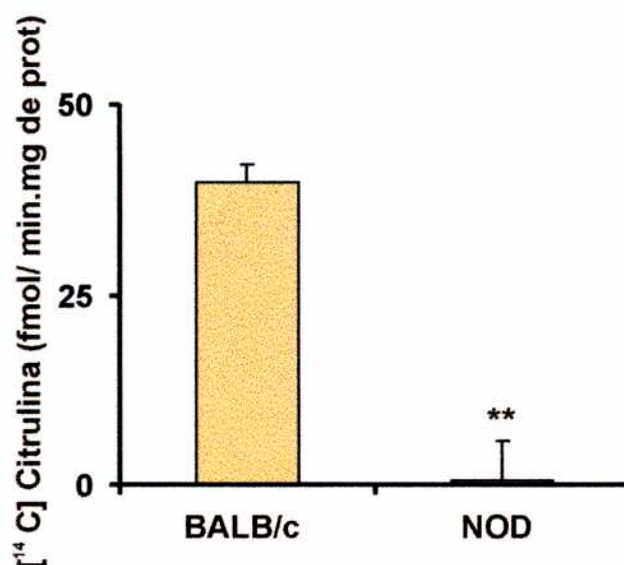


Figura 14: Actividad de NOS en extracto de glándulas submaxilares de ratones NOD y controles. Homogenatos de glándulas submaxilares de ratones NOD (●) y BALB/c (●) fueron incubadas con el agregado del sustrato y los cofactores de NOS y en presencia y ausencia del inhibidor de NOS, como se indica en materiales y métodos. Los valores representan la media $\pm$ ES de 3 experimentos. ** Diferencias significativas con respecto a los ratones controles, $p < 0.05$.

La figura 14 muestra la actividad de la NOS medida en glándulas submaxilares de los ratones BALB/c en estas condiciones. En cambio en los ratones NOD no se detecta la actividad de la enzima descartando que la

Resultados y Conclusiones



disminución de la actividad de NOS observada en estos ratones NOD se deba a una menor disponibilidad de sus cofactores o a un impedimento en el transporte de la arginina al citosol.

Utilización de la arginina por otras vías metabólicas

La disponibilidad de sustrato también podría modificarse por la utilización del mismo en otras vías metabólicas que no condujeran a la producción de NO, como por ejemplo el ciclo de la urea. Como ha sido mencionado anteriormente el método utilizado para medir la actividad de la NOS consiste en la determinación de la conversión enzimática de L-[14 C]-arginina en [14 C]-citrulina. También la arginasa consume L-arginina para producir urea. Con el objeto de estudiar si en las glándulas salivales de los ratones NOD se observan diferencias en la actividad de arginasa, se evaluó la la formación de urea en dos concentraciones de arginina.

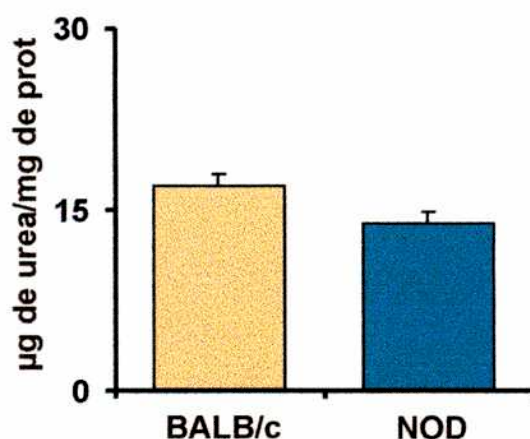


Figura 15: Medición de producción de urea por glándulas submaxilares de ratones NOD y controles. Las glándulas submaxilares de ratones NOD (●) y BALB/c (●) se incubaron en presencia de arginina (1,5 μ M). Posteriormente se midieron los niveles de urea presentes en la glándulas submaxilares como es indicado en materiales y métodos. Los valores representan la media $\pm$ ES de 3 experimentos.

En la figura 16 se muestra la conversión de arginina en urea por las glándulas submaxilares de hembras de ratones NOD y controles. Se puede apreciar que no existen diferencias significativas en la actividad entre ambas cepas de ratones. Con arginina 10 μ M en glándulas submaxilares y en las glándulas parótidas con ambas concentraciones tampoco se observaron diferencias (datos no mostrados). Estos resultados indican que la actividad de

Resultados y Conclusiones



arginasa es semejante en las glándulas de ambas cepas y, a estas concentraciones de sustrato, esta vía enzimática no participaría en la disminución de la formación de [14 C]-citrulina observada.

Regulación de la actividad por fosforilación mediada por quinasas

Regulación post-traducciona por PKC

Se ha demostrado que la óxido nítrico sintasa es capaz de ser regulada por fosforilación. Diversos autores postulan que varias proteínas quinasas son capaces de mediar dicha acción. Recientemente hemos descrito una regulación negativa de la actividad de NOS por PKC en glándulas submaxilares y parótidas de rata. Pero otra quinasa, como es el caso de la quinasa dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina II (CaMK II), también podría tener un papel clave en la regulación negativa de la NOS, especialmente de la NOS I (Hayashi, 1999). Por tal motivo, estudiamos la actividad de NOS en las glándulas salivales de ratones NOD y controles en presencia de inhibidores selectivos para estas quinasas.

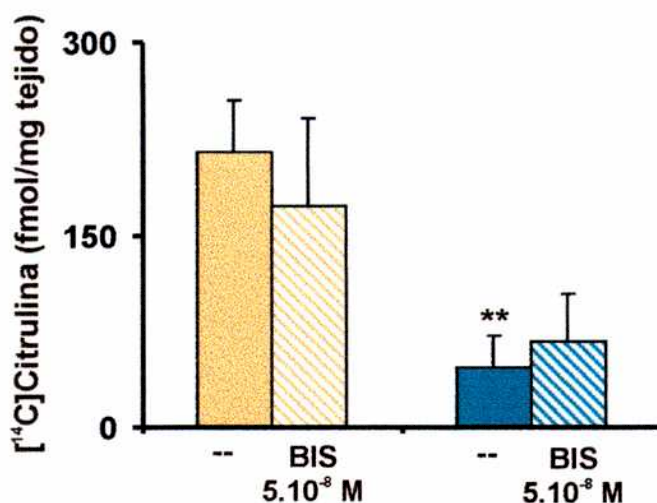


Figura 16: Efecto del inhibidor de PKC sobre la actividad de NOS en glándulas submaxilares de ratones NOD y controles. Glándulas submaxilares de ratones NOD (●) y BALB/c (●) fueron incubadas con el sustrato y en presencia o ausencia de 50 nM de bisindolilmaleimida (BIS), según corresponda. Posteriormente se determinó la actividad de NOS, como se indica en materiales y métodos. Los valores representan la media $\pm$ ES de 3 experimentos. **Diferencias significativas con respecto a los ratones controles, $p < 0.05$.

Resultados y Conclusiones



En primer término se realizaron ensayos de actividad de la óxido nítrico sintasa en condiciones basales y en presencia de un inhibidor específico de PKC, como es la bisindolilmaleimida, a una concentración que inhibe selectivamente la proteína quinasa C.

En la figura 16 se observa que la actividad de la NOS en glándulas submaxilares no se modifica en presencia del inhibidor de PKC en los ratones NOD ni en los controles. Si existiera una regulación por fosforilación en glándulas submaxilares de ratones ésta no sería mediada por PKC.

Regulación post-traducciona por CaMKII

En segundo término, se determinó si la disminución de la actividad de la NOS podría deberse a la actividad de la quinasa CaMKII. Se realizaron ensayos de actividad de la NOS con un inhibidor de esta quinasa, como es el KN-93.

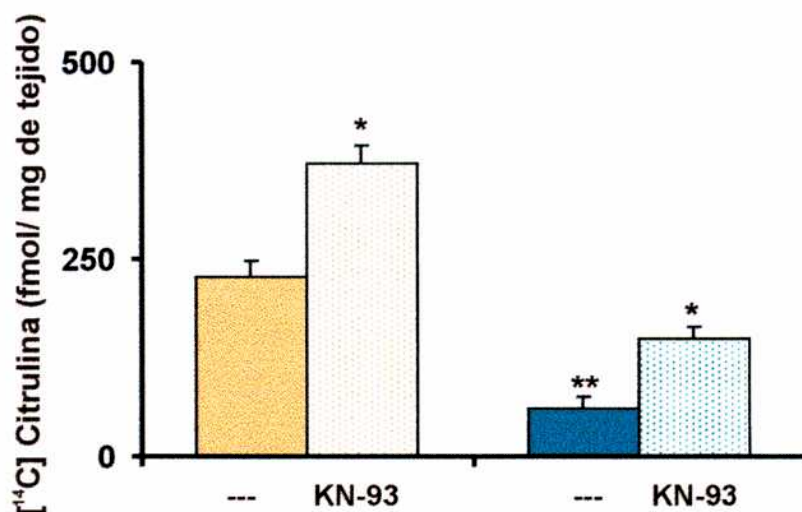


Figura 17: Efecto del inhibidor de la Calcio-Calmodulina Kinasa II sobre la actividad de NOS en glándulas submaxilares de ratones NOD y controles. La actividad de NOS se determinó como se describe en materiales y métodos. Los experimentos se realizaron con 5 μ M de KN-93 en presencia o ausencia de LNMMA. Los valores representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos. * Diferencias significativas de KN-93 vs. basal en cada cepa, $p < 0.05$. ** Diferencias significativas entre basal de NOD vs los ratones controles, $p < 0.05$.

La figura 17 muestra que al inhibir la acción de esta quinasa en las glándulas submaxilares de ratones NOD se observa un aumento significativo

Resultados y Conclusiones



($p < 0,05$) de la actividad de NOS. También se observa que en ratones BALB/c hay un aumento significativo cuando se mide la actividad de NOS en presencia del inhibidor de CaMKII. Un aumento similar en presencia del KN-93 se observa en glándulas parótidas de ratones NOD (datos no mostrados). Estos resultados indican que la disminución de la actividad de NOS podría deberse a una regulación negativa por fosforilación por parte de CaMKII.

Resultados similares se obtuvieron cuando se realizaron estas mismas mediciones de actividad de NOS en un extracto de glándulas submaxilares. Se observó que la presencia de KN-93 en el medio de incubación produce un aumento significativo ($p < 0,05$) en la actividad de la enzima en ratones NOD. Esto confirma el resultado obtenido en glándulas submaxilares enteras de estos ratones, es decir, que la CaMKII estaría inhibiendo la actividad enzimática de la NOS y no la entrada de arginina a la célula, o la disponibilidad de los cofactores (Figura 18).

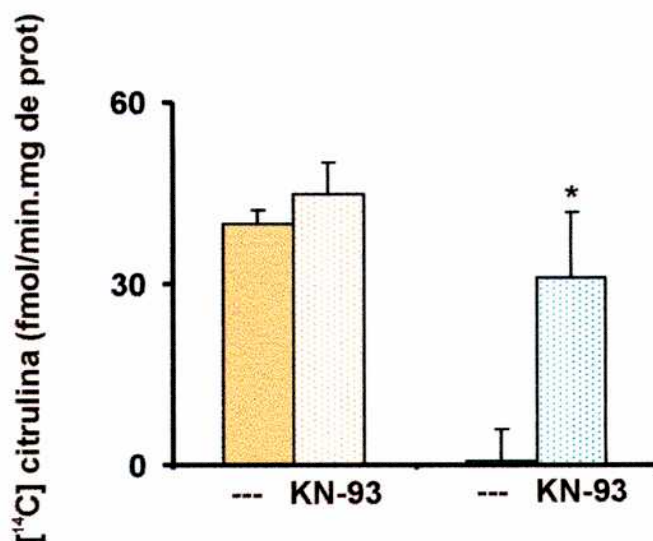


Figura 18: Efecto del inhibidor de la Calcio-calmodulina Kinasa II sobre la NOS en extractos de glándulas submaxilares de ratones NOD y controles. Homogenatos de glándulas submaxilares de ratones NOD (●) y BALB/c (●) fueron incubadas con el agregado del sustrato y los cofactores de NOS y en ausencia o presencia de KN-93. La actividad de NOS se determinó como se indica en materiales y métodos. Los valores representan la media $\pm$ ES de 3 experimentos. *Diferencias significativas con respecto al valor basal, $p < 0,005$.

