



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MIOEPITELIALES EN LAS GLÁNDULAS
SALIVALES DEL MURCIÉLAGO FRUGÍVORO *Artibeus jamaicensis*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JULIO ISRAEL GUERRERO HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO
MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MIOEPITELIALES EN LAS GLÁNDULAS
SALIVALES DEL MURCIÉLAGO FRUGÍVORO *Artibeus jamaicensis*.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JULIO ISRAEL GUERRERO HERNÁNDEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO
MENDOZA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ
FACULTAD DE CIENCIAS**

MÉXICO, D.F. AGOSTO DE 2014



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de junio de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **GUERRERO HERNÁNDEZ JULIO ISRAEL** con número de cuenta **512026910** con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MIOEPITELIALES EN LAS GLÁNDULAS SALIVALES DEL MURCIÉLAGO FRUGÍVORO *Artibeus jamaicensis*"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA**.

Presidente: DR. JUAN CARLOS CUAUHTÉMOC HERNÁNDEZ GUERRERO
Vocal: DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO
Secretario: DRA. MARICELA VILLAGRÁN SANTA CRUZ
Suplente: DRA. NIVIA ROCÍO ANTONIO RUBIO
Suplente: DR. HÉCTOR MAXIMINO RODRÍGUEZ MAGADÁN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de julio de 2014.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACyT por la beca otorgada durante el periodo 2012-2 a 2014-1.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM no IN205011).

A los miembros del Comité Tutor:

Dr. Horacio Merchant Larios

Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz

AGRADECIMIENTOS

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza por su confianza en mi persona, por la dirección, asesoría y apoyo en la realización de este proyecto.

Dr. Héctor Magadán por su enseñanza, apoyo y sugerencias en las técnicas utilizadas para llevar a cabo este proyecto.

Dra. Nivia Rocío Antonio Rubio por su ayuda y apoyo en las técnicas de biología molecular aplicadas en este proyecto.

M. en C. Esmeralda Lira Romero por su ayuda al inicio de este proyecto.

M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia por apoyo técnico en la realización de cortes semifinos y microscopía electrónica.

Srta. Bárbara Beatriz Moguel Rodríguez por su apoyo e impulso para salir adelante con este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio Alma, Alberto, Adriana, Crycel, Héctor, Rocío y Tanya por su amistad y apoyo durante mis estudios de maestría.

A Margarita Hernández
Por creer en mí incondicionalmente y brindarme su fuerza y
apoyo

A Aquilino, Conso y Tony
Por estar siempre conmigo

A Oscar Guerrero
Por su apoyo en momentos de dificultad

ÍNDICE

Lista de figuras y cuadros	i
Resumen	iii
Abstract	v
1. Introducción	1
1.1. <i>Artibeus jamaicensis</i>	1
1.2. Glándulas salivales	3
1.3. Morfología de células secretoras	7
1.4. Células mioepiteliales	10
1.5. Glándulas salivales y murciélagos	13
2. Antecedentes	15
3. Justificación	17
4. Hipótesis	17
5. Objetivo general	18
6. Objetivos particulares	18
7. Material y métodos	19
8. Resultados	28
8.1. Localización anatómica de las glándulas salivales mayores del <i>A. jamaicensis</i>	28
8.1.1. Parótida	28
8.1.2. Submandibular	28
8.1.3. Sublingual	28
8.2. Identificación histológica de las glándulas salivales mayores del <i>A. jamaicensis</i>	29
8.2.1. Parótida	29
8.2.2. Submandibular	30
8.2.3. Sublingual	32
8.3. Ultraestructura de las células mioepiteliales de las glándulas Salivales mayores del <i>A. jamaicensis</i>	33
8.3.1. Parótida	33
8.3.2. Submandibular	35
8.3.3. Sublingual	36
8.4. Patrón de expresión de los marcadores de células	37

mioepiteliales	
8.4.1. Glándula parótida	37
8.4.2. Glándula submandibular	38
8.4.3. Glándula sublingual	38
8.5. Amplificación de los fragmentos de ARNm de SMA α , K14 y Des	46
8.6. Semicuantificación de los niveles de proteínas por Western blot	47
9. Discusión	50
10. Conclusión	55
11. Perspectivas	56
12. Referencias	57
Anexos	60

