



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EFFECTO DE INHIBIDORES DE NKCC1 Y PKA Y AGONISTAS
SOBRE LA SECRECIÓN DE FLUIDOS EN DUCTOS DE
GLÁNDULAS PARÓTIDAS**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: GUILLERMO NICHOLAS KIRBY IDROBO

TUTOR: M.G MARCO VITERI

CO-TUTOR: Dr. MARCELO A. CATALAN

Napo-Ecuador

2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Guillermo Nicholas Kirby Idrobo con documento de identidad N° 1150499596, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 23 de febrero de 2024



Guillermo Nicholas Kirby Idrobo

CI:1150499596

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Guillermo Nicholas Kirby Idrobo con documento de identidad N° 150499596 en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación. Efecto de Inhibidores de NKCC1 y PKA y agonistas sobre la secreción de fluidos en ductos de glándulas parótidas, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ÒRGANICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 23 de febrero del 2024



Guillermo Nicholas Kirby Idrobo

CI:1150499596

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “ *Efecto de Inhibidores de NKCC1 y PKA y agonistas sobre la secreción de fluidos en ductos de glándulas parótidas*”, en la modalidad de: artículo original, fue realizado por: Guillermo Nicholas Kirby Idrobo, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 23 de febrero de 2024



Marco Andres Viteri Yanez

C.I: 1718163759



Marcelo A. Catalan

RUT: 12611658-6

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a todas las personas que han estado a mi lado en este gran camino. A las personas que se tomarán el tiempo para leer esta investigación ya sea por mera curiosidad o por profundizar más en el tema. Dedico esta tesis a mi familia, a mi novia Abigail, a mis maestros, a mi tutor Marcelo y a todos aquellos que me han servido como una inspiración para convertirme en lo que soy ahora, para todos aquellos que me guiaron por el camino de la ciencia y me contagiaron del amor por ella. Esta investigación está escrita para cualquier persona que quiera aprender más, que quiera indagar más en el funcionamiento de este pequeño tejido y para aquellos que quieran conocer su funcionamiento desde otra perspectiva.

AGRADECIMIENTOS

Le quiero agradecer principalmente a mi familia que ha sido una gran inspiración para mí a mi mamá Paulina; a mis hermanos Sebastián y Delia; a mi tía Maura, Natasha, Mónica, Oswaldo y Katty; a mis dos abuelitas Betty y Argentina, a mi abuelito Guillermo. También me gustaría mencionar a mi novia, el amor de mi vida que ha sido un gran apoyo en este camino Abigail. Quisiera agradecer a todos mis maestros que han forjado mi interés en la ciencia y me han permitido observar el mundo de otra forma, a mi tutor Marcelo que me ha enseñado como desde lo más simple puede nacer algo fascinante, como en lo más pequeño se esconde un mar de posibilidades y cómo la ciencia podría ayudarnos a navegar y descubrir nuevos horizontes en él. Finalmente quisiera agradecer al proyecto Fondecyt el cual financió mi tesis y financia muchas investigaciones científicas y permite a muchos investigadores a cumplir sus sueños.

INDICE GENERAL

CARATULA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
INDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.. ..	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1 Obtención de modelo animal	5
2.1.1 Ratones ASCL3/DTA	5
2.1.2 Eutanasia de los ratones	5
2.2 Extracción de las glándulas parótidas	5
2.2.1 Preparación del tejido	6
2.2.2 Extracción de ductos	6
2.3 Soluciones	7
2.4 Visualización de los ductos con diferentes condiciones.....	7
2.4.1 Análisis microscópico.....	7
2.4.2 Agonistas muscarínico y adrenérgico.....	7
2.4.3 Inhibidor de NKCC1.....	8
2.4.4 Inhibidor de PKA.....	8

2.4.5 Tasa de secreción.....	8
2.5 Análisis estadísticos.....	8
3. RESULTADOS.....	9
3.1 Secreción de fluido dentro de los ductos dada por IPR y CCH.....	9
3.2 Respuesta a la inhibición de NKCC1.....	10
3.3 Secreción en ratones ASCI3/DTA.....	12
3.4 Inhibición por PKA.....	13
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	14
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla S1: Genotipos de ratones.....	Anexos
--	--------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Tasa de secreción de fluidos dentro de los ductos con agonistas.....	10
Figura 2:	Tasa de secreción de ductos en presencia y ausencia de bumetanida	11
Figura 3:	Generación de ratones <i>Ascl3</i> Cre/DTA	12
Figura 4:	Ductos tratados con H89	13

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Metodología Complementaria

Tabla S1: Genotipos de ratones

RESUMEN

Los receptores Muscarínicos y β -adrenérgicos son fundamentales para el funcionamiento normal de las glándulas parótidas (PG) tanto en los acinos como en los ductos, de igual forma la proteína quinasa dependiente del AMPc y el cotransportador NKCC1 cumplen un papel fundamental en la secreción de fluido en PG. Aunque se conoce que estos receptores y proteínas son importantes para la secreción de fluido en las glándulas salivales, poco se sabe acerca del papel que estas proteínas y receptores desempeñan en los ductos. Para conocer cuál es el papel que desempeñan los receptores se utilizaron agonistas muscarínicos (Carbacol, CCh) y β -adrenérgicos (isoproterenol, IPR) y se descubrió que la activación de estos dos receptores en conjunto produce un gran aumento en la secreción de fluido dentro de los ductos de PG. Además, los tratamientos con bumetanida (inhibidor selectivo de NKCC1) y H89 (inhibidor de PKA) disminuyeron la tasa de secreción en los ductos, indicando la importancia crucial de NKCC1 y PKA en este proceso. Estos hallazgos ofrecen una comprensión más profunda de los mecanismos reguladores de la secreción salival, especialmente en el contexto de los ductos glandulares.

Palabras claves: Glándulas salivales, receptor Muscarínico, receptor β -adrenérgico NKCC, PKA.

ABSTRACT

Muscarinic and β -adrenergic receptors are pivotal for the normal functioning of parotid glands (PG) in both acini and ducts. Similarly, the cAMP-dependent protein kinase (PKA) and the cotransporter NKCC1 play a fundamental role in fluid secretion in PG. While it is known that these receptors and proteins are crucial for fluid secretion in salivary glands, little is understood about their specific roles in ducts. To elucidate the roles of these receptors, muscarinic agonists (Carbachol, CCh) and β -adrenergic agonists (isoproterenol, IPR) were employed. It was discovered that the activation of these two receptors together significantly increased fluid secretion within PG ducts. Additionally, treatments with bumetanide (a selective NKCC1 inhibitor) and H89 (a PKA inhibitor) decreased the secretion rate in the ducts, indicating the crucial importance of NKCC1 and PKA in this process. These findings provide a deeper understanding of the regulatory mechanisms of salivary secretion, particularly in the context of glandular ducts.

Key words: Salivary glands, muscarinic receptor, β -adrenergic receptor NKCC, PKA.