Por otro lado investigamos si la inhibición de CaMKII modificaba los parámetros cinéticos de la NOS y, del mismo modo, si se alteraba la señalización mediada por óxido nítrico, como es el caso del GMPc. Se

Resultados y Conclusiones



realizaron ensayos de actividad enzimática en presencia de KN-93 con concentraciones crecientes de arginina y posteriormente se calcularon los parámetros cinéticos K_M y V_{max} .

La figura 19 muestra el gráfico de velocidades iniciales para la actividad de NOS en glándulas submaxilares de ratones BALB/c, de ratones NOD y de ratones NOD tratadas con KN-93 (NOD + KN-93). Se observa saturación en el caso de ratones BALB/c y se calcularon los parámetros cinéticos expuestos en la tabla. Esto no sucede en los ratones NOD en los que no se llega a concentraciones saturantes de arginina en el rango de concentraciones usados para los ratones controles y conocidos para la NOS en la bibliografía.

Sin embargo, la preincubación de las glándulas submaxilares de ratones NOD con KN-93 restituye la actividad de la NOS con parámetros cinéticos semejantes a los de los ratones controles (tabla 4)

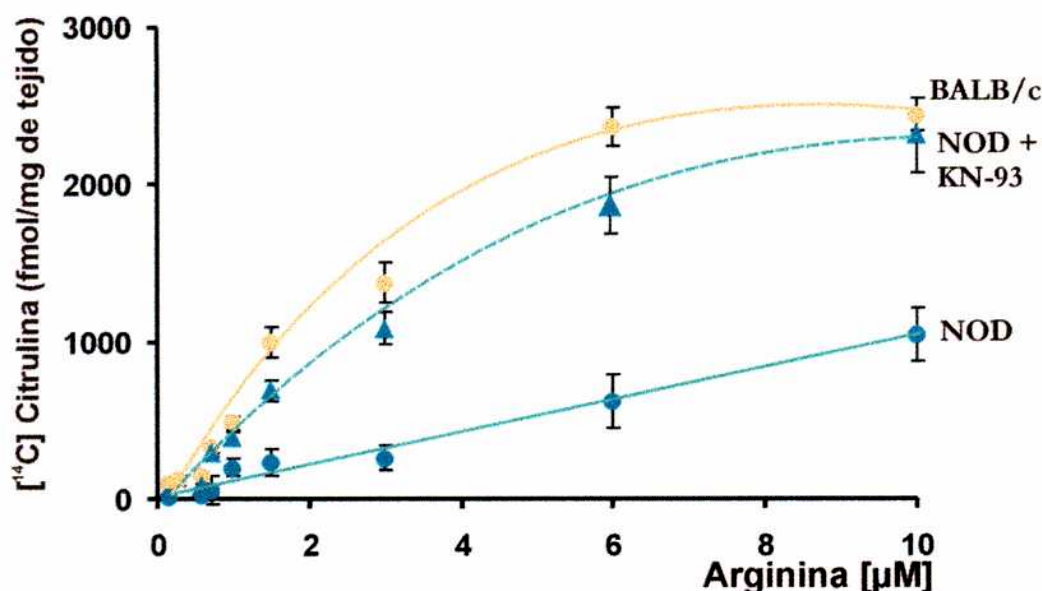


Figura 19: Actividad de NOS con concentraciones crecientes de arginina y su relación con la Calcio-Calmodulina KinasaII. Glándulas submaxilares de BALB/c (—) fueron incubadas con concentraciones crecientes del sustrato y glándulas submaxilares de ratones NOD fueron incubadas con concentraciones crecientes de arginina sola (—) o en presencia (—) de KN-93. Se determinó la actividad de NOS como se ha indicado en materiales y métodos. Los valores representan la media $\pm$ ES de al menos 4 experimentos en cada concentración de arginina.

Igualmente, quisimos ver si la inhibición de CaMKII con KN-93 modifica la acumulación de GMPc estimulada por VIP. Para ello realizamos experimentos de medición de los niveles del nucleótido cíclico en glándulas

Resultados y Conclusiones



submaxilares en condiciones basales y estimuladas con VIP 10^{-7} M en presencia o ausencia de KN-93.

	BALB/c	NOD	NOD + KN-93
K_M (μM)	$3.05 \pm 1,05$	No determinado	2.51 ± 0.94
V_{max} (fmol/mg)	2311 ± 616	No determinado	1682 ± 561

Tabla 4: Cálculo de parámetros cinéticos de la enzima óxido nítrico sintasa en glándulas submaxilares de ratones NOD y controles. Las glándulas fueron incubadas con concentraciones crecientes de arginina y posteriormente se midió la actividad de la NOS como se indica en materiales y métodos.

La figura 20 muestra que el agregado de KN-93 en el medio de incubación de las glándulas submaxilares en ratones controles no modifica significativamente la acumulación de GMPc basal ni la estimulada con VIP 10^{-7} M. En cambio, en ratones NOD se observa que el agregado de KN-93 aumenta la acumulación de GMPc estimulada por VIP, sugiriendo que la inhibición de la CaMKII también restaura la señalización mediada por óxido nítrico en las glándulas de estos ratones

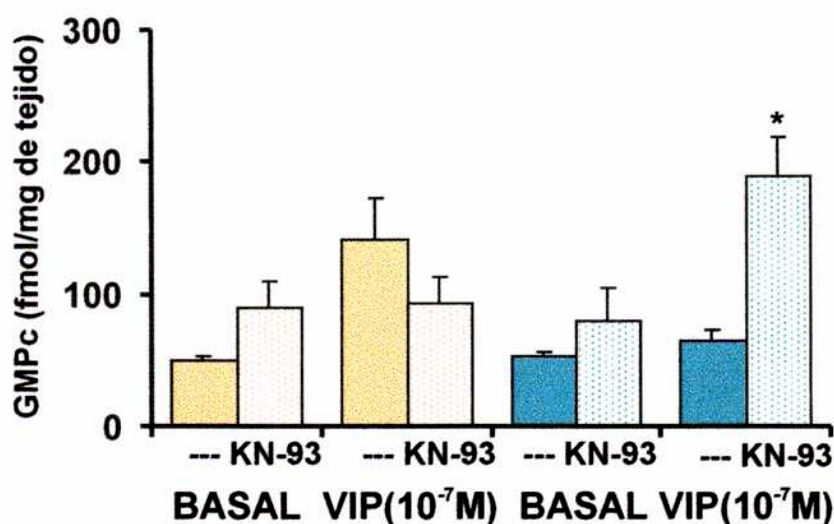


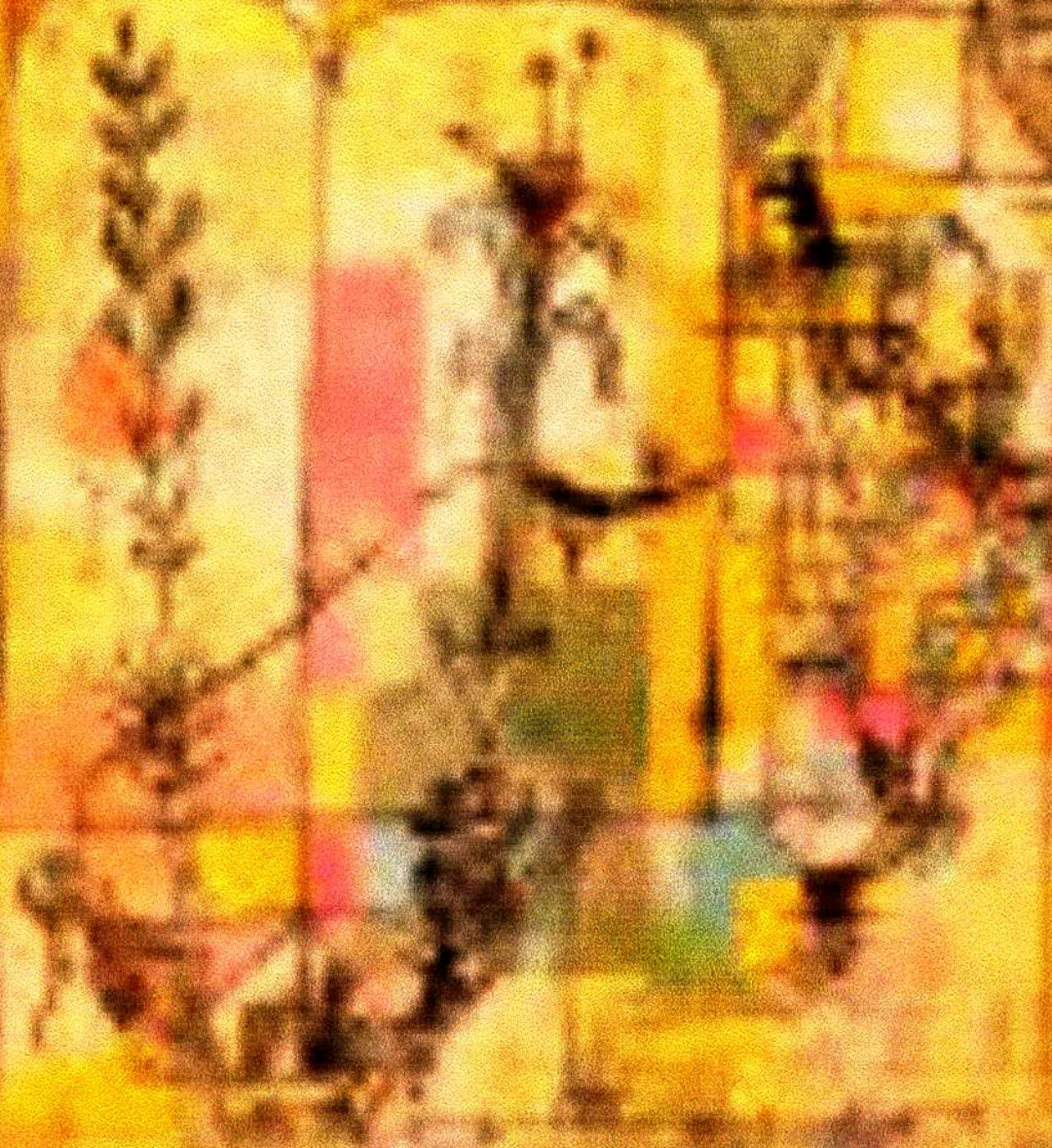
Figura 20: Efecto de la Calcio-Calmodulina Kinasa II en la acumulación de GMPc en glándulas submaxilares de ratones NOD y control. Glándulas salivales de NOD (●) y BALB/c (●) en condiciones basales o estimuladas con de VIP fueron incubadas en presencia (●) o en ausencia (●) de KN-93. La determinación de los niveles de GMPc se realizó como se indica en materiales y métodos. Los valores representan la media $\pm$ SEM de 4 experimentos. * Diferencias significativas con respecto a los niveles de GMPc en ausencia de KN-93, $p < 0.05$.



Resultados y Conclusiones

Los resultados indican una regulación negativa por CaMKII de la actividad de NOS tanto en BALB/c como en NOD. En estos últimos el inhibidor de la CaMKII restituye la actividad de NOS y la acumulación de GMPc producida por NO.

Discusión





Discusión

Los resultados expuestos indican que las glándulas salivales de ratones NOD presentan una menor actividad de NOS a partir de las 12 semanas comparada con las de ratones BALB/c de la misma edad y ratones NOD de 8 semanas. La disminución es total en el caso de las glándulas submaxilares en las que no se detecta actividad de NOS. El efecto sobre la NOS coincide con una reducción del flujo salival estimulado por pilocarpina sola o pilocarpina y VIP. Ambos efectos preceden al aumento de los niveles de citoquinas Th_1 en las glándulas y en el suero y a la aparición de infiltrados linfomononucleares en las glándulas. Además, los resultados apoyan la hipótesis de una regulación negativa de la NOS por CaM KII.