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	Árbol evolutivo de los quirópteros	2
Figura 2.	Principales funciones de la saliva	4
Figura 3.	Diagrama de las vías de transducción de señales y factores de crecimiento en el proceso de morfogénesis glandular	6
Figura 4.	Orden de las muestras montadas en las laminillas	21
Figura 5.	Localización anatómica de las glándulas salivales Mayores de <i>A. jamaicensis</i>	29
Figura 6.	Identificación histológica de la glándula parótida de <i>A. jamaicensis</i>	31
Figura 7.	Identificación histológica de la glándula submandibular de <i>A. jamaicensis</i>	32
Figura 8.	Identificación histológica de la glándula sublingual de <i>A. jamaicensis</i>	34
Figura 9.	Ultraestructura de las porciones secretoras de la glándula parótida de <i>A. jamaicensis</i>	35
Figura 10.	Ultraestructura de las porciones secretoras de la glándula submandibular de <i>A. jamaicensis</i>	36
Figura 11.	Ultraestructura de las porciones secretoras de la glándula sublingual de <i>A. jamaicensis</i>	37
Figura 12.	Localización células mioepiteliales en la glándula parótida de <i>A. jamaicensis</i>	39
Figura 13.	Localización células mioepiteliales en la glándula submandibular de <i>A. jamaicensis</i>	40
Figura 14.	Localización células mioepiteliales en la glándula sublingual de <i>A. jamaicensis</i>	41
Figura 15.	Inmunofluorescencia de glándula parótida de <i>A. jamaicensis</i>	43
Figura 16.	Inmunofluorescencia de glándula submandibular de <i>A. jamaicensis</i>	44
Figura 17.	Inmunofluorescencia de glándula sublingual de <i>A. jamaicensis</i>	45
Figura 18.	Gel de agarosa que muestra la presencia de ARNm	46

Figura 19.	RT-PCR de muestras de glándula parótida (Par), submandibular (SM) y sublingual (SL)	47
Figura 20.	Proteínas totales de las tres glándulas salivales	48
Figura 21.	Western blot de las proteínas SMA α , K14 y desmina	48
Figura 22.	Semicuantificación de las proteínas SMA α , K14 y desmina	49
Tabla 1.	Distribución de células mioepiteliales en tres especies de mamíferos: humano, rata, ratón	12
Tabla 2.	Anticuerpos primarios para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	23
Tabla 3.	Anticuerpos secundarios para inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia	23
Tabla 4.	Oligonucleótidos utilizados para la técnica de RT-PCR	25
Tabla 5.	Anticuerpos utilizados para realizar el Western blot	27
Tabla 6.	Semicuantificación de proteínas	49
Tabla 7.	Reactivos para preparar gel inferior al 10%	62
Tabla 8.	Reactivos para preparar gel superior	63

RESUMEN

Los murciélagos son una de las especies de mamíferos más numerosas ocupando el 20% de todas las especies de mamíferos. Tienen un gran abanico de hábitos alimenticios, encontrándose carnívoros, hematófagos, insectívoros, frugívoros y nectarívoros. El estudio de las glándulas salivales en estas especies ha sido de especial interés debido a la variabilidad estructural que se ha encontrado entre murciélagos con diferentes formas de alimentación. Las características más estudiadas han sido las porciones secretoras y ductales. Un componente muy importante para la función salival son las células mioepiteliales (CME), que dan soporte y facilitan la expulsión de la saliva de las porciones secretoras; sin embargo este tipo celular no ha sido estudiado a detalle en las glándulas salivales de los murciélagos. Este es un estudio exhaustivo de las características de las células mioepiteliales de las glándulas salivales mayores del murciélago *Artibeus jamaicensis*. Se identificaron en primera instancia cada glándula anatómicamente e histológicamente y posteriormente el tipo secretor de cada una. Las CME fueron descritas ultraestructuralmente utilizando microscopía electrónica de transmisión y localizadas utilizando los marcadores inmunohistoquímicos SMA α , K14 y Desmina. La expresión de los mensajeros de los genes que los codifican fue identificada por RT-PCR y se evaluó la expresión de las proteínas por Western blot. Encontramos que las glándulas salivales mayores (parótida, sublingual y submandibular) del murciélago frugívoro *A. jamaicensis* se localizan anatómicamente de manera similar a como se ubican en el humano, con algunas diferencias en sus relaciones anatómicas y morfología macroscópica. La glándula parótida presenta características morfológicas de una glándula de secreción mixta, mientras que las glándulas submandibular y sublingual se identificaron como de tipo mucoso y seromucoso respectivamente. Las CME están presentes en todos los componentes estructurales de las tres glándulas salivales mayores del murciélago *A. jamaicensis*, excepto en los conductos excretores. Nuestras observaciones empleando los marcadores SMA α , K14 y Desmina mostraron que SMA α se encuentra en mayor cantidad y especificidad. Nuestros hallazgos sugieren que las CME son necesarias para la correcta función de las glándulas salivales. Sin embargo, la mayor cantidad de prolongaciones celulares encontradas en las glándulas sublinguales y

submandibular apoya el hecho de que el tipo de secreción puede influir en la morfología de las CME.