1. INTRODUCCIÓN

La saliva es un fluido complejo compuesto principalmente por la secreción de las glándulas principales, así como por cientos de glándulas salivales menores que drenan en la cavidad oral. En este espacio, se desempeñan diversas funciones esenciales, tales como la lubricación de la superficie mucosa oral, la remineralización y desmineralización de los dientes, la digestión de alimentos, y la regulación de la microbiota oral (Proctor, 2016). A nivel fisiológico, la composición y la cantidad de la saliva en personas sanas difiere de aquellas que experimentan hipofuncionamiento de las glándulas salivales, como en el síndrome de Sjögren, el cáncer de las glándulas salivales o las secuelas de la radioterapia en pacientes con cáncer de cuello y cabeza (Beatriz & Busamia, 2010; Serrano Martinez *et al.*, 2021; Yura & Hamada, 2023). Este mal funcionamiento está relacionado con la sequedad bucal, que se asocia con una reducción en la sensación del gusto, disfagia e infecciones oportunistas; como las caries dentales, entre otras (Padmanabhan *et al.*, 2023; Paulais & Turnerg, 1992). En los seres humanos las principales glándulas salivales son las Parótidas (PG), submandibulares (SMG) y sublinguales (SLG), las cuales secretan entre 0.5 y 1 litro de saliva por día. Esto se logra debido a que células secretoras expresan proteínas transportadoras en sus dominios apicales y basolaterales las cuales permiten la secreción vectorial de solutos y fluido hacia el espacio luminal (Kondo *et al.*, 2019; Yura & Hamada, 2023).

Las funciones de estas glándulas están reguladas por ramas parasimpática y simpática del sistema nervioso autónomo. Se sabe que la estimulación adrenérgica simpática de las células PG y las SMG resulta en escasa secreción de un líquido rico en proteínas y una baja concentración de cloruro de sodio (NaCl) (Serrano Martinez *et al.*, 2021). A su vez, la estimulación colinérgica parasimpática de las glándulas PG y las SLG produce una gran cantidad de líquido pobre en proteínas y relativamente rico en NaCl (Begenisich *et al.*, 2004; Serrano Martinez *et al.*, 2021). El mecanismo latente a la regulación de las glándulas salivales por parte del sistema simpático es dependiente de la expresión de receptores β -adrenérgicos, que incrementa los niveles de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Por otra parte, la estimulación del sistema parasimpático depende de la expresión de receptores de acetilcolina de tipo Muscarínicos, que aumentan los niveles intracelulares de calcio (Begenisich *et al.*, 2004; Kondo *et al.*, 2019). Esta relación ha sido corroborada mediante la estimulación con agentes

específicos como el agonista colinérgico directo Carbacol, el cual ejerce una acción directa gracias a su contenido de éster de colina. En contraste, el agonista β -adrenérgico, como el isoproterenol, tiene su función evaluada a través del AMPc, lo que se traduce en un aumento de la liberación de proteínas específicas debido a su estimulación particular (Alterman *et al.*, 2012; Cano *et al.*, 2019; Kondo *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2001)

La secreción de las glándulas salivales es un mecanismo que se da en dos etapas. La primera etapa sucede en las células acinares que secretan un líquido isotónico muy parecido al plasma que posteriormente es modificado por las células de los ductos que absorben una gran cantidad de NaCl y secretan bicarbonato de potasio (KHCO_3) (Pena-Münzenmayer *et al.*, 2021; Porcheri & Mitsiadis, 2019). Las células acinares presentan diversos canales y transportadores tanto en su membrana apical (canales iónicos de Cl^- , canales transportadores de agua, los transportadores de iones como la bomba de sodio-potasio) como, en su membrana basolateral (canal de K^+ activados por Ca^{2+} y cotransportadores de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ [NKCC1]) (Bhattacharai *et al.*, 2018; Porcheri & Mitsiadis, 2019). Estos canales tienen un papel fundamental en la emisión y absorción de electrolitos que conforman la saliva primaria (Begenisich *et al.*, 2004; Bhattacharai *et al.*, 2018). En el caso del cotransportador NKCC1 utiliza el gradiente de Na^+ dirigido hacia adentro generado por Na^+/K^+ ATPasa para concentrar Cl^- en el medio intracelular de las células acinares, lo que resulta en una acumulación intracelular de Cl^- por encima del equilibrio electroquímico (Park *et al.*, 2001; Pena-Münzenmayer *et al.*, 2021). Se ha descubierto en estudios previos que con ratones NKCC1^{-/-} que expresan altos niveles de la proteína AE2 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ isoforma intercambiadora) para contrarrestar la pérdida de NKCC1 (Bhattacharai *et al.*, 2018; Gonzalez-Begne *et al.*, 2007). En consecuencia, los ratones knockout NKCC1^{-/-} revelaron una reducción del 60% de la secreción saliva en respuesta a la estimulación muscarínica.

En la segunda etapa, las células pertenecientes al sistema de ductos en las glándulas salivales tienen un papel fundamental para el transporte y remineralización de la saliva (Bhattacharai *et al.*, 2018; Porcheri & Mitsiadis, 2019; Yura & Hamada, 2023). El sistema de ductos de las glándulas salivales está compuesto principalmente por conductos estriados (intralobulares), intercalados (intralobulares) y excretores (extralobulares). La reabsorción de NaCl se da tanto en los ductos intralobulares como en los extralobulares (Bhattacharai *et al.*, 2018; Catalán *et al.*, 2010). El intercambiador Na^+/H^+ (NHE) en sus tres isoformas (NHE1, NHE2, NHE3) y el canal epitelial de Na^+ (ENaC) que se encuentran

en la membrana apical de los ductos tienen un papel fundamental en la reabsorción ductal de Na^+ (Catalán *et al.*, 2010). La isoforma con mayor impacto en la secreción de las glándulas es NHE1, el cual estimula la salivación regulando el flujo de iones Cl^- y HCO_3^- , mediante las células acinares manteniendo el pH intracelular tanto en estado de reposo como en estado de estimulación por agonistas muscarínicos (Bhattarai *et al.*, 2018; Ollero *et al.*, 2006). De igual forma, se ve como NKCC se expresa principalmente en células acinares, y en el epitelio del conducto intralobular de ratas (Bhattarai *et al.*, 2018; Ollero *et al.*, 2006). Estos transportadores utilizan el gradiente de Na^+ impulsado por la Na^+/K^+ ATPasa para regular al Cl^- dentro de las células, las gradientes generadas son aprovechadas por los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y Na^+/H^+ lo que termina aumentando la concentración intracelular de Cl^- . Además, el gradiente de Na^+ aumenta la concentración de HCO_3^- a través del simporte $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ altamente expresado en células de los ductos (Lee *et al.*, 2012). La activación de los receptores acoplados a proteína Gs da como resultado la elevación del AMPc intracelular y posteriormente la activación de la proteína quinasa A (PKA) esto a su vez provoca el aumento de Ca^{2+} intracelular (Nedvetsky *et al.*, 2014; Pena-Münzenmayer *et al.*, 2021).