Estas conclusiones se basan en la caracterización realizada del modelo NOD en cuanto a aspectos histológicos, inmunológicos y funcionales que nos permiten distinguir cuatro etapas en el desarrollo de la sialoadenitis en los ratones NOD prediabéticos:

Una etapa temprana asintomática a las 10 semanas de edad en que se observa una morfología alterada de las glándulas submaxilares pero no de las parótidas. Las alteraciones consisten en un aumento del número de ductos por campo sin modificaciones de la estructura de las células epiteliales. La función secretoria es similar a la de los ratones controles al igual que la actividad de la NOS. No hay cambios en los niveles de citoquinas ni infiltrados inflamatorios en las glándulas.

Una segunda etapa, que comprende entre las semanas 12 y 14 de edad, en la cual la relación ductos/acinos se mantiene elevada pero con valores similares a los de la etapa anterior, comienzan a aparecer alteraciones de la morfología acinar y localización nuclear de los ductos sólo en glándulas submaxilares. Se observa una disminución del flujo salival, pero no de la secreción de amilasa. Comienza a detectarse una disminución de la actividad de la NOS que es más pronunciada en glándulas submaxilares que en parótidas.

Una tercera etapa, entre las 15 y 18 semanas de edad, en la que se observa una progresión de las lesiones histológicas: las glándulas submaxilares de los ratones presentan alteraciones morfológicas más pronunciadas hacia el



Discusión

final de esta etapa, como la vacuolización del citoplasma, entre otras. Las parótidas no muestran ninguna alteración histológica. Los niveles de citoquinas aún no se encuentran modificados en los tejidos glandulares, aunque ya hay un aumento de citoquinas Th_1 y disminución de Th_2 en el suero. Se pone en evidencia la disfunción secretoria al estimular la secreción salival con el agonista muscarínico pilocarpina como en la etapa anterior, pero en este caso está acompañada de una disminución en la secreción de amilasa salival. La actividad de NOS ya no es detectable en glándulas submaxilares y alcanza la máxima disminución en las parótidas. No se observa acumulación de GMPc mediada por NO en glándulas submaxilares ni en parótidas.

Finalmente, una cuarta etapa a las 25 semanas en que los ratones aún son prediabéticos, presentan las mismas alteraciones funcionales que en la etapa anterior con lesiones histológicas más evidentes, a las que se suma la aparición de focos de infiltración sólo en las glándulas submaxilares.

Algunas de las características señaladas habían sido descriptas por otros autores. Por ejemplo, en relación al aumento de la relación acinos/ductos observada por nosotros sólo en las glándulas submaxilares, Leiter (1998) informó que los acinos de las glándulas submaxilares de ratones NOD presentan apoptosis, no así los de las glándulas parótidas. Esta apoptosis acinar pudo ser evidenciada a partir de las 12 semanas de edad (Elkon, 1998) y podría ser indicativa de una modificación genéticamente programada (Leiter, 1998).

En cuanto a los niveles de citoquinas, no observamos cambios en los niveles de $TNF-\alpha$, IL-12 e IL-10 en el suero hasta las 15 semanas. En los tejidos blancos de la respuesta autoinmune, tanto en glándulas submaxilares como en parótidas, no hay variaciones de los niveles de las citoquinas Th_1 y Th_2 analizadas a lo largo del período estudiado. Y en el bazo, si bien $TNF-\alpha$ e IL-10 no se modifican hasta las 15 semanas tal como en el suero y los tejidos, el IFN gamma ya se encuentra aumentado en los sobrenadantes de esplenocitos con respecto a los ratones BALB/c y se incrementa aún más a las 12 semanas. Una mayor producción de IFN gamma desde etapas tempranas fue descrita en ratones NOD y fue relacionada con el desarrollo de la diabetes (Tsumura, 1989). El incremento de IFN gamma observado por nosotros a las 12 semanas como la única citoquina Th_1 de aparición temprana podría deberse a una población de esplenocitos productores de IFN gamma con un umbral más bajo de activación. Sin embargo, el hecho de que los niveles de IFN gamma no aumenten en los tejidos sugiere que tales células no estarían presentes como residentes en las glándulas a las 12 semanas. Otros autores



Discusión

han determinado un aumento de citoquinas Th1 en glándulas submaxilares de ratones NOD pero éste fue detectado a las 20 semanas (Fox, 1994). En cuanto a la expresión de estos mediadores, se ha descrito un aumento de la expresión de las citoquinas IL-1, IL-2, IL-10 e IFN gamma en las glándulas submaxilares de ratones de 20 semanas (Robinson, 1998). Por su parte Yamano y colaboradores (1999) observaron una expresión mayor de IL-1, IL-2 e IL-10 por inmunohistoquímica en las células de los infiltrados presentes en las glándulas y Yanagi y col. (1998) encontraron un perfil diferente de expresión local de ARNm de IL-10 e IL-12 en glándulas submaxilares de estos ratones.

No podemos descartar que los cambios en los niveles de citoquinas sean indetectables con las técnicas utilizadas, sin embargo resultados preliminares (no mostrados en esta tesis) indican que los niveles de ARNm de IL-10 son similares en las glándulas de BALB/c y NOD de 12 y 15 semanas, confirmando las observaciones descritas. Por otro lado, vale destacar que los métodos empleados aquí para la determinación de citoquinas son los mismos que se utilizan para describir mecanismos inmunopatológicos como causa de enfermedad en otros modelos de autoinmunidad e inflamación crónica como son la artritis reumatoidea en ratones DBA/2 y la enfermedad de Crohn (Delgado, 2001; Abad, 2003).

El hecho de que la reducción en la secreción estimulada por pilocarpina preceda al aumento de citoquinas proinflamatorias en el suero y en las glándulas y a la aparición de infiltrados inflamatorios en las mismas, sugiere que la respuesta autoinmune no es la responsable directa de la disfunción en las etapas tempranas. Ante esta evidencia nos preguntamos qué otros eventos en las células glandulares, no mediados por la respuesta inmune, podrían conducir a una pérdida de la función secretoria.

En otras enfermedades autoinmunes se ha propuesto que un fallo funcional en el órgano blanco podría hacer más susceptible al tejido a una respuesta autoinmune dirigida contra el mismo. Así, en el modelo de tiroiditis en el pollo obeso se observó un aumento de la captación de I_2 al suprimir la TSH, que sensibilizaría a la tiroides para la respuesta autoinmune característica (Roitt, 1998). Del mismo modo, en un modelo de miocarditis autoinmune inducido en ratones se observó una menor respuesta de las células cardíacas al estímulo de acetilcolina previo a la infiltración linfocitaria del miocardio (Perez Leiros, 1994). En cuanto a los ratones NOD, Kong y colaboradores (1998) sugirieron que la apoptosis en las glándulas submaxilares podría predisponerlas para la respuesta autoinmune. Además, se ha descrito un aumento de metaloproteasas y cambios en la expresión de receptores de



Discusión

neurotransmisores β adrenérgicos y muscarínicos en las glándulas de estos ratones, aunque dichas observaciones se hicieron en ratones de más de 16 semanas (Hu, 1994; Nguyen, 2000; Cha, 2001).

En vista de estos antecedentes y basados en la función del óxido nítrico como mensajero tanto de receptores muscarínicos como de VIP, y su acción pro-secretoria en parte a través de GMPc descritos en otras especies, decidimos investigar la integridad del sistema L-arginina/NOS/GMPc en glándulas submaxilares y parótidas de ratones NOD.

La pérdida de la actividad de NOS es progresiva a partir de las 12 semanas, coincide con el inicio de la disfunción secretoria y, como se señaló más arriba, no está asociado a un aumento de citoquinas proinflamatorias en el suero ni en las mismas glándulas. Estos resultados junto al hecho de que las parótidas no presenten ningún cambio en los niveles de citoquinas ni cambios histológicos y sin embargo el efecto sobre la NOS y sobre la acumulación de GMPc también se evidencien, permiten, nuevamente, descartar mecanismos inmunopatológicos como causa de la lesión funcional y sugieren la participación de la vía L-arginina/NOS/GMPc en la disfunción secretoria.

Nos preguntamos qué mecanismos podrían participar en la regulación negativa de la NOS en el modelo de ratones NOD.

La primera hipótesis investigada fue si una actividad o expresión diferencial de las isoformas de NOS era la responsable de estos cambios. La conclusión acerca de la dependencia de calcio de la actividad de NOS en ratones BALB/c y en NOD de 10 semanas, por un lado, y la falta de actividad de NOS en las glándulas salivales de los ratones NOD de 14 a 16 semanas frente a la activación de receptores muscarínicos de acetilcolina y de VIP, confirmó la naturaleza constitutiva de las isoformas afectadas.

Hasta el momento se había informado sobre la presencia de NOS constitutivas en glándulas salivales de rata, tanto submaxilares (Rettori, 2000; Pérez Leirós, 2001) como parótidas (Rosignoli, 2002) por mediciones *in vitro* y con inhibidores de la actividad de NOS. Por otra parte la presencia de NOS I fue detectada por inmunohistoquímica en glándulas salivales de rata y hurón (Takai, 1999; Lomnicz, 1998; Alm, 1997). También se observó que la isoforma NOS II se puede expresar de forma constitutiva en algunos tejidos de mamíferos, en los cuales se incluyen las glándulas salivales de rata, y gato (Lomnicz, 1998; Lohinai, 1995). Nuestros resultados indican que las glándulas submaxilares de ratones normales expresan mayoritariamente NOS I, una



cantidad mucho menor de NOS III y no se detecta NOS II, a diferencia de las parótidas donde también hay una leve expresión de esta isoforma.

En cuanto a los ratones NOD, las glándulas donde la actividad de NOS no era detectable presentaron un patrón electroforético alterado de la NOS I. No se observaron cambios con respecto a los ratones controles en ninguna de las otras dos isoformas. Sin embargo, la localización de la NOS I por inmunohistoquímica fue similar en ambas glándulas de ratones BALB/c y NOD, sugiriendo una modificación en la estructura más que en los niveles de la NOS I en los ratones NOD. La identificación de la NOS I como la isoforma afectada en glándulas submaxilares y parótidas sugiere un papel más importante para el óxido nítrico de este origen en la secreción salival frente al proveniente de las otras isoformas presentes. Consistente con estas observaciones, diversos autores le atribuyen una función a las isoformas dependientes de calcio y con especial énfasis a la NOS I, en la señalización que media el flujo salival (Sugiya, 2001; Mitsui, 2000).

El hecho de que las dos glándulas salivales mayores de los ratones NOD presenten alteraciones no sólo en la actividad sino también en la expresión de la NOS I y que, sin embargo, difieran en las alteraciones morfológicas y en la respuesta inmune contra ellas, aporta más evidencias a la hipótesis de la participación de la ruta L-arginina/NOS/GMPc en la disfunción secretoria que precede a la respuesta autoinmune. La reducción en la producción de NO asociada a una reducción de la secreción salival fue descrito en ratas (Lomniczi 1998). Los mismos autores, trabajando en un modelo de inflamación inducido en ratas por tratamiento agudo con LPS (Lomniczi, 2001), proponen que el aumento de prostaglandinas, principalmente de la serie E, sería la causa de una actividad reducida de la NOS pero, a diferencia del modelo autoinmune de los NOD, en las ratas tratadas con LPS la isoforma involucrada en dicha regulación es la NOS II.