ABSTRACT

Bats are one of the largest groups of mammals, being 20% of all species of mammal. They have a big spectrum of alimentary habits, finding meat-eating, blood-eating, insectivorous, fruit eating and nectar-eating. Salivary gland study in this species has been of special interest because of the structural variability that has been found between bats with different food habits. The most studied features have been the secretory end pieces and ducts. A very important part for salivary gland function are the myoepithelial cells (MEC), which provides support and helps the expulsion of saliva from the secretory end pieces; however this cells has not been studied in detail in bat's salivary glands. This is a comprehensive study of the myoepithelial cells characteristics in mayor salivary glands of the bat *A. jamaicensis*. In first place we anatomically and histologically identified every gland, and later the secretory type of each one. The MEC where described ultrastructurally using transmission electron microscopy and were localized using the immunohistochemical markers SMA α , K14 and Desmin. The expression of genes that codes for these proteins was identified by RT-PCR and the proteins expression was quantified using Western blot. We found that mayor salivary glands of the fruit bat *A. jamaicensis* are anatomically localized on a similar fashion as the mayor salivary glands in humans, with some differences in their anatomical relations and macroscopic morphology. The parotid gland has morphological characteristics of a mixed secretion gland, while submandibular and sublingual glands are mucous and seromucous glands respectively. Our observations using the SMA α , K14 and Desmin markers showed that SMA α is found in larger amount and is more specific. Our findings suggest that MEC are necessary for the maintenance of the salivary gland function. However, the larger amount of cytoplasmic processes found in submandibular and sublingual glands support the fact that the type of secretion influences the MEC morphology.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Artibeus jamaicensis*

Los murciélagos son mamíferos incluidos en el orden Chiroptera y conforman una de las especies más exitosas y probablemente la más diversa, constando de aproximadamente 1116 especies que ocupan el 20% de todas las especies de mamíferos, siendo superados únicamente por los roedores. En América Central, Sudamérica y el Caribe existen más de 300 especies (Altigram, 2011). Por mucho tiempo, los quirópteros habían sido clasificados en dos subórdenes: *Megachiroptera* y *Microchiroptera*. Los megaquirópteros comprendían murciélagos herbívoros grandes (20 a 1500g), todos pertenecientes a la familia *Pteropodidae* y se encuentran confinados en África, Asia tropical e Indo-Australasia. Por otro lado, los microquirópteros, los cuales se distribuyen en todo el mundo excepto en la Antártida, son más pequeños (1.5 a 150g) y tienen una gran variedad de hábitos alimenticios (Zubaid, 2006). Actualmente, la nueva filogenia molecular clasifica a los megaquirópteros, todos de la familia *Pteropodidae*, junto con cuatro familias de microquirópteros. Los microquirópteros están distribuidos en 17 o 18 familias dependiendo si se acepta la familia *Miniopteridae*. Los quirópteros, por tanto, se han clasificado en dos nuevos subórdenes: *Yinpterochiroptera* y *Yangochiroptera*. En la figura 1 se muestra el árbol evolutivo de los quirópteros hasta las subfamilias.