Por otra parte, el H89 es un inhibidor selectivo de PKA que desde su descubrimiento se ha usado ampliamente para evaluar el papel de esta proteína en distintos tejidos como; hepatocitos, células de músculo liso o tejido neuronal (Lochner & Moolman, 2006; Pena-Münzenmayer *et al.*, 2021). Otro inhibidor selectivo sería la Bumetanida que inhibe el simporter NKCC1 (Pena-Münzenmayer *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2017). La bumetanida es un fármaco utilizado para el tratamiento de diversas afecciones como; insuficiencia cardiaca, enfermedades hepáticas o renales, entre otras (Jayakumar & Puschett, 1977). Los mecanismos subyacentes a las diferencias funcionales en la regulación simpática y parasimpática de las principales glándulas salivales han recibido poca atención. Las vías de secreción de saliva dependientes del AMPc influyen sobre las tasas de secreción de fluidos dentro de los ductos al igual que altos niveles de Ca^{2+} también influye dentro de la secreción de fluidos en el espacio luminal (Pena-Münzenmayer *et al.*, 2021). Sin embargo, no se conoce a profundidad el mecanismo de secreción de los ductos de PG. Por lo cual, estudiar el papel de las proteínas; como el NKCC1 y la PKA, las cuales interactúan en este proceso permitiendo la absorción y secreción de fluidos en el espacio luminal pueden arrojar luz del posible funcionamiento de éste (Catalán *et al.*, 2015; Evans *et al.*, 2000; Pena-Münzenmayer *et al.*, 2021). A pesar de que ya se ha confirmado que la expresión de NKCC1 es mayor en los acinos y su presencia es menor en los ductos, no se conoce cuál es el papel funcional que tiene este cotransportador

dentro de los ductos (Pena-Münzenmayer *et al.*, 2021). De igual manera, se ha descrito que la PKA tiene un papel fundamental en la activación del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) indispensable en la secreción de fluido y HCO_3^- (Ollero *et al.*, 2006; Pena-Münzenmayer *et al.*, 2021). También se ha observado la influencia de PKA en la función de los canales MaxiK los cuales pueden ser indicadores del aumento del líquido ductal y la secreción de HCO_3^- por los receptores movilizadores de Ca^{2+} (Mcnicholas *et al.*, 1996; Ollero *et al.*, 2006). Bajo este concepto, se investigó el papel que desempeñan estas proteínas en los ductos de las glándulas parótidas (PG), dado que aún no se ha dilucidado cuáles podrían ser los efectos resultantes de la inhibición mediante agonistas de NKCC1 y PKA. Además, se carece de información acerca de cómo la sobreexcitación de los receptores colinérgicos y adrenérgicos podría impactar y modificar la tasa de secreción en los ductos de las glándulas parótidas de ratón.

La investigación de los mecanismos vinculados a la secreción de saliva no solo puede arrojar luz sobre nuevas perspectivas terapéuticas, sino que también para comprender a fondo el funcionamiento de los ductos de las glándulas salivales. Se ha identificado que el cotransportador NKCC1 desempeña un papel en la secreción de las células acinares dentro de los ductos, aunque aún no se ha descrito completamente el mecanismo específico que cumple en la secreción y absorción de líquidos en dichas estructuras (Bhattarai *et al.*, 2018). En este estudio, se examinó la actividad de los ductos en respuesta a agonistas muscarínicos (Carbacol [CCH]) y β -adrenérgicos (Isoproterenol [IPR]) de manera conjunta. Además, se investigó el papel de NKCC1 y PKA a través de su inhibición selectiva. Los resultados obtenidos revelaron que la respuesta a los agonistas tiene el potencial de incrementar significativamente la tasa de secreción, mientras que la inhibición selectiva es capaz de disminuir dicha tasa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de modelo animal

En el estudio se emplearon ratones machos y hembras con edades comprendidas entre 8 y 12 semanas (ver anexos). Los animales fueron alojados en jaulas microaisladas con acceso *ad libitum* a alimento de laboratorio y agua. Siguiendo un ciclo de Luz/Oscuridad de 12:12 horas. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad Austral de Chile (protocolo 431/2021 UACH).

2.1.2 Ratones ASCL3/DTA

Se utilizaron 5 ratones ASCL3/DTA (+/+) que fueron inducidos por tamoxifeno a través de una sonda administrada por vía oral (0.25mg/Kg) y 5 ratones ASCL3/DTA(-/-) sin inducción por tamoxifeno. Los medios de administración fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad Austral de Chile (protocolo 431/2021 UACH). (Tang, Q., et al 2019; Arany S., et al 2011). Se utilizó una cre recombinasa inducible por tamoxifeno bajo el promotor del gen *Ascl3* ya que este factor de transcripción se expresa en una subpoblación de ductos que se encuentran dentro de las glándulas salivales que están co-localizados con NKCC1 (Arany et al., 2011).

2.1.2 Eutanasia de los ratones.

Se anestesió a los animales con Isoflurano (Baxter, f-10142) (1 mg/g) mediante administración inhalatoria. Posteriormente, se procedió a la eutanasia y enseguida una dislocación cervical siguiendo los lineamientos del comité de bioética de la Universidad Austral de Chile (protocolo 431/2021 UACH).

2.2 Extracción de las glándulas parótidas.

Una vez realizada la eutanasia, se fijó el ratón en una placa de plumavit con agujas en sus dos extremidades superiores y una a la altura de la boca. Posteriormente, se limpió el cuerpo del animal con etanol al 70%. Seguido, se efectuó una incisión primaria con tijeras Mayo de hoja recta (F.S.T) desde la boca hasta el pecho, de forma recta hasta la altura del cuello. Del mismo modo, se realizaron cortes horizontales hacia la izquierda y

hacia la derecha de manera consecutiva. Se removió la piel que cubre el cuello con dos pinzas de punta fina (3,5 mm × 1 mm F.S.T), asegurando la sujeción tanto del lado izquierdo como del lado derecho con dos agujas en cada extremo. Finalmente, la disección se llevó a cabo con la asistencia de una lupa de disección (Nikon SMZ 1500) para extraer las glándulas parótidas como fue previamente descrito por Arany (Arany S., *et al.*, 2011). Las glándulas fueron colocadas sobre 0.5 mL de medio de digestión (Dulbecco's Modified Egele's Medium- high glucose + ampicilina 100 units/ml y estreptomicina 100 µg/ml [DMEM + HG + AB] + Colagenasa tipo II 0.5 mg/ml + CaCl₂ 1 ul/ml), dispuesto sobre parafilm.

2.2.1 Preparación del tejido

La preparación del tejido se realizó mediante un protocolo aun no publicado de nuestro laboratorio. Las glándulas Parótidas fueron cortadas 250 veces con unas tijeras de mano curva (F.S.T) sobre parafilm. Seguido, se removieron las glándulas del parafilm con ayuda de una 50 µL de medio de digestión y una pipeta pasteur. En un tubo Falcon de 50 mL, se agregó 10 mL de medio de digestión y las glándulas previamente tratadas. Seguido, se realizó una primera incubación de 40 minutos a 37°C en un baño termostático con agitación constante a 120 RPM. Terminada la incubación, el tejido se centrifugó (IEC Clinical Centrifuge) a 3000 rpm por 30 segundos y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se añadió nuevamente medio de digestión y se volvió a incubar por 40 minutos en el baño termostático. Finalmente, se volvió a centrifugar a 3000 rpm por 30 segundos y se desechó el sobrenadante, se agregaron 5 mL medio alto en glucosa (DMEM + HG + AB) para resuspender el tejido.

2.2.2 Extracción de ductos

Se depositó el tejido junto al medio alto en glucosa en una placa Petri de 35x15 mm y se realizó la extracción de los ductos con un microscopio invertido modificado con dos jeringas de 1 mL con agujas 30G removiendo el tejido para identificar los ductos. Los ductos fueron extraídos y puestos en otra placa que contiene medio de cultivo suplementado (DMEM+ HG + AB + Humec 10µM + extracto de glándula pituitaria bovina 20 µM). Humec es un suplemento que ayuda a que las células epiteliales se mantengan sanas y no exista ninguna mutación. Los ductos fueron incubados a 5% CO₂, 37°C en un incubador (BJPX-c50) durante 24 horas, tiempo necesario para que ocurra el sellado

espontáneo de los ductos según los descrito por Wang, 2006 (Nakamoto *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006).