En estudios en un modelo de dolor crónico en rata se pudo observar que la región N-terminal de la sustancia P es capaz de regular negativamente la expresión de NOS I y por consiguiente la disminución de su actividad (Kovacs, 2001). Paralelamente, en un modelo de fallo renal crónico también se pudo determinar que los niveles de expresión del ARN mensajero de NOS I fueron menores que en ratas normales (Roczniak, 1999). Por tal motivo las glándulas que presentaron una actividad reducida de la NOS se analizaron en paralelo por RT-PCR. Contrariamente a lo esperado no se encontró ninguna diferencia en niveles de ARNm de la enzima en las glándulas de los ratones NOD con respecto a los ratones controles, indicando que otros mecanismos de



Discusión

regulación como la disponibilidad de sustratos y cofactores o la fosforilación podrían ser responsables de la menor actividad de la NOS.

Nuestro diseño experimental para medir actividad de la NOS utiliza el órgano entero y por consiguiente el sustrato agregado, L-arginina, debe ingresar a las células. Por otro lado, en este diseño, la sintasa utiliza para la conversión de la arginina a citrulina únicamente los cofactores existentes en las células. Con el objeto de verificar si la disponibilidad de estas sustancias afectaba la actividad de NOS en los ratones NOD, modificamos el método de determinación de la actividad enzimática para medirla en homogenatos de glándulas submaxilares de ambas cepas de ratones con el agregado de todos los cofactores requeridos y de arginina.

La persistencia del efecto en estas condiciones sugiere que el mismo no es causado por un déficit en el transporte de la arginina ni por diferencias en la disponibilidad de cofactores. Si bien el efecto se mantiene, la magnitud de la disminución en la actividad de NOS en los ratones NOD versus BALB/c es menor. Esto podría deberse a que en la medición en glándulas enteras se mantiene la integridad y la localización de los distintos actores del sistema, así como también al hecho que el tejido es gaseado permanentemente con oxígeno, uno de los sustratos de la NOS. Este resultado además valida la modificación que realizamos a la técnica original de Bredt y Snyder (1992). Al respecto vale comentar que, si bien los resultados de ambas técnicas son comparables, la que utiliza el tejido entero resultó más sensible no sólo para ver diferencias entre BALB/c y NOD sino también porque en ratones BALB/c se observó una regulación por CaM quinasa que no pudo ser detectada con la otra técnica.

La medición de arginasa aportó evidencia adicional acerca del mecanismo de regulación, ya que los resultados permiten descartar que la L-arginina fuera consumida por esta enzima -con un K_M tres órdenes mayor que el de la NOS. La actividad de arginasa fue descripta en glándulas salivales de ratones (Yasuda, 2004). Por otro lado, se describió un aumento en la expresión de arginasa I inducido por la respuesta Th2 en macrófagos derivados de médula ósea (Mobdell, 1995). Más aún, Meurs y col. (2003) postulan esta vía como un mecanismo regulatorio de la producción de NO en el proceso inflamatorio característico del asma. En el marco de esta hipótesis, nuestros resultados no sólo confirman que la menor disponibilidad de sustrato no es la causa de la menor actividad de NOS sino que descartan que el mecanismo regulatorio por aumento de la actividad de arginasa se encuentre activo en las glándulas de ratones NOD lo cual, además, es coherente con el tipo de respuesta Th1 descrito en el modelo (van Blokland, 2002).



Descartadas las hipótesis anteriores estudiamos la regulación de la actividad de NOS por quinasas. Entre varios mecanismos descritos, la fosforilación por PKC y CaMKII tienen un papel preponderante especialmente para la NOS I (Hagashi, 1999; Nakane, 1995; Bredt, 1992). Se describió que inhibidores de PKC por un lado, y de CaMKII por otro, revierten la estimulación de la actividad de NOS producida por la inducción con agonistas de receptores muscarínicos de acetilcolina en glándulas salivales de rata (Pérez Leiros, 2000; Rosignoli, 2002; Ishikawa, 2002).

No pudimos observar ninguna regulación por PKC en glándulas submaxilares de los ratones NOD. En contraste, un inhibidor de la CaMKII, KN-93, fue capaz de estimular la actividad de la NOS en los ratones BALB/c, y también lo hizo en las glándulas submaxilares de los ratones NOD. No pudieron calcularse los parámetros cinéticos de la NOS en los ratones NOD mientras que, con el agregado de KN-93, los parámetros cinéticos calculados fueron semejantes a los observados en los ratones controles. Confirmando el aumento de actividad de la NOS, el agregado de KN-93 al medio de incubación de las glándulas submaxilares de NOD también restaura la acumulación de GMPc.

Estas diferencias aparentes entre la rata y el ratón en cuanto a la regulación de la NOS por PKC, en rata y por CaMK II en ratón podrían atribuirse a un tono parasimpático diferente de las glándulas, como se refleja en la menor sensibilidad al efecto estimulatorio sobre la NOS del agonista muscarínico carbacol en las glándulas submaxilares de ratones BALB/c normales frente a lo observado en ratas (Pérez Leiros, 2000). Mientras que la actividad de PKC y su señalización se estimulan a través de los receptores muscarínicos de acetilcolina en las glándulas de la rata (Pérez Leiros, 2000), es posible que el medio intracelular inducido por la respuesta mayor a la activación de receptores muscarínicos en glándulas de la rata respecto del ratón pudieran condicionar la capacidad de PKC de regular a la NOS.

Es interesante observar que la actividad de CaMKII se encuentra aumentada durante la apoptosis inducida por varios estímulos en las líneas humanas U937, HL-60 y KG1a. Esta última es una línea de leucemia donde la CaMKII media la transducción de la señal al núcleo para iniciar la fragmentación del DNA (Wright, 2003). Una asociación similar entre apoptosis y aumento de actividad de CaMKII se demostró en células cardíacas (Zhu, 2002). Si bien no hemos demostrado en esta tesis una relación causal entre actividad de CaMKII y apoptosis acinar, nuestras observaciones indican una



Discusión

asociación de los dos fenómenos: la actividad de CaMKII participa en la regulación negativa de la NOS en los ratones NOD, por un lado, y en dichas glándulas se observa un aumento del número de ductos indicativo de una pérdida de acinos con imágenes apoptóticas visibles, ambos fenómenos desde las 12 semanas.

Otros autores informaron apoptosis de células acinares en los primeros estadios de la enfermedad en glándulas submaxilares de ratones NOD aunque no lo relacionaron con cambios en las rutas de señalización (Kong, 1998). Teniendo en cuenta la asociación entre CaMKII y apoptosis comentada en otras células, la información publicada acerca el óxido nítrico y el GMPc en la secreción salival (Xu, 1997; Lominczi, 1998; Sugiyama, 2001; Looms, 2002) y la asociación de acontecimientos apoptóticos con el efecto de la CaMKII en los ratones NOD descritos en esta tesis, se puede especular acerca de la participación de esta quinasa en la patogenia de la disfunción secretoria. Será necesario realizar nuevas investigaciones para probar esta hipótesis.

Consideraciones finales y perspectivas futuras:

Las enfermedades autoinmunes sistémicas son un complejo espectro de desórdenes que incluyen desde el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoidea hasta las más específicas de órgano como la tiroiditis autoinmune. El **Síndrome de Sjögren** ocupa un lugar particular en este espectro dada la combinación de respuestas sistémicas y dirigidas contra las glándulas exocrinas.

El estudio de los mecanismos etiopatogénicos de esta enfermedad se ha encarado con diversos diseños experimentales que incluyen estudios ex vivo con tejidos exocrinos de pacientes, la acción del suero de los pacientes sobre la actividad secretoria en animales de experimentación, el desarrollo de cepas transgénicas relacionadas con las proteína SS-A/Ro y varios modelos de sialoadenitis inducida o espontánea en ratones y otras especies. La ventaja de los modelos espontáneos, y en especial del modelo NOD, reside en que permiten investigar modificaciones tempranas de la respuesta inmune y de la morfología y función glandular que podrían conducir a la sialoadenitis, así como manipular farmacológicamente distintas vías de transducción de señales. De hecho, una de las preguntas más interesantes que se plantean en los desórdenes inflamatorios es si las alteraciones funcionales dentro de los órganos afectados pueden aumentar la susceptibilidad de sus células hacia una reacción inflamatoria. Las modificaciones de la estructura de ciertas moléculas



Discusión

o de sus vías de señalización podrían ser los primeros eventos que activaran sistemas de detección que normalmente reportan daño tisular, poniendo en marcha una respuesta inflamatoria. Este punto de vista puede resultar interesante no sólo para comprender los mecanismos de enfermedad sino además podrían contribuir al desarrollo de terapéuticas más específicas.

En cuanto a las proyecciones de estos resultados, las células apoptóticas son generalmente eliminadas con gran eficiencia, y típicamente inducen tolerancia inmunitaria (Gallucci, 1999; Sauter, 2000). Es posible, sin embargo, que la inducción de tolerancia por apoptosis pueda ser afectada iniciando una respuesta autoinmune (Rosen, 2001). La muerte celular por apoptosis podría formar estructuras nuevas de autoantígenos no generadas durante los tipos de muerte celular que normalmente tolerizan el desarrollo de células T y B. Al respecto, un modelo murino que posee una mutación en un receptor tirosina kinasa Mer, al cual se le atribuye participación en la fagocitosis en macrófagos y a la limpieza de células apoptóticas (Scott, 2001), aporta nueva evidencia *in vivo* que apoya la hipótesis de un defecto en la eliminación de células apoptóticas subyacente en la autoinmunidad sistémica.

En los ratones NOD, si bien la apoptosis en las glándulas submaxilares se encuentra documentada, no hay un consenso unificado sobre si se presenta un incremento de este fenómeno en este órgano y en el momento en el cual se puede apreciar la apoptosis (Kong, 1998; van Blokland, 2003). Sin embargo hemos observado que sí se puede detectar un aumento de la cantidad de ductos por campo con respecto a los ratones controles desde antes de que se produzca la disfunción salival. Paralelamente también hemos descrito que la CaMKII regula negativamente a la óxido nítrico sintasa. En varios modelos se asocia la actividad de la CaMKII a la inducción de apoptosis (Zhu, 2003; Fladmark, 2002), con lo cual se podría especular sobre un mecanismo similar en los NOD y su estudio requerirá un análisis integrado de los diversos mecanismos propuestos.

Isencia Rosignol

Cheng



Bibliografica



Bibliografía

- Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, Gomariz RP (2003). Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology*; 124(4): 961-71.
- Ajjan RA, McIntosh RS, Waterman EA, Watson PF, Franklin CD, Yecoman CM and Weetman AP (1998) Analysis of the T-cell receptor Valpha repertoire and cytokine gene expression in Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol* 37: 179-185.
- Alderton W, Angell A, Clayton N, Craig C, Dawson J, Frend A, McGill J, Mangel A, Moncada S, Rees D (2000). GW274150 is a potent, long-acting, highly-selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase (NOS-2) with therapeutic potential in post-operative ileus. In *Biology of Nitric Oxide*, vol. 7 (Moncada, S., Gustafsson, L. E., Wiklund, N. P. and Higgs, E. A., eds.), pp. 22, Portland Press, London
- Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition *Biochem. J.* 357, 593-615
- Alleva DG, Pavlovich RP, Grant C, Kaser SB and Beller DI (2000). Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: Elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes* 49: 1106-1115.
- Alm P, Ekström J, Larsson B, Tobin G, Andersson K-E (1997). Nitric oxide synthase immunoreactive nerves in rat and ferret salivary glands, and effects of denervation. *Histochem J*; 29: 669-76.
- Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ, Murphy ED, Roths JB and Dixon FJ (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* 148: 1198-1215.
- Ånggård Eric (1994). Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *The Lancet* 343: 1199-1206.
- Babu, B. R. and Grieth, O. W. (1998) Design of isoform-selective inhibitors of nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 491-500
- Bacman S, Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Hubscher O, Arana R and Borda E (1998). Autoantibodies against lacrimal gland M₃ muscarinic acetylcholine receptors in patients with primary Sjögren's syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*; 39: 151-156.
- Bacman S, Sterin-Borda L, Camusso JJ, Arana R, Hubscher O and Borda E (1996) Circulating antibodies against rat parotid gland M₃ muscarinic receptors in primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 104: 454-459.
- Bartfai T, Iverfeldt K, Fisone G and Serfozo P (1988) Regulation of the release of coexisting neurotransmitters. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol*, 28: 285-310.
- Batzri S, Selinger Z, Schramm M, Robinovitch MR (1973). Potassium release mediated by the epinephrine -receptor in rat parotid slices. Properties and relation to enzyme secretion. *J Biol Chem*; 248(1): 361-8.
- Bell M, Askari A, Bookman A, Frydrych S, Lamont J, McComb J, Muscoplat C, Slomovic A (1999). Sjögren's syndrome: a critical review of clinical management. *J Rheumatol*; 26(9): 2051-61.
- Bernard NF, Ertug F and Margolese H (1992) High incidence of thyroiditis and anti-thyroid autoantibodies in NOD mice. *Diabetes*; 41: 40-46.