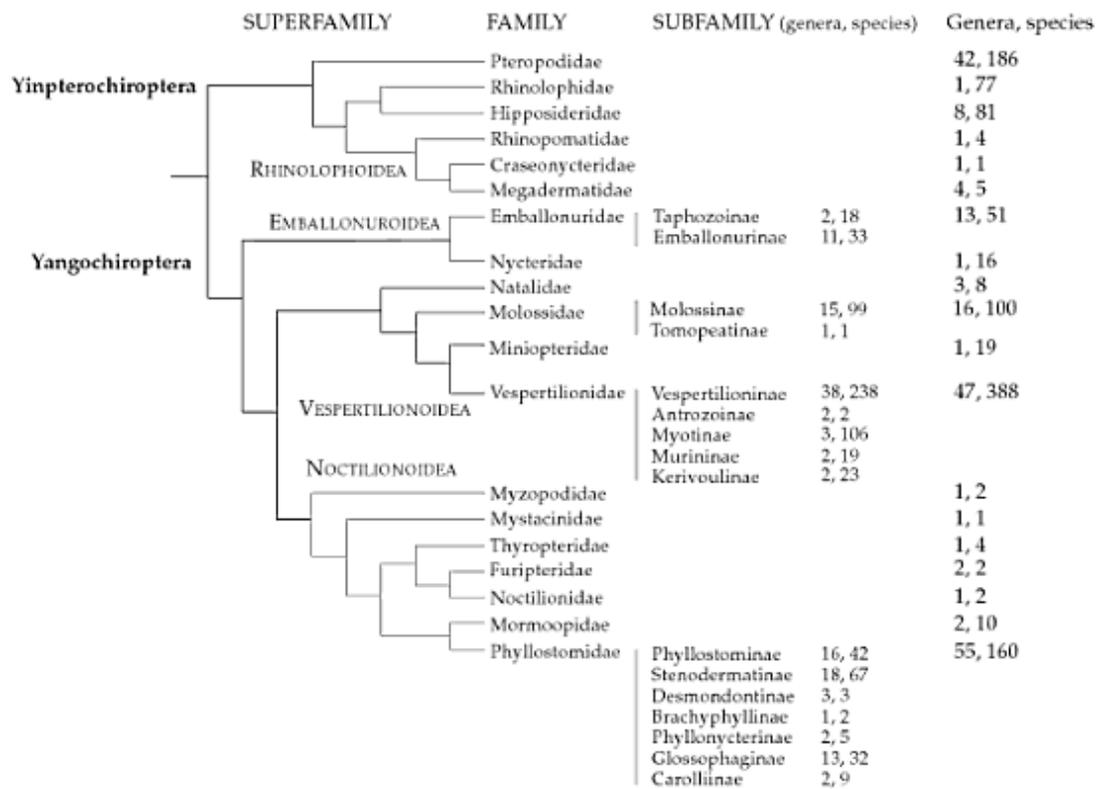


Figura 1. Árbol evolutivo de los quirópteros. Tomado de ALTIGRAM John. Bats: From Evolution to Conservation. 2nd Edition. Oxford University Press. Great Britain. 2011

Según esta clasificación el murciélago *Artibeus jamaicensis* es un miembro del suborden *Yangochiroptera*, superfamilia *Noctilionoidea*, familia *Phyllostomidae*, subfamilia *Stenodermatinae* y tribu *Stenodermatini* (Altigram, 2011).

Es un murciélago frugívoro de tamaño medio. Como los miembros de la familia *Phyllostomidae*, presentan una hoja nasal bien desarrollada y un grupo de glándulas sebáceas a su alrededor. Su coloración puede variar desde gris ceniza a marrón ceniza. No presenta cola y la membrana interfemoral es delgada y sin pelo. Su característica principal son un par de líneas blancas, una desde la nariz hasta la parte posterior de las orejas sobre los ojos y una por debajo desde la parte inferior de la nariz al tragus; la línea superior se encuentra más definida y ambas son más notorias en individuos de color más claro. Su longitud va desde los 78 a los 89 mm, la longitud del antebrazo es de 52 a 67.4 mm, la longitud craneal varía de los 26.2 a 31.6 mm. Su promedio de peso es de 40 a 60 gr (Ortega y Castro-Arellano, 2001).

A. jamaicensis es la especie más ampliamente distribuida de su género y habita una gran cantidad de hábitats, desde el norte de México, las islas del

Caribe y Centroamérica hasta la parte norte de Sudamérica. Prefiere hábitats húmedos aunque puede habitar bosques secos y áreas modificadas por el hombre. Es un murciélago frugívoro que se alimenta principalmente de zapote, por lo que es conocido comúnmente como murciélago zapotero. También se alimenta de otras frutas, así como de flores, polen, néctar y hojas, dándole una gran variedad de fuentes alimenticias. Usualmente carga las frutas u hojas a un nido de alimentación cercano o no al área de recolección del alimento (Ortega y Castro-Arellano, 2001)

1.2 Glándulas salivales

Las glándulas salivales son aquellas que vacían sus productos secretores en la cavidad bucal. Morfológicamente están conformadas por unidades de células secretoras frecuentemente llamadas piezas terminales, porciones secretoras o acinos y conductos excretorios principalmente. Son glándulas exocrinas, túbulo-acinares compuestas, con secreción de tipo merócrina y tienen a su cargo la producción y secreción de la saliva, la cual humedece y protege la mucosa bucal (Dobrosielski-Vergona, 1993; Gómez De Ferraris, 2005; Gartner, 2002).

A pesar de ser consideradas comúnmente como órganos puramente digestivos, las glándulas salivales son capaces de realizar una gran variedad de funciones. La saliva que secretan protege los dientes de ataques bacterianos, así como también protege la mucosa oral de agentes potencialmente dañinos. Por ejemplo, en mamíferos cuya dieta incluye material potencialmente tóxico como las glándulas cutáneas de algunas ranas, la saliva parece neutralizar la ingesta tóxica. En los murciélagos vampiros, las glándulas salivales secretan un activador del plasminógeno denominado desmoteplasa, el cual rompe la fibrina mientras se forma para permitir un flujo continuo de sangre y poder alimentarse de ella (Medcaf, 2011). Algunos animales utilizan la saliva como marcador territorial (Tandler, 1993). Las funciones básicas de la saliva, comunes en todos los mamíferos se resumen en la figura 2 (Gómez de Ferraris, 2005).