2.3 Soluciones.

Las soluciones se realizaron con un tampón que contiene 10 mM de HEPES a pH 7.4 y osmolaridad de 310 mOsm (Shcheynikov *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006).

Contiene KCl 4.3 mM, NaCl 120 mM, Na Gluconato 23mM, Glucosa 5 mM, Hepes10 mM, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM

B⁺

Contiene KCl 4.3 mM, NaCl 120 mM, NaHCO₃ 25mM, Glucosa 5 mM, Hepes 10 mM, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM

2.4 Visualización de los ductos con diferentes condiciones

2.4.1 Análisis microscópico

Los experimentos fueron realizados en un set-up que consiste en un microscopio invertido Nikon eclipse 2, acoplado a un sistema de perfusión líquida de apertura manual con un flujo de perfusión de (1.5mL/min). Y una cámara de perfusión de 1 mL donde fueron posicionados los ductos para su registro esta poseía un sistema de succión por vacío. Además, el microscopio posee una cámara digital marca Point grey donde se hizo el registro de imágenes cada 30 segundos a través del programa Micromanager 1.4.

2.4.2 Agonistas muscarínico y adrenérgico

Los ductos fueron expuestos a una perfusión de una solución B⁻ por 5 minutos y seguidamente fueron expuestos a una solución B⁺ por 10 minutos. Finalmente, se expusieron a una perfusión con una solución B⁺ + Carbacol (Sigma; 212385-M) (CCH) 0.3 µM + Isoproterenol (IPR) (Sigma; I6504) 0.1 µM por 20 minutos.

2.4.3 Inhibidor de NKCC1

Los ductos fueron expuestos a una perfusión de una solución B⁻ por 5 minutos. Y fueron expuestos a una solución B⁺ con bumetanida (Sigma, B3029) 10 µM por 10 minutos. Finalmente, se expusieron a una solución con una perfusión de solución B⁺ + CCH 0.3 µM + IPR 0.1 µM + bumetanida 10 µM por 20 minutos.

2.4.4 Inhibidor de PKA

Los ductos fueron expuestos a una perfusión de una solución B⁻ por 5 minutos, y estuvieron expuestos a una solución B⁺ y H89 (Sigma; B1436) 10µM por 10 minutos. Finalmente, se expusieron a una solución con una perfusión de solución B⁺ + CCH 0.3 µM + IPR 0.1 µM + H89 10 µM por 20 minutos.

2.4.5 Tasa de secreción.

Una vez terminados los experimentos las imágenes fueron guardadas en un archivo .ome que posteriormente fue analizado en Fiji. Se midió el área del lumen del ducto en función del tiempo con la herramienta de polígono en intervalos de 1 minuto. Una vez obtenidas las áreas, estas fueron exportadas a Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, 2016) donde se calculó el área relativa respecto al tiempo 0. Se graficó la variación del área en función del tiempo en respuesta a la aplicación de diferentes soluciones, agonistas o inhibidores ya mencionados. Para calcular la tasa de secreción, se seleccionó los puntos de cambio correspondiente a la aplicación de agonistas o inhibidores a los que se les aplicó una regresión lineal para obtener los parámetros, donde la pendiente corresponde a la tasa de secreción en mL/min.

2.5 Análisis estadísticos

Todos los experimentos y mediciones fueron realizados al menos tres veces. El análisis de datos se realizó mediante Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation), los gráficos se confeccionaron usando graphpad 5.1 y Fiji.

3. RESULTADOS

3.1 Secreción de fluido dentro de los ductos dada por IPR y CCH.

La combinación del agonista colinérgico Carbacol (CCH 0.3 μ M) y el agonista β -adrenérgico Isoproterenol (0.1 μ M) conduce a un aumento significativo en la secreción de fluido dentro de los ductos, como se ilustra en la **(Figura 1)**. La estimulación de las vías β -adrenérgica y muscarínica no solo eleva los niveles intracelulares de Ca^{2+} y AMPc (Hirano et al., 1998), sino que también desencadena una salivación sostenida a lo largo del tiempo. Este fenómeno subraya la relevancia crucial de estas vías en la secreción de fluido en las glándulas parótidas (Pena-Münzenmayer et al., 2021). Por otra parte como se puede observar cómo en los primeros 10 minutos al aplicar la solución sin bicarbonato (B-) no existe ninguna respuesta dentro del espacio luminal **(Figura 1)**, mientras que desde el minuto 10 al 20 donde se aplica una solución con bicarbonato (B+) se ve una respuesta leve dentro del espacio luminal **(Figura 1)** mientras que en desde el minuto 20 al 40 en donde se agregan los agonistas IPR y CCH en conjunto, se ve como la tasa de secreción aumenta significativamente **(Figura 1)**.

Se puede observar como la respuesta frente a estos agonistas es alta y existe un aumento significativo al tamaño del espacio luminal y como consecuencia existe un aumento significativo en la secreción de fluido. Los experimentos fueron realizados con ratones DTA (Cre +/-) .

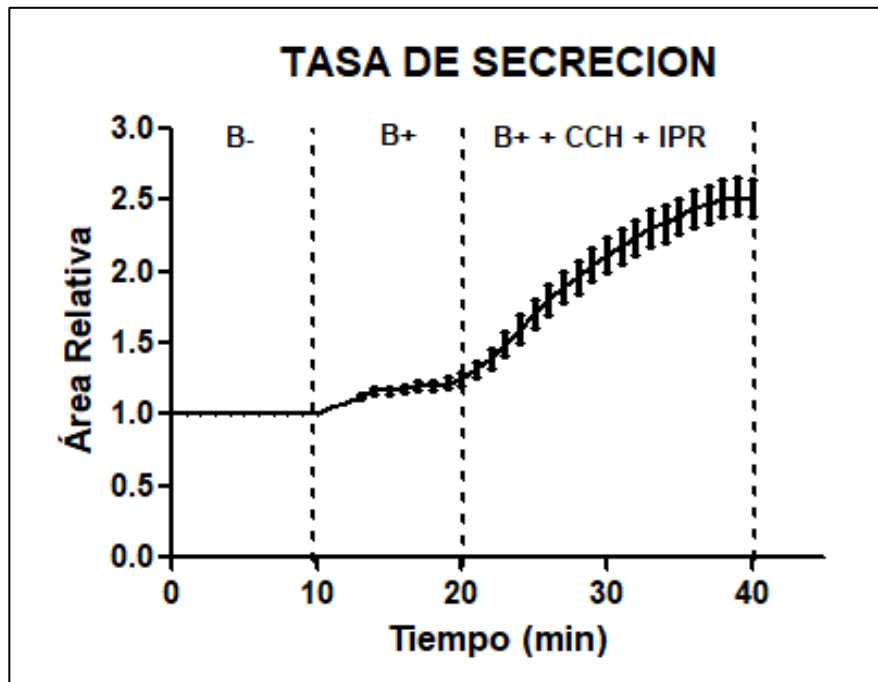


Figura 1. Tasa de secreción de fluidos dentro de los ductos con agonistas
Realizado por: Kirby, 2024

A través de estas observaciones, se descubrió que los conductos estimulados pueden incrementar significativamente el tamaño de su lumen cuando son tratados con los agonistas IPR y CCH, como se muestra en la **Figura 1**. Estos hallazgos señalan la importancia sobre el papel de estos agonistas en los procesos de secreción y absorción de fluidos.