- Bernfeld, P., (1955). Amylase, alpha and beta. *Methods Enzymol.* 1, 149– 158.
- Beutner EH (1961) Serologic studies of rabbit antibodies to rabbit submaxillary glands. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107: 486-491.
- Bieganski T, Kusche J, Lorenz W, Hesterberg R, Stahlknecht CD and Feussner KD. (1983) Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, 756, 196-203.
- Bloom W and Fawcett D (1980). Tratado de Histología. Cavidad Bucal y Glándulas Anexas pp 591-601.
- Boting SL, De Pont JHM, Jansen JWCM (1980). The role of sodium ions in pancreatic fluid secretion in the rabbit. *J. Physiol*, 309: 533-546.
- Boucher JL, Moali C, Tenu JP (1999). Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci*, 55 (8-9): 1015-28.
- Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. *J. Biol. Chem*; 267, 10976– 10981.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC. and Bredt D. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, 84, 757-767.
- Brennana PA, Thomas GJ, Langdon JD (2003). The role of nitric oxide in oral diseases *Archives of Oral Biology*; 48, 93—100.
- Brinck RW, Hurlkley TW.(1989) Regulation of cytosolic Ca^{2+} in resting and stimulated rat submandibular salivary gland acini. *Arch Oral Biol* ;93: 285-319.
- Broillet MC, Randin O, Chatton JY (2001). Photoactivation and calcium sensitivity of the fluorescent NO indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2): implications for cellular NO imaging. *FEBS Lett*, 491: 227–32.
- Brookes SM, Cohen SB, Price FJ, Webb LM, Feldmann M, Maini RN and Venables PJ (1996). T cell clones from a Sjögren's syndrome salivary gland biopsy produce high levels of IL-10. *Clin Exp Immunol*;103: 268–272.
- Brune B, Lapetina EG (1991). Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A. *Biochem. Biophys. Res. Comm*; 181, 921– 926.
- Bryk R and Wolá D J (1998). Mechanism of inducible nitric oxide synthase inactivation by aminoguanidine and L-N6-(1-iminoethyl)lysine. *Biochemistry*, 37, 4844-4852.
- Bryk R and Wolff DJ (1999). Pharmacological modulation of nitric oxide synthesis by mechanism-based inactivators and related inhibitors. *Pharmacol. Ther.*; 84, 157±178.
- Buckle AD, Parker SJ, Bloom SR, Edwards AV (1995). The role of nitric oxide in the control of protein secretion in the submandibular gland of the cat. *Exp Physiol*, 80(6): 1019-30.
- Burnstock G (1986): The changing face of the autonomic neurotransmission. *Acta Physiol Scand*, 126: 67-91.
- Butcher FR, Goldman JA, Nemerovski (1975). Effect of adrenergic agents on alpha-amylase release and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat parotid tissue slices. *Biochim Biophys Acta*; 392(1):82-94.
- Carlsten H, Tarkowski A, Jonsson R and Nilsson LA (1990) Expression of heterozygous lpr gene in MRL mice. II. Acceleration of glomerulonephritis, sialadenitis, and autoantibody production. *Scand J Immunol*; 32: 21–28.
- Carrasco-Marin E, Shimizu J, Kanagawa O and Unanue ER (1996) The class II MHC I-Ag7 molecules from non-obese diabetic mice are poor peptide binders. *J Immunol*; 156: 450–458.



- Cha S, Van Blokland SCA, Versnel MA, Homo Delarche F, Nagashima H, Brayer J, Peck AB and Humphreys-Beher MG (2001). Abnormal organogenesis in salivary gland development may initiate adult onset of autoimmune exocrinopathy. *Exp Clin Immunogenet*; 18(3):143-60.
- Chan WC (1964). Experimental Sialadenitis in guinea pigs. *J. Pathol. Bacteriol.*; 88: 592-595.
- Cheng SB, Kuchiwa S, Kuchiwa T, Nonaka S, Nakagawa S (2001). Presence of neuronal nitric oxide synthase in autonomic and sensory ganglion neurons innervating the lacrimal glands of the cat: an immunofluorescent and retrograde tracer double-labeling study. *J Chem Neuroanat*; 22: 147-55.
- Cho HJ, Xie Q.W, Calaycay J, Mumford RA, Swidwerek KM Lee TD, Nathan C(1992). *J. Exp. Med* 176 599-604.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of ARN isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1): 156-9.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA and Brecht DS (1999). PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J. Biol. Chem.*; 274, 27467-27473.
- Clare-Salzler M (1998) The immunopathogenic roles of antigen presenting cells in the NOD mouse. In "NOD Mice and Related Strains: Research Applications in Diabetes, AIDS, Cancer and Other Disease" (Leiter EH and Atkinson M, Eds.) pp. 101-119, Landes, Georgetown, TX.
- Corson MA, James NL, Latta SF, Nerem RM, Berk BC and Harrison DG (1996). Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to Fluid shear stress. *Circ. Res.*; 79, 984-991.
- Dahlen E, Hedlund G and Dawe K (2000) Low CD86 expression in the nonobese diabetic mouse results in the impairment of both T cell activation and CTLA-4 up-regulation. *J Immunol.*; 164: 2444-2456.
- Dai YS, Ambudkar IS, Horn VJ, Yeh CK, Kousvelari EE, Wall SJ, Li M, Yasuda RP, Wolfe BB, Baum BJ (1991). Evidence that M₃ muscarinic receptors in rat parotid gland couple to two second messenger systems. *Am. J. Physiol.*; 261: C: 1063-1073.
- Dartt DA (1994). Regulation of tear secretion. *Adv Exp Med Biol*; 350: 1-9.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP (2001). Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med.*; 7(5): 563-8.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*; 399: 601-605.
- Edgar WM (1992). Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J.*; 172: 305-312.
- Edwards AV, Tobin G, Ekstrom J, Bloom SR (1996). Nitric oxide and release of the peptide VIP from parasympathetic terminals in the submandibular gland of the anaesthetized cat. *Exp Physiol. May*; 81(3): 349-59.
- Elkon KB (1998). Fas (APO-1/CD95)-assisted suicide in NOD exocrine glands. *Clin Exp Rheumatol*; 16(6):659-61.
- Emmelin, N (1987). Nerve interactions in salivary glands. *J. Dent. Res.*, 66: 509-517.
- Esch TR and Taubman MA (1998). Autoantibodies in salivary hypofunction in the NOD mouse. *Ann N Y Acad Sci*; 842: 221-228.
- Evans RL, Perrott MN, Lau KR, Case RM (1996). Elevation of intracellular cAMP by noradrenaline and vasoactive intestinal peptide in striated ducts isolated from the rabbit mandibular salivary gland. *Archs oral Biol*; 41: 7 689-694.



- Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R and Fleming I (2000). Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand*; 168: 81-88.
- Fladmark KE, Brustugun OT, Mellgren G, Krakstad C, Boe R, Vintermyr OK, Schulman H, Doskeland SO (2002). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is required for microcystin-induced apoptosis. *J Biol Chem*; 277(4): 2804-11.
- Förstermann U, Boissel JP and Kleinert H (1998). Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*; 12: 773-790.
- Fox RI and Michelson P (2000). Approaches to the treatment of Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol*; 27: 15-21.
- Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J and Pisa E (1994). Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjögren's syndrome. *J Immunol*; 152: 5532-5539.
- Fox RI, Kontinen Y, Fisher A (2001). Use of muscarinic agonists in the treatment of Sjögren's syndrome. *Clin Immunol*; 101 (3): 249-63.
- Fox RI, Robinson C, Curd JC, Michelson P, Kozin F, Howell FV (1986). Sjögren's syndrome: proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum*; 29: 577-585.
- Fox RI, Toshiaki M (1997). Pathogenesis and treatment of Sjögren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol*; 9: 393-399.
- Freist E, Kuckelkorn U, Dörner T (1999). Autoantibodies in primary Sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance in a series of 90 patients. *Ann Rheumatol*; 36: 969-975.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A. and Sessa WC (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*; 399: 597-601.
- Furfine ES, Harmon MF, Paith JE, Knowles RG, Salter M, Kiff RJ, Duffy C, Hazelwood R, Oplinger JA and Garvey EP (1994). Potent and selective-inhibition of human nitric-oxide synthases - selective-inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J. Biol. Chem.*; 269: 26677-26683.
- Gallacher DV (1982). Are there purinergic receptors on parotid acinar cells? *Nature*; 296: 83-86.
- Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med*; 5(11): 1249-55.
- Garret JR (1987a). Innervation of salivary glands: Neurohistological and functional aspects. In: The Salivary System. L.M. Sreebny, ed C. R.C Press, Florida, p. 69-93.
- Garret, J.R. (1987b). The proper role of nerve in salivary secretion: A review. *J. Dent. Res*, 66: 387-397.
- Garvey, EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJR. and Knowles RG (1997). 1400W is a slow, tight binding and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem*; 272: 4959-4963.
- Gath I, Godtel-Armbrust U, Förstermann U (1997). Expressional downregulation of neuronal-type NO synthase I in guinea pig skeletal muscle in response to bacterial lipopolysaccharide. *FEBS Lett*; 410 (2-3): 319-23.
- Geller DA and Billiar TR (1998). Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*; 17: 7-23.
- Gerling IC, Serreze DV, Christianson SW and Leiter EH (1992). Intrathymic islet cell transplantation reduces beta-cell autoimmunity and prevents diabetes in NOD/Lt mice. *Diabetes*; 41: 1672-1676.



- Ghosh DK and Stuehr DJ (1995). Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry*; 34: 801-807.
- Ghosh S, Gachhui R, Crooks C, Wu C, Lisanti MP and Stuehr DJ (1998). Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J. Biol. Chem*, 273: 22267-22271.
- Giardino I, Fard AK, Hatchell DL and Brownlee M (1998). Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*; 47: 1114-1120.
- Goillot E, Mutin M and Touraine JL (1991). Sialadenitis in nonobese diabetic mice: Transfer into syngeneic healthy neonates by splenic T lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol*; 59: 462-473.
- Grant SK, Green BG, Stiffey-Wilusz J, Durette PL, Shah SK and Kozarich JW (1998). Structural requirements for human inducible nitric oxide synthase substrates and substrate analogue inhibitors. *Biochemistry*; 37: 4174-4180.
- Gray PTA (1988). Oscillations of free cytosolic calcium evoked by cholinergic and catecholaminergic agonist in rat parotid acinar cells. *J. Physiol*; 406: 35-53.
- Ham A (1975). Tratado de Histología. Aparato Digestivo pp. 584-631.
- Hammermann R, Hirschmann J, Hey C, Mossner J, Folkerts G, Nijkamp FP, Wessler I, Racke K (1999). Cationic proteins inhibit L-arginine uptake in rat alveolar macrophages and tracheal epithelial cells. Implications for nitric oxide synthesis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 21(2): 155-62.
- Handy RL and Moore PK (1998). A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. *Br. J. Pharmacol*; 123: 1119-1126.
- Haneji N, Nakamura T, Takio K, Yanagi K, Higashiyama H, Saito I, Noji S, Sugino H and Hayashi Y (1997). Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjogren's syndrome. *Science*; 276: 604-607.
- Hang L, Theofilopoulos AN and Dixon FJ (1982). A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/lpr mice. *J Exp Med*; 155: 1690-1701.
- Hanna SJ, Edwards AV (1998). The role of nitric oxide in the control of protein secretion in the parotid gland of anaesthetized sheep. *Exp Physiol*; 83(4): 533-44.
- Hayashi Y, Haneji N and Hamano H (1996). Cytokine gene expression and autoantibody production in Sjogren's syndrome of MRL/lpr mice. *Autoimmunity* 23: 269-277.
- Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H, Watanabe Y (1999). Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J Biol Chem*, 274 (29): 20597-602.
- Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, Collinge M, Sessa WC, Bender JR (2003). Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem*; 278 (4): 2118-23.
- Ilecker M, Sessa WC, Harris HJ, Anggard EE, Vane JR (1990). The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci*; 87: 8612-8616.
- Heidenhain R (1872): Ueber die Wirkung einiger Gifte auf die Nerven der Glandula submaxillaris. *Pflügers Arch Ges Physiol*; 5: 309-318.