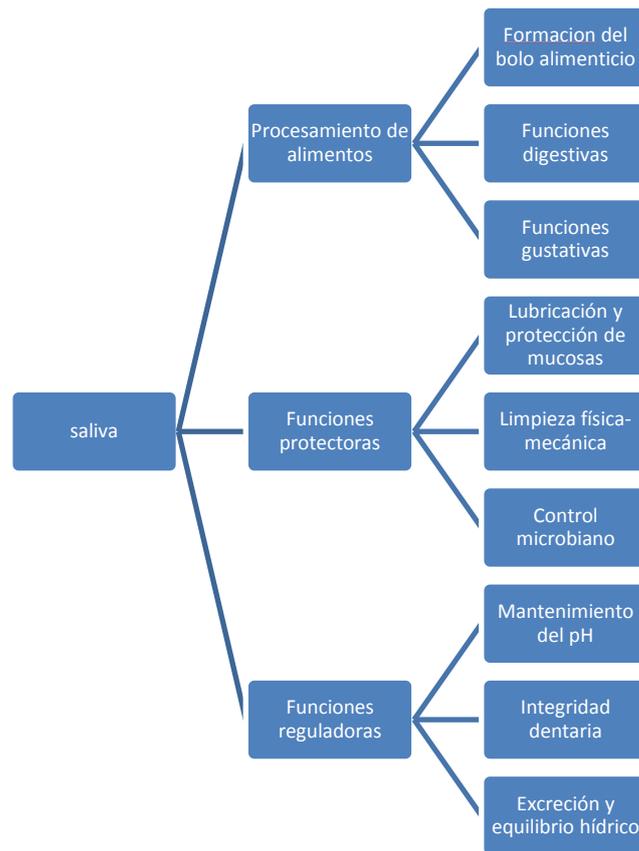


Figura 2. Principales funciones de la saliva. Diagrama que muestra las principales funciones de la saliva descritas en mamíferos.

Además de la función secretora de la saliva, las glándulas salivales secretan factores de crecimiento y sustancias vaso activas que son liberadas en el torrente sanguíneo y en la cavidad bucal, incluso llegan a aparecer ciertas hormonas en la saliva (Tandler, 1993). Aunque se conoce la función de muchas sustancias, existen algunas cuya función permanece desconocida. Las sustancias encontradas más frecuentemente son: Amilasa salival, lisozimas, IgAs, IgG, IgM, lactoferrina, urea, glucosa, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), insulina y el factor de crecimiento semejante a la insulina (FGI) (Kagami, 2000; Bagán, 2003; Gómez de Ferraris, 2005). La ineficiencia en la función de las glándulas salivales puede resultar en daño severo a la mucosa bucal, caries y dificultad para deglutir, lo que disminuye la calidad de vida. En especies silvestres, está perdida de función podría causar imposibilidad para alimentarse y por lo tanto

una reducción de la ingesta calórica y posiblemente inanición (Bagán, 2003; Gómez de Ferraris, 2005; Harunaga, 2011).

El desarrollo de las glándulas salivales en el ser humano inicia entre la sexta y octava semana de vida intrauterina (Gómez de Ferraris 2005), en el ratón los primeros esbozos de la formación de las glándulas salivales se ha detectado en el día 12 post coitum (dpc) (Hsu, 2010). Las glándulas salivales se consideran de origen ectodérmico, a excepción de las glándulas tonsilares, cuyo origen se considera endodérmico (Abramovich, 1997). Se ha documentado que todos los tipos de glándulas salivales se desarrollan de la misma manera independientemente de su localización (Gómez de Ferraris, 2005). La formación de estos órganos inicia como un engrosamiento del epitelio del estomodeo o cavidad bucal primitiva, sitio donde se formará el ostium. Conforme avanza el desarrollo, el brote glandular se elonga formando un cordón, el cual se invagina dentro del mesénquima y posteriormente se ramifica a partir de su extremo distal. Este proceso es conocido como morfogénesis ramificante, y conduce a la formación de la estructura compuesta de la glándula (Abramovich 1997; Gomez de Ferraris 2005). Este proceso de ramificación en el ratón inicia a los 13 dpc con la formación de un engrosamiento en la región distal de los cordones celulares que están rodeados por mesénquima condensado. Este engrosamiento es marcado por un número creciente de hendiduras que lo dividen en numerosos botones. La glándula entonces sufre numerosas rondas de formación de hendiduras y botones mientras el cordón que formará el ducto se elonga (Chi-feng Hsu 2010). Los cordones remanentes que unen a las porciones terminales en formación con el epitelio del estomodeo sufren apoptosis en sus células centrales dando origen a conductos, mientras que células localizadas en las porciones distales se diferencian en células secretoras conformando las unidades terminales o acinos (Abramovich 1997; Gomez de Ferraris 2005). En la figura 3, se muestra un diagrama de las vías de transducción de señales y factores de crecimiento más importantes en el proceso de morfogénesis ramificante (Chi-feng Hsu 2010).