3.2 Respuesta a la inhibición de NKCC1

NKCC es un transportador de Potasio, Sodio y Cloruro fundamental para la secreción de saliva localizado en la membrana basolateral de los acinos principalmente y en menor medida en la membrana basolateral de una subpoblación de células de ductos (Arany *et al.*, 2011). La isoforma NKCC1 es conocida como “secretora” y está involucrada en la secreción de la gran mayoría de epitelios, existe numerosa evidencia que habla de cómo este cotransportador está involucrado en la secreción de las glándulas salivales pero a su vez, se sabe poco del papel que tiene este cotransportador en los ductos de las glándulas (Evans *et al.*, 2000).

Mediante los experimentos funcionales se logró observar que la secreción de los ductos tratados con Bumetanida y agonistas IPR, CCH. Exhibieron una reducción en relación a los ductos que fueron tratados solo con agonistas (**Figura 2**). Se evidencio una diferencia significativa (T-test $p = 0,01$) entre los ductos control y los ductos tratados con bumetanida. Específicamente, se vio que los ductos tratados con bumetanida secretan 33.89% menos que los ductos control. Este resultado permite observar la influencia que tiene este cotransportador dentro de los ductos y como al inhibir NKCC1 afecta sustancialmente la secreción de fluidos.

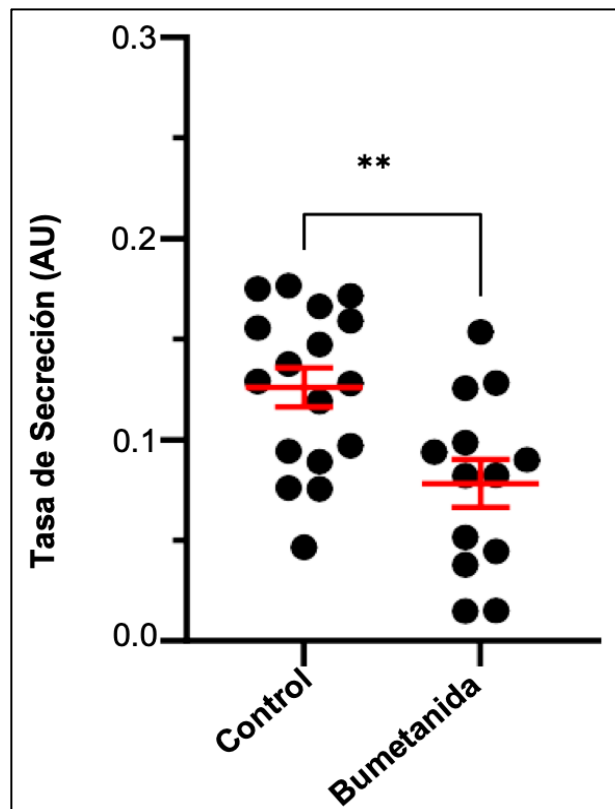


Figura 2. Tasa de secreción de ductos en presencia y ausencia de bumetanida.

Realizado por: Kirby, Catalan, 2024

3.3 Secreción en ratones ASCI3/DTA

ASCI3 (homólogo 3 similar a un escudo de achaete) es un factor de transcripción Hélice-Bucle-Hélice (NM_020051), implicado en muchas funciones del organismo entre ellas la mantener la homeostasis normal de la glándulas. Se sabe que en los ductos existe una subpoblación de células que coexpresan ASCI3 y NKCC1 (Arany *et al.*, 2011). Mediante experimentos funcionales en ratones ASCI3/DTA, se logró observar que existe una reducción de la tasa de secreción de 33.89% en comparación con los ductos control (**Figura 3A**). Sorprendentemente, el valor de la tasa de secreción con los ratones tratados con bumetanida (**Figura 2**) es igual al valor de la tasa de secreción de ratones ASCI3/DTA (**Figura 3A**). Por otro lado, se generaron ratones ASCI3/DTA mediante la fusión en marco de una secuencia codificante P2A-GFP-Cre-ERT2 con un extremo C terminal ASCI3 combinado con la subunidad A de la difteria (DTA) y Cre recombinasa (**Figura 3B**). Este genotipo fue confirmado mediante qPCR. Se evidenció que la reducción de la secreción en Ratones ASCI3/DTA es igual a la secreción en los ductos inhibidos con Bumetanida (**Figura 2**). Según estos resultados se demostró que las células que contienen ASCL3 contienen NKCC1.

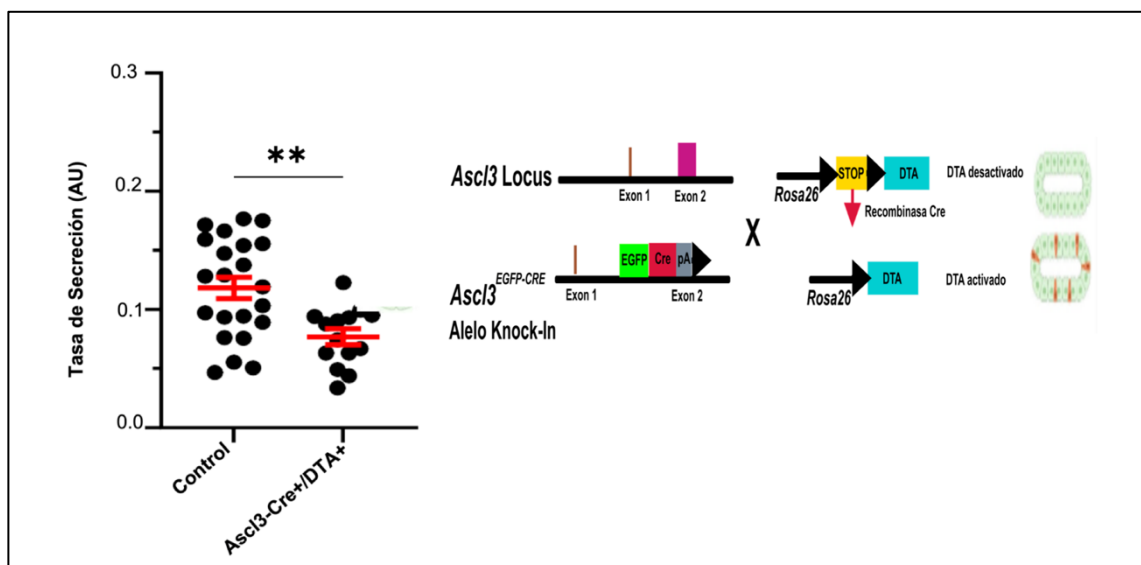


Figura 3. Generación de ratones *Ascl3* Cre/DTA.

Realizado por: Kirby, Catalan, 2024

3.4 Inhibición por PKA

La proteína quinasa dependiente de AMPc o PKA es una proteína fundamental para el funcionamiento normal de los ductos de las glándulas salivales. Ya que está estrechamente ligada a la respuesta de la célula frente a la activación de receptores β adrenérgicos acoplados a la proteína g activando la subunidad $G_{\alpha s}$ que a su vez activan la adenilato ciclasa que desfosforila el ATP formando así AMPc. La PKA está encargada de fosforilar diferentes proteínas e incluso de controlar distintos factores de transcripción necesarios para la célula. En los experimentos funcionales se mostró que al inhibir la PKA, la secreción de los ductos disminuyó en un 54.24% en relación a los ductos que solo fueron tratados con los agonistas IPR, CCH (**Figura 4B**). PKA al estar estrechamente relacionada con los receptores adrenérgicos fue posible determinar cuál es la relación que tiene esta proteína con la tasa de secreción en los ductos.