- Hemmens B, Woschitz S, Pitters E, Klosch B, Volker C, Schmidt K and Mayer B (1998). The protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN): characterization of its action on pure nitric oxide synthases. *FEBS Lett*; 430: 397-400.
- Hey C, Boucher JL, Vadon-Lé Goff S, Ketterer G, Wessler I, Racke K (1997). Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N omega-hydroxy-D,L-indospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*; 121 (3): 395-400.
- Hodges RR, Zoukhri D, Sergheraert C, Zieske J, Dartt DA. (1997). Identification of vasoactive intestinal peptide receptor subtypes in the lacrimal gland and their signal-transducing components. *Inv.Ophthalmol. Vis Sci*; 38: 610-619.
- Hoffman RW, Alspaugh MA, Waggle KS, Durham JB and Walker SE (1984). Sjogren's syndrome in MRL/lpr and MRL/n mice. *Arthritis Rheum*; 27: 157-165.
- Homma M, Tojo T, Akizuki M, Yamagata H (1986). Criteria for Sjögren's syndrome in Japan. *Scand J Rheumatol*(Suppl 61): 26-27.
- Hu Y, Nakagawa Y, Purushotham K and Humphreys-Beher MG (1992). Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am. J. Physiol*; 263: E607-E614.
- Hu Y, Purushotham KR, Wang PL, Dawson R and Humphreys-Beher MG (1994). Down-regulation of β -adrenergic receptors and signal transduction response in salivary glands of NOD mice. *Am. J. Physiol*; 266: G433-G443.
- Hughes AR, Putney JW (1989). Source of $^3\text{[H]}$ labeled inositol bis- and monophosphate in agonist-activated rat parotid acinar cells. *J. Biol. Chem*; 264: 9400-9407.
- Humphreys-Beher MG, Brinkley L, Purushotham KR, Wang PL, Nakagawa Y, Dusek D, Kerr M, Chegini N and Chan EK (1993). Characterization of antinuclear autoantibodies present in the serum from nonobese diabetic (NOD) mice. *Clin Immunol Immunopathol* 68: 350-356.
- Humphreys-Beher MG, Hu Y, Nakagawa Y, Wang PL and Purushotham KR (1994). Utilization of the non-obese diabetic (NOD) mouse as an animal model for the study of secondary Sjogren's syndrome. *Adv Exp Med Biol*; 350: 631-636.
- Hunger RE, Muller S, Laissue JA, Hess MW, Carnaud C, Garcia I and Mueller C (1996). Inhibition of submandibular and lacrimal gland infiltration in nonobese diabetic mice by transgenic expression of soluble TNF-receptor p55. *J Clin Invest* ;98: 954-961.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhari G (1987). Endothelial-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*; 84: 9265-9269.
- Inagak Y, Jinno-Yoshida Y, Hamasaki Y.(1991). A novel autoantibody reactive with carbonic anhydrase in sera from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *J Dermatol Sci* ; 2: 147-154.
- Irvine RF, Ånggård EE, Lechter AJ, Downes CP (1985). Metabolism of inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4-triphosphate in rat parotid glands. *Biochem J*; 229: 505-511.
- Ishicawa Y, Iida H, Skowronski MT and Ishida H (2002). Activation of endogenous nitric oxide synthase coupled with methacholine-induced exocytosis in rat parotid acinar cells. *J Pharmacol Exp Ther*; 301(1):355-63.
- Jabs DA, Enger C and Prendergast RA (1991). Murine models of Sjogren's syndrome. Evolution of the lacrimal gland inflammatory lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 32: 371-380.
- Jaffrey, S. R. and Snyder, S. H. (1996). PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science* ;274, 774-777.



- Jonson R, Haga HJ, Gordon T (2001). Sjögren's syndrome. In: Koopman WJ, ed. Arthritis and Allied Conditions-a Textbook of Rheumatology, 14 Th edn Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, pp 1736-1759.
- Jonsson R and Holmdahl R (1990). Infiltrating mononuclear cells in salivary glands and kidneys in autoimmune MRL/Mp MRL/lpr mice express IL-2 receptor and produce interferongamma. *J Oral Pathol Med*; 19: 330-334.
- Jonsson R, Tarkowski A, Backman K, Holmdahl R and Klareskog L (1987). Sialadenitis in the MRL-1 mouse: Morphological and immunohistochemical characterization of resident and in- filtrating cells. *Immunology*; 60: 611-616.
- Kerwin JF, Lancaster JR and Feldman PL (1995). Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J. Med. Chem*; 38, 4343-4362.
- King, SM, Barbarese E, Dillman JF, Patel-King RS, Carson JH and Pffester KK (1996). Brain cytoplasmic and Oragellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. *J. Biol. Chem*; 271, 19358-19366.
- Kino-Ohsaki J, Nishimori I, Morita M, Okazaki K, Yamamoto Y, Onishi S, Hollingsworth MA (1996). Serum antibodies to carbonic anhydrase I and II in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *Gastroenterology*; 110(5): 1579-86.
- Knowles RG and Moncada S (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*; 298, 249-258.
- Komeima K, Hayashi Y, Naito Y and Watanabe Y. (2000). Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha through Ser847 phosphorylation in NG108-NG115 neuronal cells. *J. Biol. Chem*; 275, 28139-28143.
- Kong L, Robinson CP, Peck AB, Vela-Roch N, Sakata KM, Dang H, Talal N and Humphreys-Beher MG (1998). Inappropriate apoptosis of salivary and lacrimal gland epithelium of immunodeficient NOD-scid mice. *Clin Exp Rheumatol*; 16: 675-681.
- Kontinen YT, Platts LAM, Tuominen S, Eklund KK, Santavirta N, Törmwall J, Sorsa T, Hukkanen M and Polak JM (1997). Role of nitric oxide in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*; 40: 875-883.
- Kovacs KJ, Cai Y, Larson AA (2001). Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA is down-regulated, and constitutive NOS enzymatic activity decreased, in thoracic dorsal root ganglia and spinal cord of the rat by a substance P N-terminal metabolite. *Eur J Neurosci.*; 14(4): 577-84.
- Krainock R, Murphy S (2001). Regulation of functional nitric oxide synthase-1 expression in cerebellar granule neurons by heregulin is post-transcriptional, and involves mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem*; 78(3): 552-9.
- Langley JN, Anderson HK (1895). The innervation of the pelvic and adjoining viscera. II. The bladder. *J. Physiol*; 19: 71-84.
- Laniyonu A, Sliwinski-Lis E, Fleming N (1990). Muscarinic M₃ receptors are coupled two signal transduction pathway in rat submandibular cells. *Eur. J. Pharmacol*; 176: 367-370.
- Larsson O, Fredholm BB (1989). Carbachol stimulation of inositol phosphate accumulation in rat submandibular gland fragments is not modified by VIP. *Acta Physiol Scand*; 135:263-269.
- Leijon K, Hammarstrom B and Holmberg D (1994). Non-obese diabetic (NOD) mice display enhanced immune responses and prolonged survival of lymphoid cells. *Int Immunol*; 6: 339-345.
- Leiter EH (1998). NOD mice and related strains: Orgins, husbandry and biology introduction. In "NOD Mice and Related Strains: Research Applications in Diabetes,



- AIDS, Cancer and Other Diseases" (Leiter EH and Atkinson M, Eds) pp. 1–35, Landes, Georgetown, TX.
- Liu DM, Cuevas J, Adams DJ (2000). VIP and PACAP potentiation of nicotinic ACh-evoked currents in rat parasympathetic neurons is mediated by G-protein activation. *Eur J Neurosci*; 12(7): 2243–51.
- Liu J, Garcia-Cardena G and Sessa WC (1995). Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase : mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines- 15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry*; 34, 12333–12340.
- Liu SF, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW (1996). Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. *Crit Care Med*; 24 (7): 1219–25.
- Lohinai Z, Burghardt, Zelles T, Varga G (1999). Nitric oxide modulates salivary amylase and fluid, but not epidermal growth factor secretion in conscious rats. *Life Sci*. 64, 953– 963.
- Lohinai Z, Szekely AD, Soo SL, Fehe RE (1995). Distribution of nitric oxide synthase containing elements in the feline submandibular gland. *Neurosci Lett*; 192: 9–12.
- Lomniczi A, Mohn C, Faletti A, Franchi A, McCann SM, Rettori V and Elverdin JC (2001). Inhibition of salivary secretion by lipopolysaccharide: possible role of prostaglandins. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*; 281: E405–411.
- Lomniczi A, Suburo AM, Elverdin JC, Mastronardi CA., Diaz S, Rettori V and McCann SM (1998). Role of nitric oxide in salivary secretion. *Neuroimmunomodulation*; 5: 226–233.
- Looms DK, Dissing S, Tritsarlis K, Pedersen AM, Nauntofte B (2000). Adrenoceptor-activated nitric oxide synthesis in salivary acinar cells. *Adv Dent Res*; 14: 62–8.
- Looms DK, Tritsarlis K, Dissing S (2002). Nitric oxide-induced signalling in rat lacrimal acinar cells. *Acta Physiol Scand*; 274: 109–15.
- Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW (1993). Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem*; 268 (3): 1908–13.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193; 265–275.
- Ludwig C (1861). Lehrbuch der physiologie des menschen, vol 2. Leipzig: CF Wintersche; 345–348.
- Lundberg JM, Hökfelt T, Schultzberg M, Uvnäs-Wallensten K, Köhler C, and Said SI (1979). Occurrence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: evidence from combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining. *Neuroscience*; 4: 1539–1559.
- Luo X, Zeng W, Xu X, Popov S, Davignon I, Wilkie TM, Mumby SM, Muallem S (1999). Alternate coupling of receptors to Gs and Gi in pancreatic and submandibular gland cells. *J Biol Chem*; 274 (25): 17684–90.
- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K and Tochino Y (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Exp Anim*; 29: 1–13.
- Manthorpe R, Asmussen K, Oxholm P (1997). Primary Sjögren syndrome: diagnostic criteria, clinical features, disease activity. *J. Rheumatol*; 24 Suppl 50: 8–11.
- Manthorpe R, Oxholm P, Prause JU, Schiffdt M (1986). The Copenhagen criteria for Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol*, (Suppl 61):19–21.