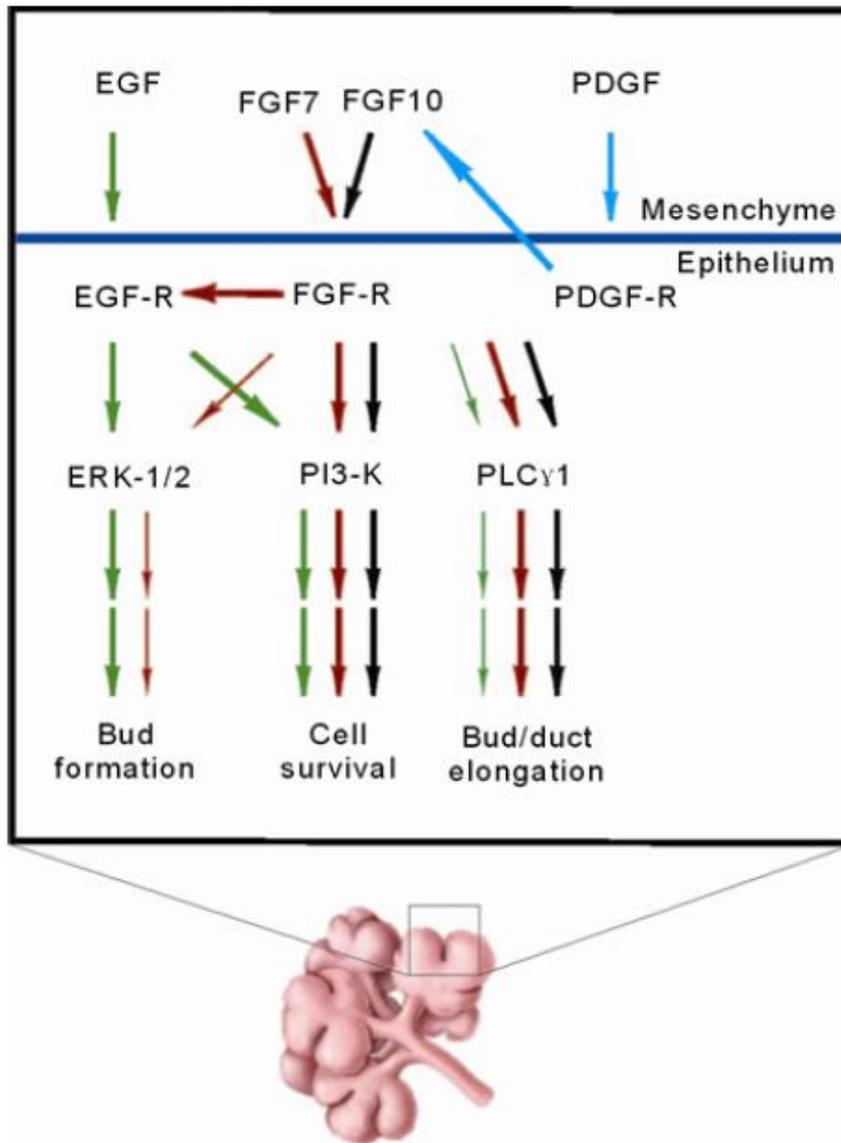


Figura 3. Diagrama de las vías de transducción de señales y factores de crecimiento involucrados en el proceso de la morfogénesis glandular.

Las glándulas salivales se subdividen en glándulas salivales mayores o extrínsecas y menores o intrínsecas. Existen tres pares de glándulas salivales mayores que se localizan fuera de la cavidad bucal y desembocan en ella por medio de conductos principales. Las glándulas salivales mayores son: Parótida, submandibular y sublingual. Las glándulas salivales menores se encuentran distribuidas en la mucosa y submucosa de los órganos de la cavidad bucal y están conectadas a la superficie mucosa por medio de cortos conductos excretores, son pequeñas y muy numerosas. Se dividen en: labiales, genianas, palatinas y linguales que incluyen las glándulas de Blandin Nuhn, en la región antero-ventral; las de Weber o dorso posteriores y las de Von Ebner, en el

surco de las papilas caliciformes (Dobrosielski-Vergona 1993; Gómez De Ferraris 2005). En el vampiro común existen también unas glándulas mediolinguales con estructura tubular diferente a las demás especies (Tandler y Toyoshima 1997), lo cual parece estar relacionado con su alimentación.

La unidad secretora básica de las glándulas salivales son los acinos. Estos son sacos formados por células serosas y mucosas que segregan respectivamente, enzimas y mucina. Los acinos están formados por las células acinares, las cuales presentan forma piramidal y su función es vaciar sus productos secretores en los lúmenes de los acinos y en los túbulos. La tinción con hematoxilina y eosina permite distinguir dos tipos de células secretoras: serosas y mucosas (Gómez De Ferraris, 2005). Sin embargo, al examinarse con técnicas histoquímicas para glucoconjugados es posible identificar un tercer tipo de célula secretora denominada seromucosa (Dobrosielski-Vergona, 1993).

1.3 Morfología de las células secretoras

Considerable polémica ha existido desde la aparición de técnicas histoquímicas y de microscopía electrónica para definir e identificar el tipo de célula secretora del que se conforma una glándula salival. Convencionalmente las células que conforman las piezas terminales son clasificadas dentro de una de estas tres categorías: serosas, mucosas o una forma intermedia llamada seromucosa (Tandler, 1978). Las células secretoras serosas y mucosas son los términos más antiguos y se acuñaron para describir la apariencia de las células con tinciones de rutina; sin embargo muchos investigadores se plantearon la pregunta de si estas descripciones tendrían algún significado biológico, si las células identificadas como serosas o mucosas tendría el mismo origen, papel biológico o las mismas funciones en diferentes especies (Tandler, 1993).