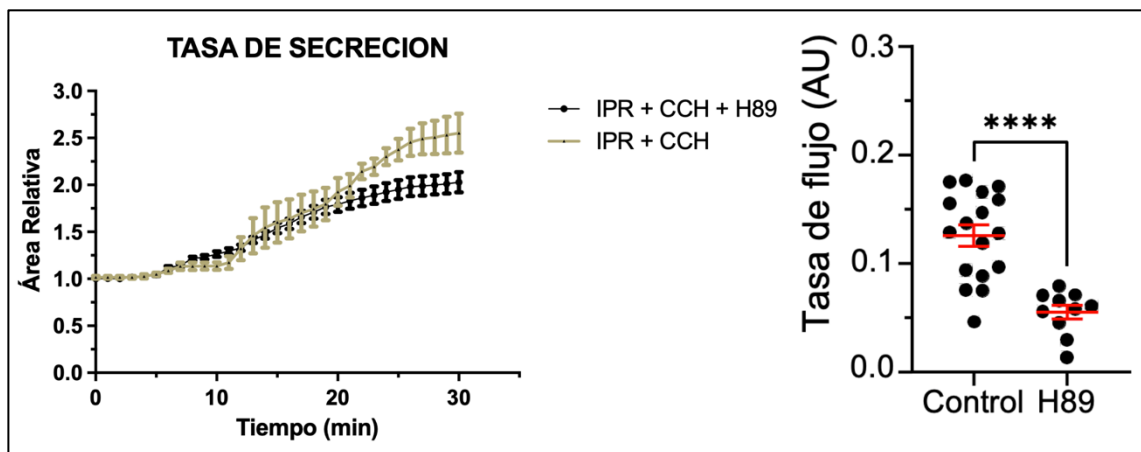


Figura 4: Ductos tratados con H89.
Realizado por: Kirby, Catalan, 2024

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La sequedad bucal puede ser causada por distintas enfermedades como el síndrome de Sjögren, factores genéticos, cáncer de las glándulas salivales o las secuelas de la radioterapia en pacientes con cáncer de cuello y cabeza (Bhattarai et al., 2018; Catalán et al., 2010; Yura & Hamada, 2023). La secreción de fluido dentro de las glándulas salivales ha sido bien descrita. Sin embargo, la mayoría de los estudios están centrados en el papel que tienen los acinos y no en cuál es el papel que tienen los ductos en la secreción de fluido. Esto, debido a que se considera a los acinos como los encargados de la secreción de fluido mientras que los ductos son los encargados de la reabsorción y remineralización de la saliva (Bhattarai et al., 2018).

En esta tesis, se logró determinar que los ductos no sólo desempeñan un papel crucial en la absorción y remineralización de la saliva, sino que también poseen la capacidad intrínseca de secretar fluido. Esta capacidad se evidenció mediante la estimulación conjunta de los receptores β -adrenérgicos (Isoproterenol) y muscarínicos (Carbacol) mediante análisis de microscopía ya que mostraron un aumento significativo en la tasa de secreción de fluido (**Figura 1**). Se conoce que los receptores muscarínicos cumplen un papel fundamental en la secreción provocando principalmente, el aumento de Ca^{2+} intracelular induciendo la salivación. Además, provocando que NKCC1 se regule positivamente estimulando los canales de K^+ activados por Ca^{2+} y los canales de Cl^- apicales como CFTR (Bhattarai et al., 2018; Pena-Münzenmayer et al., 2021). Mientras que, el receptor β -adrenérgico provoca el aumento del AMPc intracelular y este a su vez activa a PKA. La activación de estos dos receptores en conjunto provocó una respuesta sustancialmente elevada ya que la vía muscarínica que conduce a un aumento del Ca^{2+} intracelular es una rica fuente de sitios de regulación de PKA. Se ha propuesto, que PKA es capaz de fosforilar inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) lo que relaciona estas dos señales y en consecuencia PKA muestra una respuesta al aumento de Ca^{2+} intracelular (Bruce et al., 2002). Estudios previos demuestran que el AMPc elevado también puede inducir la señalización de Ca^{2+} mediada por ATP apoyando la hipótesis de la correlación que existe entre agonistas que elevan el AMPc y el Ca^{2+} , sin embargo, estos estudios han sido realizados en células acinares (Brown et al., 2004). Cuando se evaluó la tasa de secreción en los ductos se observó que tienen una respuesta similar a las células acinares. Sin embargo, la técnica empleada en este estudio no permite observar cual es la concentración de sales y proteínas en el espacio luminal, las vías involucradas

dentro de este proceso o si existe una sobreexpresión génica en específico. Por lo que, no se conoce la cascada de señalizaciones que puede desencadenar la estimulación de los receptores β -adrenérgicos y muscarínicos dentro de los ductos.

Por otra parte, al inhibir NKCC1 mediante bumetanida se observó que este cotransportador es capaz de disminuir la tasa de secreción en un 33.89% en relación a los ductos control (**Figura 2**). NKCC1 es una proteína expresada de forma ubicua sobre el epitelio de las glándulas salivales y pertenece a la familia de cotransportadores de $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / \text{Cl}^-$ (Ohana, 2015). Aunque, NKCC1 se expresa mayormente en las células acinares también existe evidencia de que se expresa en menor medida en los ductos (Arany et al., 2011; Bhattarai et al., 2018; Ohana, 2015). Se ha observado que en tejido de la tráquea de ratones mutantes homocigotos (NKCC1 $-/-$) puede disminuir en un 50% la secreción de Cl^- , en comparación con ratones tipo salvaje (NKCC1 $+/+$) (Flagella et al., 1999; Ohana, 2015). Además, en los acinos que carecen de NKCC1 existe una disminución de más del 60% en la salivación, en comparación a los acinos de animales de tipo salvaje. Se ha observado, que en acinos carentes de este cotransportador puede llegar a generar un ligero aumento en la expresión de AE2 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ isoforma intercambiadora) provocando la disminución en la absorción de Cl^- (Evans et al., 2000). De igual forma, se sabe que NKCC1 aprovecha el gradiente de Na^+ que es generado por $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPasa}$ mediando el transporte de Cl^- . De esta forma aprovecha la acumulación de HCO_3^- en la matriz citoplasmática promoviendo su flujo al espacio luminal (Bhattarai et al., 2018; Ohana, 2015).

En los ductos existen células de ductos que expresan el factor de transcripción ASCI3, estas células muestran un patrón de expresión distinto al de las células circundantes de los ductos, ya que expresa dos proteínas adicionales NKCC1 y KCa (Arany et al., 2011; Bullard et al., 2008). En un estudio previo realizado en ratones knockout ASCI3 sugiere que ASCI3, es capaz de regular NKCC1 debido a la presencia de cuatro motivos E-box altamente conservado aguas arriba (Arany et al., 2011). En esta tesis, se generaron ratones capaces de expresar la subunidad A de la toxina de la difteria en células que expresan ASCI3 mediante una inducción por tamoxifeno (ASCI3-Cre $+/DTA$ +). Donde se logró observar, que las tasas de secreción son las mismas que existen en los ratones tipo salvaje tratados con bumetanida destacando que existe una relación entre ASCI3 y NKCC1, demostrando que las células de los ductos que expresan ASCI3 tienen un rol importante en la secreción en el espacio luminal (**Figura 3**). Sin embargo, no se conoce si existe una variación en la composición del fluido luminal, por lo que es necesario

realizar estudios para conocer a profundidad como la falta de estas células afecta en la composición del fluido secretado por los ductos. Aunque NKCC1 ha sido bien descrito y estudiado ampliamente, el mecanismo que tiene este dentro de los ductos no ha sido detallado. Se sabe que este se encuentra dentro de los ductos pero no se conoce si su mecanismo de acción difiere del que existe dentro de los acinos y si existen otras vías involucradas que puedan ser desencadenadas por la inhibición de este cotransportador. Por lo que se necesitan hacer estudios acerca del papel que tiene este NKCC1 dentro de los ductos.