- Manthorpe R, Permin H, Tage-Jensen U (1979). Auto-antibodies in Sjogren's syndrome. With special reference to liver-cell membrane antibody (LMA). *Scand J Rheumatol*; 8(3):168-72.
- Marletta M. A. (1994). Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*; 78, 927-930.
- Martinez JR, Holzgreve H, Frick A (1966). Micropunte study of sodium and potassium excretion in rat submaxillary glands of adults rats. *Pflugers Arch*; 290: 124-133.
- McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ. and Sessa WC (2000). Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.*; 275, 6123-6128.
- McCall TB, Feelisch M, Palmer RM and Moncada S (1991). Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. *Br. J. Pharmacol.*; 102: 234-238.
- McMillan K and Masters BS (1995). Prokaryotic expression of the heme- and Favin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides : identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry*; 34, 3686-3693.
- Menniti FS, Bird GS, Takemura H, Thastrup O Potter BVand Putney JW (1991). Mobilization of calcium by inositol trisphosphates from permeabilized rat parotid acinar cells. Evidence for translocation of calcium from uptake to release sites within the inositol 1,4,5-triphosphate sensitive and thapsigargin sensitive calcium pool. *J. Biol. Chem*; 266: 13646-13653.
- Merritt JE., Rink TJ (1987). The effect of substance P and carbachol on inositol tris- and tetrakis-phosphate formation and cytosolic free calcium in rat parotid acinar cells. A correlation between inositol phosphate levels and calcium entry. *J. Biol. Chem*; 262: 14912-14916.
- Michikawa H, Mitsui Y, Fujita-Yoshigaki J, Hara-Yokoyama M, Furuyama S, Sugiya H (1998). cGMP production is coupled to Ca(2+)-dependent nitric oxide generation in rabbit parotid acinar cells. *Cell Calcium*; 23(6): 405-12.
- Mills CL, Dormer RL, McPherson MA (1991). Introduction of BAPTA into intact rat submandibular acini inhibits mucin secretion in response to cholinergic and β -adrenergic agonist. *FEBS Lett*; 289: 141-144.
- Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, McDaniel ML, Williamson JR and Currie MG (1993). Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur. J. Pharmacol*; 233: 119-125.
- Mitsui Y, Furuyama S (2000). Characterization of nitric oxide synthase in the rat parotid gland. *Arch Oral Biol*; 45: 531-6.
- Miyagawa J, Hanafusa T, Miyazaki A, Yamada K, Fujino-Kurihara H, Nakajima H, Kono N, Nonaka K, Tochino Y and Tarui S (1986). Ultrastructural and immunocytochemical aspects of lymphocytic submandibulitis in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*; 51: 215-225.
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol*; 25 (4): 1101-4.
- Moncada S, Martin JF (1993). Evolution of nitric oxide. *Lancet*; 341:1511.
- Moutsopoulos HM, Tzioufas AG. Sjögren's syndrome. In: Klippel JH, Dieppe PA, editors. *Rheumatology*. Part 6. Ch. 27. London: Mosby- Year Book Europe, Ltd.;1994. pp. 1-12.



- Murthy KS, Zhang KM, Jin JG, Grider JR and Makhoul GM (1993). VIP-mediated G protein-coupled Ca^{2+} influx activates a constitutive NOS in dispersed gastric muscle cells. *Am. J. Physiol*; 265: G660–G671.
- Nakane M, Mitchell J, Förstermann U and Murad F (1991). Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 180: 1396–1402.
- Narayanan K, Spack L, McMillan K, Kilbourn RG, Hayward MA, Masters BS and Grieth OW (1995). S-alkyl-L-thiocitrullines. Potent stereoselective inhibitors of nitric oxide synthase with strong pressor activity in vivo. *J. Biol. Chem*; 270: 11103–11110.
- Nathan C and Xie QW (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*; 78: 915–918.
- Nauntofte B, Dissing S (1987). Stimulation-induced changes in cytosolic calcium in rat parotid acini. *Am. J. Physiol*; 253: G290–G297.
- Nguyen KH, Brayer J, Cha S, Diggs S, Yasunari U, Hilal G, Peck AB and Humphreys-Beher MG (2000). Evidence for antimuscarinic acetylcholine receptor antibody-mediated secretory dysfunction in NOD mice. *Arthritis Rheum*; 43: 2297–2306.
- Nilsson BO, Kockum I and Rosengren E (1996). Inhibition of diamine oxidase promotes uptake of putrescine from rat small intestine. *Inflamm. Res*; 45: 513–518.
- Ogawa N, Dang H, Lazaridis K, McGuff HS, Aufdemorte TB and Talal N (1995). Analysis of transforming growth factor beta and other cytokines in autoimmune exocrinopathy (Sjögren's syndrome). *J Interferon Cytokine Res*; 15: 759–767.
- Ohlsson M, Jonsson R, Brokstad KA. (2002). Subcellular redistribution and surface exposure of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Scand J Immunol*; 56(5): 456–69.
- Ohlsson M, Skarstein K, Bolstad AI, Johannessen AC and Jonsson R (2001). Fas-induced apoptosis is a rare event in Sjögren's syndrome. *Lab Invest*; 81: 95–105.
- Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Nakazawa A, Fukunaga K, Miyamoto E, Takayasu M, Tokuda M, Yoshida J (2002). Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser⁸⁴⁷ by CaM-KII in the hippocampus of rat brain after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* ; 22(9): 1098–106.
- Ou P and Wolff SP (1993). Aminoguanidine: a drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide in vitro. *Biochem. Pharmacol*; 46: 1139–1144.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. *Nature*; 327: 524–526.
- Pedersen AM, Dissing S, Fahrenkrug J, Hannibal J, Reibel J, Nauntofte B (2000). Innervation pattern and Ca^{2+} signalling in labial salivary glands of healthy individuals and patients with primary Sjögren's syndrome (pSS). *J Oral Pathol Med*; 29: 97–109.
- Peng X, Haldar S, Deshpande S, Irani K, Kass DA (2003). Wall stiffness suppresses Akt/eNOS and cytoprotection in pulse-perfused endothelium. *Hypertension*; 41(2): 378–81.
- Perez Leiros C, Rosignoli F, Genaro AM, Sales ME, Sterin-Borda L and Borda ES (2000). Differential activation of nitric oxide synthase through muscarinic acetylcholine receptors in rat salivary glands. *J. Auton. Nerv. Syst*; 79: 99–107.
- Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Hubscher O, Arana R and Borda E (1999). Activation of nitric oxide signaling through muscarinic receptors in submandibular glands by primary Sjögren's syndrome antibodies. *Clin. Immunol*; 90: 190–195.



- Perez Leiros C, Goren N, Sterin-Borda L, Lustig L and Borda ES (1994). Alterations in cardiac muscarinic acetylcholine receptors in mice with autoimmune myocarditis and association with circulating muscarinic receptor-related autoantibodies. *Clin. Auton. Res.*; 4: 249–255.
- Perez Leiros C, Sterin-Borda L and Borda E (1989). β -adrenergic cardiac antibody in autoimmune myocarditis. *Autoimmunity*; 2: 223–234.
- Peters JH, Gieseler R, Thiele B and Steinbach F (1996). Dendritic cells: From ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today*; 17: 273–278.
- Piganelli JD, Martin T and Haskins K (1998). Splenic macrophages from the NOD mouse are defective in the ability to present antigen. *Diabetes* 47: 1212–1218.
- Poligone B, Weaver DJ, Sen P, Baldwin AS and Tisch R (2002). Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *J Immunol*; 168: 188–196.
- Pozzilli P, Signore A, Williams AJ and Beales PE (1993). NOD mouse colonies around the world-Recent facts and figures. *Immunol Today* 14: 193–196.
- Que LG, Kantrow SP, Jenkinson CP, Piantadosi CA, Huang YC (1998). Induction of arginase isoforms in the lung during hyperoxia. *Am J Physiol*; 275(1 Pt 1): 196-102.
- Quissell A, Watson E, Dowd FJ (1992). Signal Transduction mechanisms involved in salivary gland regulated exocytosis. *Crit. Rev Oral Biol Med*; 3(1/2): 83: 107
- Rettori V, Lomniczi A, Elverdin JC, Suburo A, Faletti A, Franchi A, McCann SM (2000). Control of salivary secretion by nitric oxide and its role in neuroimmunomodulation. *Ann N Y Acad Sci*; 917: 258-67
- Richards MK and Marletta MA (1994). Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. *Biochemistry*; 33, 14723-14732.
- Robinson CP, Yamachika S, Bounous DI, Brayer J, Jonsson R, Holmdahl R, Peck AB and Humphreys-Beher MG (1998a). A novel NOD-derived murine model of primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* ; 41: 150-156.
- Robinson CP, Brayer J, Yamachika S, Esch TR, Peck AB, Stewart CA, Peen E, Jonsson R and Humphreys-Beher MG (1998b). Transfer of human serum IgG to nonobese diabetic IgG^{nu/nu} mice reveals a role for autoantibodies in the loss of secretory function of exocrine tissues in Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95: 7538-7543.
- Robinson CP, Cornelius J, Bounous DE, Yamamoto H, Humphreys-Beher MG and Peck AB (1998c) Characterization of the changing lymphocyte populations and cytokine expression in the exocrine tissues of autoimmune NOD mice. *Autoimmunity* 27: 29-44.
- Robinson CP, Yamachika S, Alford CE, Cooper C, Pichardo EL, Shah N, Peck AB and Humphreys-Beher MG (1997) Elevated levels of cysteine protease activity in saliva and salivary glands of the nonobese diabetic (NOD) mouse model for Sjogren syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94: 5767–5771.
- Robinson CP, Yamamoto H, Peck A.B. and Humphreys-Beher MG (1996). Genetically programmed development of salivary gland abnormalities in the NOD-scid mouse: A potential trigger for sialoadenitis of NOD mice. *Clin. Immunol. Immunopathol*; 79: 50–59..
- Roczniak A, Fryer JN, Levine DZ, Burns KD (1999). Downregulation of neuronal nitric oxide synthase in the rat remnant kidney. *J Am Soc Nephrol*; 10(4): 704-13.
- Rodriguez-Crespo I, Straub W, Gavilanes F and Ortiz de Montellano PR (1998). Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition. *Arch. Biochem. Biophys*; 359: 297-304.



- Roitt IM, Brostoff J and Male D (1998). Autoimmunity and autoimmune disease. In "Immunology," London pp. 367–380.
- Rosen A, Casciola-Rosen L (2001). Clearing the way to mechanisms of autoimmunity. *Nat Med*; 7(6): 664-5.
- Rosignoli F, Perez Leiros C (2002). Activation of nitric oxide synthase through muscarinic receptor in rat parotid.. *Eur J Pharmacol*; 439 (1-3): 27-33
- Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med*; 191(3): 423-34.
- Schmidt HW, Lohmann SM, Walter U (1993). The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*; 1178: 153–75.
- Schramm M, Naim E (1970). Adenyl cyclase of rat parotid gland. Activation by fluoride and norepinephrine. *J Biol Chem*; 245(12): 3225-31.
- Scott J, Baum BJ (1985). Involvement of cyclic AMP and calcium in exocrine protein secretion induced by vasoactive intestinal polypeptide in rat parotid cells. *Biochim Biophys Acta*; 847: 255-262.
- Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS, Matsushima GK (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*; 411(6834): 207-11.
- Scully C (2003). Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis*; 9(4): 165-76.
- Seiler N, Bolkenius FN and Knodgen B (1985). The influence of catabolic reactions on polyamine excretion. *Biochem. J*; 225: 219-226.
- Serze DV and Leiter EH (1988). Defective activation of T suppressor cell function in nonobese diabetic mice. Potential relation to cytokine deficiencies. *J Immunol*; 140: 3801–3807.
- Shaw P, Sordat B and Schibler U (1986). Developmental coordination of amylase and PSP gene expression during mouse parotid gland differentiation is controlled posttranscriptionally. *Cell*; 47: 107–112.
- Skarstein K, Wahren M, Zaura E, Hattori M and Jonsson R (1995). Characterization of T cell receptor repertoire and anti- Ro/SSA autoantibodies in relation to sialadenitis of NOD mice. *Autoimmunity* 22: 9–16.
- Skopouli FN, Drosos AA, Papaioannou T, Moutsopoulos HM (1986). Preliminary diagnostic criteria for Sjögren's syndrome. *Scand J Rheumatol*; (Suppl 61): 22–25.
- Soinila S, Vanhatalo S, Lumme A, Bäck N, Soinila J (1996). Nitric oxide synthase in the autonomic and sensory ganglia innervating the submandibular salivary gland. *Microsc Res Techn*; 35: 32–43.
- Soltoff SP, McMillan MK, Talamo BR, Cantley LC (1993). Blockade of ATP binding site of P₂ purinoceptors in rat parotid acinar cells by isothiocyanate compounds. *Biochem Pharmacol*; 45: 1936-1940.
- Soto-Rojas EA and Kraus A (2002). The Oral Side of Sjögren Syndrome. Diagnosis and Treatment. *A Review Archives of Medical Research*; 33: 95–106.
- Stingl G and Bergstresser PR (1995). Dendritic cells: A major story unfolds. *Immunol Today*; 16: 330–333.
- Stoyanovsky D, Murphy T, Anno PR, Kim YM, Salama G (1997). Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium*; 21: 19–29.