Existe cierto consenso en relación a la forma y función de las células mucosas, sin embargo la definición tanto de células serosas como seromucosas es más complicado y ha causado considerable controversia (Tandler, 1993). Se han utilizado tanto criterios histoquímicos como morfológicos para definir ambos tipos celulares. Pinkstaf en su revisión de 1993 menciona que el término “seroso” debía dejarse de lado debido a que todos los gránulos secretores de

las glándulas salivales producen al menos pequeñas cantidades de glucoconjugados. Young y van Lennep en 1978 construyeron una clasificación basada en la ultraestructura para simplificar la identificación del tipo celular y evitar el uso de toda una batería de pruebas histoquímicas. Sus criterios morfológicos incluyeron gránulos relativamente grandes y discretos, con una matriz granulada y moderadamente electro-densa, es decir, frecuentemente con una o varias inclusiones densas (Tandler, 1993).

Utilizando tanto una tinción con azul de toluidina para microscopía de campo claro, así como microscopía electrónica de transmisión (MET), Tandler en 1993 propone un punto medio entre los dos extremos mencionados anteriormente. Clasifica como células serosas a aquellas células que presentan gránulos teñidos de color azul a negro con azul de toluidina y que aparecen con una matriz electro-densa analizándolas por MET. Por otro lado, clasifica como células seromucosas aquellas que aparecen con gránulos apenas teñidos con azul de toluidina y con muy poca electro-densidad al MET. Yendo un poco más lejos incluye como células seromucosas aquellas que no son identificadas claramente como células mucosas.

Las células acinares mucosas observadas en cortes convencionales teñidos con hematoxilina y eosina (HE), se aprecian con un material vagamente teñido eosinófilo. En cortes semifinos teñidos con azul de toluidina los gránulos son fácilmente identificables y su contenido se observa con grados variables de metacromasia (Tandler, 1993). La metacromasia es la propiedad de ciertas moléculas de cambiar el color de algunos colorantes básicos (Junqueira y Carneiro 2005). La característica más notoria en el MET es la gran cantidad de gránulos localizados en la región supranuclear, éstos tienden a ser más grandes que los de las células serosas y con una matriz electro lúcida que contiene material fibro-granular (Tandler, 1993).

Algunas porciones secretoras mucosas presentan grupos de células secretoras que parecen cubrir sus extremos ciegos y son llamadas demilunas o semilunas (Dobrosielski-Vergona, 1993; Gómez De Ferraris, 2005). Las semilunas son usualmente serosas o seromucosas, aunque en algunos carnívoros se han identificado como mucosas. Se presume que estas células vierten su contenido en la luz del acino por medio de canales intercelulares o por procesos delgados que pasan entre las células mucosas (Dobrosielski-Vergona 1993).

Las glándulas que poseen semilunas son llamadas glándulas de secreción mixta (Dobrosielski-Vergona 1993; Gómez De Ferraris 2005).

Las glándulas parótidas de humano, ratón y rata han sido clasificadas con técnicas histológicas de rutina (HE) como de tipo seroso; sin embargo por métodos histoquímicos se ha demostrado la presencia de glucoconjugados y se han clasificado como seromucosas. Las células secretoras de la glándula parótida de rata observadas en el MET presentan gránulos moderadamente electro-densos típicamente serosos; en el ratón aparecen similares a las descritas en rata pero suele apreciarse un borde electro-denso en los gránulos secretores con ocasionales esferas centrales. En el humano se observan células serosas moderadamente electro-densas con esférulas centrales o excéntricas en los gránulos de secreción (Dobrosielski-Vergona, 1993).

Las glándulas submandibulares humanas histológicamente presentan piezas terminales tanto serosas como mucosas, las piezas mucosas se encuentran cubiertas por semilunas seromucosas. Ultraestructuralmente las células mucosas presentan la morfología clásica ya descrita. Las glándulas submandibulares de ratón y rata difieren de las del humano en que no presentan piezas terminales mucosas ni semilunas seromucosas, sus acinos son considerados histoquímicamente seromucosos y ultraestructuralmente se asemejan a piezas terminales mucosas (Dobrosielski-Vergona 1993).

Las glándulas sublinguales humanas son glándulas mixtas que consisten principalmente en acinos mucosos con semilunas seromucosas y algunos acinos de tipo seroso. Las glándulas sublinguales de rata y ratón son histológicamente similares a las del humano. La ultraestructura de estas glándulas en las especies mencionadas corresponde a la descrita para las células mucosas (Dobrosielski-Vergona 1993).

Utilizando la clasificación propuesta por Tandler (1993), las células secretoras tienen las siguientes características:

Células serosas. Células de forma piramidal cuyos gránulos de secreción a nivel de microscopía de campo claro, teñidos con azul de toluidina aparecen intensamente azules o negros y al MET se observan con matriz electro-densa (Tandler 1993).

Células seromucosas. Células piramidales o cuadrangulares apenas teñidas con azul de toluidina en cortes semifinos. Con MET se observan gránulos secretores con muy baja electro-densidad (Tandler 1993).