Otra vía de vital importancia en la secreción de fluidos dentro de los ductos es la vía acoplada al receptor β -adrenérgico. Este receptor desencadena la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc es un mensajero secundario que se libera gracias a la activación del receptor β adrenérgico de la proteína G (Lee et al., 2012). La adenilato ciclasa es una enzima unida a la membrana plasmática cuyo dominio catalítico es activado gracias a la subunidad α de una proteína G estimuladora G α s (Bhattacharai et al., 2018; Ohana, 2015). La adenilato ciclasa activada cataliza la conversión de ATP a AMPc mediante la hidrólisis del pirofosfato PPI y une el fosfato restante al azúcar y forma un anillo (Bhattacharai et al., 2018). El AMPc al ser un segundo mensajero es capaz de difundir dentro de la célula permitiendo establecer una respuesta coordinada a una escala más alta después de la estimulación con un solo ligando extracelular. Una vez formado el AMPc en el citoplasma se une con un sitio alostérico de la proteína quinasa dependiente del AMPc (PKA) activándose. La PKA fosforila diversas proteínas reguladoras e incluso puede llegar a activar factores de transcripción (Bhattacharai et al., 2018; Lee et al., 2012; Ohana, 2015). En esta tesis, se estudió el papel que establece PKA dentro de la secreción de fluidos de los ductos de glándulas parótidas y se logró observar como al inhibir esta proteína existe una disminución del 54.24% en relación a los ductos control. **(Figura 4)**. Esto corrobora la importancia que tiene esta proteína en los ductos. En un estudio realizado en acinos, se encontró que la vía del AMPc/PKA cumple un papel fundamental en la regulación de Ae4 (SIC4a9) que representa un papel fundamental en el transporte de Cl⁻, en especial en el intercambiador Cl⁻/HCO₃⁻ (Pena-Münzenmayer et al., 2021). De igual forma, múltiples canales de cloruro son fosforilados por PKA, uno de ellos es CFTR que aumenta más de 100 veces su actividad (Bhattacharai et al., 2018). De esta forma, si se inhibe PKA no es posible que CFTR sea fosforilado, por lo que es probable que la absorción de Cl⁻ se vea drásticamente disminuido dentro de los ductos. Sin embargo, se requiere una mayor investigación para conocer el flujo de Cl⁻ en las células de los ductos. Por otra parte, un

análisis realizado en acinos menciona que PKA fosforila InsP3, en consecuencia provoca un aumento de Ca^{2+} (Bruce et al., 2002). De igual manera, es probable que al estar inactiva PKA afecta a los niveles de Ca^{2+} dentro de los ductos, afectando el transporte de fluidos unilateral provocando el aumento de Ca^{2+} dentro de las células. En los ductos, no se conoce si estos efectos difieren de los acinos, ya que no se han realizado estudios para poder conocer todos los transportadores dependientes de Ca^{2+} que existen dentro de las células circundantes al espacio luminal. No obstante en el presente trabajo, se logró observar que existe una disminución drástica en la tasa de secreción de acuerdo a lo cual se plantea la hipótesis de que las funciones de PKA no se diferencian a la que tienen los acinos en las glándulas salivales.

En la actualidad, hay un conocimiento limitado sobre el papel de los ductos en la secreción de fluido de las glándulas salivales, su funcionamiento y si difieren de los acinos. Los análisis realizados en los ductos mediante microscopía, junto con el uso de agonistas específicos en los receptores Muscarínico y β -adrenérgico, así como la inhibición de NKCC1 y PKA, han contribuido a evidenciar el rol de estos receptores y proteínas en la secreción de fluido. Esto subraya la necesidad de realizar nuevos estudios para comprender los mecanismos subyacentes a estas vías. Además, se identificó una fuerte correlación entre ASCI3 y NKCC1, lo que demuestra la presencia de este cotransportador en un subgrupo de células responsables de la secreción de fluido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alterman, A., Mathison, R., Coronel, C. E., Stroppa, M. M., Finkelberg, A. B., & Gallará, R. V. (2012). Functional and proteomic analysis of submandibular saliva in rats exposed to chronic stress by immobilization or constant light. *Archives of Oral Biology*, 57(6). <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.12.008>
- Arany, S., Catalán, M. A., Roztocil, E., & Ovitt, C. E. (2011). Ascl3 knockout and cell ablation models reveal complexity of salivary gland maintenance and regeneration. *Developmental Biology*, 353(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.02.025>
- Beatriz, O. D., & Busamia, E. (2010). Cambios salivales y bucales como posibles marcadores de diagnóstico del síndrome de sjögren. *Universidad Nacional de Cordoba. Repositorio Digital*. <http://hdl.handle.net/11086/1125>
- Begenisich, T., Nakamoto, T., Ovitt, C. E., Nehrke, K., Brugnara, C., Alper, S. L., & Melvin, J. E. (2004). Physiological roles of the intermediate conductance, Ca²⁺-activated potassium channel Kcnn4. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47681–47687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409627200>
- Bhattarai, K. R., Junjappa, R., Handigund, M., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2018). The imprint of salivary secretion in autoimmune disorders and related pathological conditions. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 17, Issue 4, pp. 376–390). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.11.031>
- Brown, D. A., Bruce, J. I. E., Straub, S. V., & Yule, D. I. (2004). cAMP potentiates ATP-evoked calcium signaling in human parotid acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38). <https://doi.org/10.1074/jbc.M406201200>
- Bruce, J. I. E., Shuttleworth, T. J., Giovannucci, D. R., & Yule, D. I. (2002). Phosphorylation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in Parotid Acinar Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2). <https://doi.org/10.1074/jbc.M106609200>
- Bullard, T., Koek, L., Roztocil, E., Kingsley, P. D., Mirels, L., & Ovitt, C. E. (2008). Ascl3 expression marks a progenitor population of both acinar and ductal cells in mouse salivary glands. *Developmental Biology*, 320(1). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.018>
- Cano, I. P., Dionisio, T. J., Cestari, T. M., Calvo, A. M., Colombini-Ishikiriama, B. L., Faria, F. A. C., Siqueira, W. L., & Santos, C. F. (2019). Losartan and isoproterenol promote alterations in the local renin-angiotensin system of rat salivary glands. *PLoS ONE*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217030>
- Catalán, M. A., Kondo, Y., Peñ A-Munzenmayer, G., Jaramillo, Y., Liu, F., Choi, S., Crandall, E., Borok, Z., Flodby, P., Shull, G. E., & Melvin, J. E. (2015). A fluid secretion pathway unmasked by acinar-specific tmem16a gene ablation in the adult mouse salivary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(7), 2263–2268. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415739112>
- Catalán, M. A., Nakamoto, T., Gonzalez-Begne, M., Camden, J. M., Wall, S. M., Clarke, L. L., & Melvin, J. E. (2010). Cftr and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland. *Journal of Physiology*, 588(4), 713–724. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.183541>
- Evans, R. L., Park, K., James Turner, R., Watson, G. E., Nguyen, H. Van, Dennett, M. R., Hand, A. R., Flagella, M., Shull, G. E., & Melvin, J. E. (2000). Severe impairment of salivation in Na⁺/K⁺/2Cl⁻

- cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), 26720–26726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003753200>
- Flagella, M., Clarke, L. L., Miller, M. L., Erway, L. C., Giannella, R. A., Andringa, A., Gawenis, L. R., Kramer, J., Duffy, J. J., Doetschman, T., Lorenz, J. N., Yamoah, E. N., Cardell, E. Lou, & Shull, G. E. (1999). Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38). <https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.26946>
- Gonzalez-Begne, M., Nakamoto, T., Nguyen, H. Van, Stewart, A. K., Alper, S. L., & Melvin, J. E. (2007). Enhanced formation of a HCO₃⁻ transport metabolon in exocrine cells of Nhe1^{-/-} mice. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 35125–35132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707266200>
- Hirono, C., Sugita, M., Furuya, K., Yamagishi, S., & Shiba, Y. (1998). Potentiation by isoproterenol on carbachol-induced K⁺ and Cl⁻ currents and fluid secretion in rat parotid. *Journal of Membrane Biology*, 164(2). <https://doi.org/10.1007/s002329900405>
- Jayakumar, S., & Puschett, J. B. (1977). Study of the sites and mechanisms of action of bumetanide in man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 201(1).
- Kondo, Y., Melvin, J. E., & Catalan, M. A. (2019). Physiological cAMP-raising secretagogues differentially regulate fluid and protein secretions in 1 mouse submandibular and sublingual glands. *Am J Physiol Cell Physiol* 316: C690–C697. doi:10.1152/ajpcell.00421.2018.
- Lee, M. G., Ohana, E., Park, H. W., Yang, D., & Muallem, S. (2012). Molecular Mechanism of Pancreatic and Salivary Gland Fluid and HCO₃⁻ Secretion. *Physiol Rev*, 92, 39–74. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2011.-Fluid>
- Lochner, A., & Moolman, J. A. (2006). The many faces of H89: A review. In *Cardiovascular Drug Reviews* (Vol. 24, Issues 3–4). <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2006.00261.x>
- McNicholas, C. M., Guggino, W. B., Schwiebert, E. M., Hebert, S. C., Giebisch, G., & Egan, M. E. (1996). Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(15), 8083–8088.
- Nakamoto, T., Romanenko, V. G., Takahashi, A., Begenisich, T., & Melvin, J. E. (2008). Apical maxi-K (KCa1.1) channels mediate K⁺ secretion by the mouse submandibular exocrine gland. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 294(3). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00511.2007>
- Nedvetsky, P. I., Emmerson, E., Finley, J. K., Ettinger, A., Cruz-Pacheco, N., Prochazka, J., Haddox, C. L., Northrup, E., Hodges, C., Mostov, K. E., Hoffman, M. P., & Knox, S. M. (2014). Parasympathetic Innervation Regulates Tubulogenesis in the Developing Salivary Gland. *Developmental Cell*, 30(4). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.012>
- Ohana, E. (2015). Transepithelial ion transport across duct cells of the salivary gland. In *Oral Diseases* (Vol. 21, Issue 7). <https://doi.org/10.1111/odi.12201>
- Ollero, M., Brouillard, F., & Edelman, A. (2006). Cystic fibrosis enters the proteomics scene: new answers to old questions. In *Proteomics* (Vol. 6, Issue 14, pp. 4084–4099). <https://doi.org/10.1002/pmic.200600028>
- Padmanabhan, V., Islam, M. S., Habib, M., Abdulaziz, Z., Goud, M., Chaitanya, N. C., Haridas, S., & Rahman, M. M. (2023). Association between Salivary Cortisol Levels, Dental Anxiety, and Dental Caries in Children: A Cross-Sectional Study. *Dentistry Journal*, 11(9), 205. <https://doi.org/10.3390/dj11090205>

- Park, K., Evans, R. L., Watson, G. E., Nehrke, K., Richardson, L., Bell, S. M., Schultheis, P. J., Hand, A. R., Shull, G. E., & Melvin, J. E. (2001). Defective Fluid Secretion and NaCl Absorption in the Parotid Glands of Na⁺/H⁺ Exchanger-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 27042–27050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102901200>
- Paulais, M., & Turnerg, R. J. (1992). Activation of the Na⁺-K⁺-2Cl-Cotransporter in Rat Parotid Acinar Cells by Aluminum Fluoride and Phosphatase Inhibitors*. In *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (Vol. 267, Issue 30).
- Pena-Münzenmayer, G., Kondo, Y., Salinas, C., Sarmiento, J., Brauchi, S., & Catalán, M. A. (2021). Activation of the Ae4 (Slc4a9) cation-driven Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger by the cAMP-dependent protein kinase in salivary gland acinar cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 321(6). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00145.2021>
- Porcheri, C., & Mitsiadis, T. A. (2019). Physiology, pathology and regeneration of salivary glands. *Cells*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/cells8090976>
- Proctor, G. B. (2016). The physiology of salivary secretion. In *Periodontology 2000* (Vol. 70, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/prd.12116>
- Serrano Martinez, P., Cinat, D., van Luijk, P., Baanstra, M., de Haan, G., Pringle, S., & Coppes, R. P. (2021). Mouse parotid salivary gland organoids for the in vitro study of stem cell radiation response. *Oral Diseases*, 27(1), 52–63. <https://doi.org/10.1111/odi.13475>
- Shcheynikov, N., Yang, D., Wang, Y., Zeng, W., Karniski, L. P., So, I., Wall, S. M., & Muallem, S. (2008). The Slc26a4 transporter functions as an electroneutral Cl⁻/I⁻/HCO₃⁻ exchanger: Role of Slc26a4 and Slc26a6 in I⁻ and HCO₃⁻ secretion and in regulation of CFTR in the parotid duct. *Journal of Physiology*, 586(16). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154468>
- Wang, Y., Soyombo, A. A., Shcheynikov, N., Zeng, W., Dorwart, M., Marino, C. R., Thomas, P. J., & Muallem, S. (2006). Slc26a6 regulates CFTR activity in vivo to determine pancreatic duct HCO₃⁻ secretion: Relevance to cystic fibrosis. *EMBO Journal*, 25(21). <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601387>
- Xu, W., Mu, X., Wang, H., Song, C., Ma, W., Jolkkonen, J., & Zhao, C. (2017). Chloride Co-transporter NKCC1 Inhibitor Bumetanide Enhances Neurogenesis and Behavioral Recovery in Rats After Experimental Stroke. *Molecular Neurobiology*, 54(4). <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9819-0>
- Yura, Y., & Hamada, M. (2023). Outline of Salivary Gland Pathogenesis of Sjögren's Syndrome and Current Therapeutic Approaches. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 13). <https://doi.org/10.3390/ijms241311179>

ANEXOS

Anexo A: Metodología complementaria

5.1 Visualización de la respuesta en ductos al medio sin bicarbonato

Para esta visualización se siguió los lineamientos detallados en la metodología (2.4.1 **Análisis microscópico**). Los ductos fueron expuestos a la solución B⁻ anteriormente descrita durante 5 minutos. Finalmente, se expondrán a una perfusión con la solución B⁻ + CCH 0.3 μM + IPR 0.1 μM durante 20 minutos.

Tabla 1. Genotipos de ratones

Ratón	Cre
CFTR/acid	+/-
DTA	-/-
C57	No tiene
ASCI3/DTA	[+/-], [-/-]
Aqp3H	+/-
Nkcc1	+/-

Realizado por: Kirby, 2024