- Strömbeck B, Ekdahl C, Manthorpe R, Wikström I, Jacobsson L (2000). Health-related quality of life in primary Sjögren's syndrome, rheumatoid arthritis and fibromyalgia compared to normal population using SF-36. *Scand J Rheumatol*; 29:20–28.
- Sugiya H, Michikawa H, Mitsui Y, Fujita-Yoshigaki J, Hara-Yokoyama M, Furuyama S (1998). Ca^{2+} -nitric oxide-cGMP signaling in rabbit parotid acinar cells. *Eur J Morphol*; 36 Suppl: 194-7.
- Sugiya H, Mitsui Y, Michikawa H (2001). Ca^{2+} -regulated nitric oxide generation in rabbit parotid acinar cells. *Cell Calcium*; 30: 107–16.
- Sun D, Emmert-Buck MR and Fox PC (1998). Differential cytokine mRNA expression in human labial minor salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Autoimmunity* 28: 125–137.
- Tabak L (1995). In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol*; 57: 547–564.
- Takahashi M, Ishimaru N, Yanagi K, Haneji N, Saito I and Hayashi Y (1997). High incidence of autoimmune dacryoadenitis in male non-obese diabetic (NOD) mice depending on sex steroid. *Clin Exp Immunol*; 109: 555–561.
- Takai N, Uchihashi K, Higuchi K, Yoshida Y, Yamaguchi M (1999). Localization of neuronal-constitutive nitric oxide synthase and secretory regulation by nitric oxide in the rat submandibular and sublingual glands. *Arch Oral Biol*; 44: 745–50.
- Takai N, Yoshida Y, Shida T, Kondo E, Ueda Y, Kiyama H, Tohyama M (1997). Expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor mRNA and secretory regulation by vasoactive intestinal polypeptide in rat submandibular and sublingual salivary glands. *Arch Oral Biol*; 42(3): 197-204.
- Takeda Y and Ishimura G (1983). Experimental autoallergic Sialadenitis in mice. Histopathological and ultrastructural studies. *Virchows Arch. (Phatol. Anat.)*; 400: 143-154.
- Talal N (1985). Sjögren's syndrome. In Wyngaarden J, Smith HL, editors. Textbook of medicine. 17 th ed. Philadelphia: WB Saunders Company;: 1936-7.
- Tandler B, Gresik EW., Nagato T, and Carleton J (2001). Secretion by Striated Ducts of Mammalian Major Salivary Glands: Review From an Ultrastructural, Functional, and Evolutionary Perspective. *The Anatomical Record*; 264: 121–145
- Taylor SE (2003). Efficacy and economic evaluation of pilocarpine in treating radiation-induced xerostomia. *Expert Opin Pharmacother*; 4(9): 1489-97.
- Thaysen JH (1960). Handling of alkali metals by exocrine gland other than the kidney. In: Ussing HH, Kruhoffer P, Thaysen JH, Thorn NA eds. The alkali metal ions in biology (Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Vol 13). Berlin: Springer.; 424-463.
- Thaysen JH, Thorn NA, Schwartz IL (1954). Excretion of sodium, potassium, chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. *Am. J. Physiol*; 178: 155-159.
- Theofilopoulos AN and Dixon FJ (1985). Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol*; 37: 269–390.
- Tobin G, Luts A, Sundler F, Ekstrom J (1990). VIP-containing nerve fibres in the submandibular gland of the dog and protein secretion in vitro in response to VIP. *Regul Pept*; 29(2-3): 173-7.
- Toda I, Sullivan BD, Rocha EM, Da Silveira LA, Wickham LA and Sullivan DA (1999). Impact of gender on exocrine gland inflammation in mouse models of Sjogren's syndrome. *Exp Eye Res*; 69: 355–366.
- Tornwall J, Lane TE, Fox RI and Fox HS (1999). T cell attractant chemokine expression initiates lacrimal gland destruction in nonobese diabetic mice. *Lab Invest*; 79: 1719-1726.



- Tritsaris K, Looms DK, Nauntofte B, Dissing S (2000). Nitric oxide synthesis causes inositol phosphate production and Ca^{2+} release in rat parotid acinar cells. *Pflügers Arch*, 440: 223–8.
- Tsumura H., Komada H., Ito Y., and Shimura K. (1989) In vitro and in vivo interferon production in NOD mice. *Lab. Animal Sci.* 39, 575-578.
- Turner, J.T., Camden JM (1990). The influence of vasoactive intestinal peptide receptors in dispersed acini from rat submandibular gland on cyclic amp production and mucin release. *Archs oral Biol*, 35: 2, 103-4108.
- Valtydóttir ST, Gudbjörnsson B, Hållgren R, Hetta J (2000). Psychological well-being in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*, 18: 597–600.
- van Blokland S and Versnel MA (2002). Pathogenesis of Sjögren's Syndrome: Characteristics of Different Mouse Models for Autoimmune Exocrinopathy. *Clin.Immunol.*; 103 (2): 111–124.
- van Blokland SC, van Helden-Meeuwsen CG, Wierenga-Wolf AF, Drexhage HA, Hooijkaas H, van de Merwe JP and Versnel MA (2000). Two different types of sialoadenitis in the NOD- and MRL/lpr mouse models for Sjögren's syndrome: A differential role for dendritic cells in the initiation of sialoadenitis? *Lab Invest*; 80: 575–585.
- van Blokland SC, Van Helden-Meeuwsen CG, Wierenga-Wolf AF, Tielemans D, Drexhage HA, Van De Merwe JP, Homo-Delarche F, Versnel MA (2003). Apoptosis and apoptosis-related molecules in the submandibular gland of the nonobese diabetic mouse model for Sjögren's syndrome: limited role for apoptosis in the development of sialoadenitis. *Lab Invest*; 83(1): 3-11.
- Venema VJ, Ju H, Zou R and Venema RC (1997). Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J. Biol. Chem.*, 272: 28187-28190.
- Vitali C, Moutsopoulos HM, Bombardieri S, and the European Community Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's Syndrome (1994). Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*, 53:637–647.
- Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C (1993). Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 178 (2): 605-13.
- Watanabe T, Tsuchida T, Kanda N, Mori K, Hayashi Y, Tamaki K (1999). Anti-alpha-fodrin antibodies in Sjögren syndrome and lupus erythematosus. *Arch Dermatol*; 135(5): 535-9.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA and Nagata S (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314–317.
- Watson EL, Singh JC, McPhee C, Beavo J, Jacobson KL (1990). Regulation of cAMP metabolism in mouse parotid gland by cGMP and calcium. *Mol Pharmacol*, 38: 547-553.
- Weaver DJ, Poligone B, Bui T, Abdel-Motal UM, Baldwin AS, and Tisch R (2001). Dendritic cells from nonobese diabetic mice exhibit a defect in NF- κ B regulation due to a hyperactive I κ b kinase. *J Immunol*; 167: 1461–1468.
- Wei LH, Jacobs AT, Morris SM Jr, Ignarro LJ (2000). IL-4 and IL-13 upregulate arginase I expression by cAMP and JAK/STAT6 pathways in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*; 279 (1): C248-56.
- Whaley K and MacSween RN (1974). Experimental induction of immune Sialadenitis in guinea pig using different adjuvants. *Clin. Exp. Immunol*, 17: 681-684.



- White SC (1976). T-cell dependence of experimental autoallergic lesions of rat submandibular glands. *J. Dent. Res*, 55: B299.
- Wolff DJ and Lubeskie A (1995). Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. *Arch. Biochem. Biophys*, 316: 290-301.
- Wolff DJ, Lubeskie A., Gauld DS and Neulander MJ (1998). Inactivation of nitric oxide synthases and cellular nitric oxide formation by N6-iminoethyl-L-lysine and N5-iminoethyl-L-ornithine. *Eur. J. Pharmacol*, 350: 325-334.
- Wu G, Morris SM Jr (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.*; 336 (Pt 1): 1-17.
- Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, 256 (5054): 225-8.
- Xie QW, Whisnant R, Nathan C (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 177 (6): 1779-84.
- Xu X, Zeng W, Diaz J (1997). nNOS and Ca^{2+} influx in rat pancreatic acinar and submandibular salivary gland cells. *Cell Calcium*, 22: 217-28.
- Yamachika S, Nanni JM, Nguyen KH, Garces L, Lowry JM, Robinson CP, Brayer J, Oxford GE, da Silveira A, Kerr M, Peck AB and Humphreys-Beher MG (1998). Excessive synthesis of matrix metalloproteinases in exocrine tissues of NOD mouse models for Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 25: 2371-2380.
- Yamamoto H, Ishibashi K, Nakagawa Y, Maeda N, Zeng T, Robinson CP, Oxford GE, Chegini N, and Humphreys-Beher MG (1997). Detection of alterations in the levels of neuropeptides and salivary gland responses in the non-obese diabetic mouse model for autoimmune sialoadenitis. *Scand. J. Immunol*, 45: 55-61.
- Yamamoto H, Sims NE, Macauley S P, Nguyen KHT, Nakagawa Y, and Humphreys-Beher MG (1996). Alterations in the secretory response of non-obese diabetic (NOD) mice to muscarinic receptor stimulation. *Clin. Immunol. Immunopathol*, 78, 245-255.
- Yamano S, Atkinson JC, Baum BJ and Fox PC (1999). Salivary gland cytokine expression in NOD and normal BALB/c mice. *Clin Immunol*, 92: 265-275.
- Yanagi K, Haneji N, Ishimaru N, Saito I and Hayashi Y (1997). Analysis of T cell receptor Vbeta usage in the autoimmune sialadenitis of non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol*, 110: 440-446.
- Yanagi K, Ishimaru N, Haneji N, Saegusa K, Saito I and Hayashi Y (1998). Anti-120-kDa alpha-fodrin immune response with Th1-cytokine profile in the NOD mouse model of Sjögren's syndrome. *Eur J Immunol*, 28: 3336-3345.
- Yasuda N, Moriwaki K, Furuyama S (2004). Distribution and properties of arginase in the salivary glands of four species of laboratory mammals. *Comp Physiol [B]*. [Epub ahead of print]
- Yildiz G, Demiryurek AT, Sahin-Erdemli I and Kanzik I (1998). Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. *Br. J. Pharmacol*, 124: 905-910.
- Young JA and Van Lennep EW (1979). Transport in salivary and sweat gland. In Giebisch G, Tosteson DC, Ussing HH. Membrane transport in biology pp. 563-674. Berlin: Springer-Verlag.
- Young RJ, Beams RM, Carter K, Clark HA., Coe DM, Chambers CL, Davies PI, Dawson J, Drysdale MJ, Franzman KW. (2000). Inhibition of inducible nitric oxide synthase by acetamidine derivatives of hetero-substituted lysine and homolysine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10: 597-600.



Bibliografia

- Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K and Eisenbarth GS (2000). Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: Evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97: 1701–1706.
- Zhang Z, Evans RL, Culp DJ (1998). In vitro studies of the regulation of mucous gland secretion. *Eur J Morphol*; 36 Suppl:219-21.
- Zhu ZW, Wang SQ, Chakir K,¹ Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka B,³ Cheng H, and Xiao RP(2003). Linkage of β 1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca^{2+} /calmodulin kinase II. *J. Clin. Invest*; 111: 617–625.

Notas