Células mucosas. Estas células analizadas en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina, presentan gránulos individuales que pueden distinguirse fácilmente, así como material secretor, que dependiendo de la especie, puede detectarse desde levemente hasta intensamente metacromático. Con MET estas células se observan completamente cargadas de gotas mucosas con matriz electro-lúcida. Se dice que estos gránulos son 50% más grandes en diámetro que los gránulos observados en las células serosas (Tandler 1993).

1.4 Células mioepiteliales

Las piezas terminales o secretoras se encuentran parcialmente cubiertas por células con procesos citoplasmáticos largos que forman una red entrelazada (Redman, 1994). Estas células son muy similares a células propias de músculo liso, aunque son claramente epiteliales, por este motivo son llamadas células mioepiteliales (CME) (Gómez de Ferraris, 2005; Gartner, 2002; Redman, 1994). Las CME se encuentran interpuestas entre las células secretoras y la lámina basal y contienen filamentos de queratina y un gran número de miofilamentos contráctiles como actina, miosina, calponina y caldesmona (Gómez de Ferraris, 2005; Ogawa, 1999).

Al contener miofilamentos estas células poseen capacidad de contracción. Están encargadas de facilitar la expulsión de la saliva cuando la glándula es estimulada (Dobrosielski-Vergona 1993; Redman 1994; Gartner 2002; Gómez de Ferraris, 2005; Elewa 2010). También se considera que refuerzan las células parenquimatosas y previenen la acumulación de saliva, por tanto evitan el daño celular consecuente, además ayudan en la propagación de estímulos secretores. Según Elewa (2010) las CEM sirven como pared protectora contra la constricción de las luces delgadas de los ductos intercalados y contra el aumento de la presión del parénquima y tejidos circundantes.

Las células mioepiteliales se diferencian a partir de células progenitoras epiteliales localizadas en los botones que darán origen a las porciones terminales. La expresión de actina de músculo liso y queratina muestra la aparición de estas células entre el día 20 y 21 de vida intrauterina en las ratas en desarrollo (Ogawa, 1999).

La distribución de las células mioepiteliales varía considerablemente entre especies y en la misma glándula en el curso del desarrollo. Gracias a su forma típica y sus procesos interconectados, han sido descritas como células en cesta, células estrelladas o incluso se han comparado con “pulpos sobre una roca” (Redman, 1994). También se ha reportado que su distribución es más densa en glándulas con secreción viscosa más que en glándulas de secreción serosa. En la rata, por ejemplo, en la etapa adulta no aparecen células mioepiteliales en los acinos de la glándula parótida, sin embargo en ratas juveniles y recién nacidas son frecuentemente localizadas. Tsujimura en 2006 atribuye este fenómeno al cambio de tipo secretor de mixto a seroso, apoyando las descripciones que relacionan la cantidad de células mioepiteliales presentes con el tipo de secreción de la glándula. Así mismo, Elewa en 2011 menciona en un estudio realizado en cabras que la forma de las células mioepiteliales también depende del tipo secretor glandular, siendo células de mayor tamaño en las glándulas con secreción más bien viscosa.

Como se ha mencionado, la distribución de las células mioepiteliales es variable según la especie y la edad de los individuos. Dado que en este estudio nos ocupamos de animales adultos, se describirá únicamente la distribución de estas células en individuos desarrollados y en las especies mejor estudiadas como son el humano, el ratón y la rata.

En las tres glándulas salivales mayores del ser humano las células mioepiteliales se localizan recubriendo los acinos, conductos intercalares y conductos estriados (Redman, 1994; Hardy 1998; Gomez de Ferraris, 2005). En los conductos excretores algunas células basales cumplen la mayoría de los criterios morfológicos de células mioepiteliales (Redman, 1994).

En la glándula parótida de la rata, las células mioepiteliales se encuentran en los conductos intercalares, extendiendo algunos procesos citoplásmicos a los conductos estriados y muy escasamente se llegan a observar en las piezas terminales. En la glándula submandibular se localizan en las porciones acinares y conductos intercalares. En la glándula sublingual presentan una distribución similar a la encontrada en la glándula submandibular (Redman, 1994; Tsujimura, 2006).

En el ratón la localización de las células mioepiteliales en las glándulas salivales mayores es muy similar a la descrita para el ser humano, incluyendo acinos, conductos intercalares y conductos estriados (Hardy, 1998).

En la Tabla 1 se resume la distribución de las células mioepiteliales de las glándulas salivales mayores de las especies mencionadas:

ESPECIE	PAROTIDA	SUBMANDIBULAR	SUBLINGUAL
HUMANO	Acinos, conductos intercalares y conductos estriados	Acinos y conductos intercalares y conductos estriados	Acinos, conductos intercalares y conductos estriados
RATA	Conductos intercalares	Acinos y conductos intercalares	Acinos y conductos intercalares
RATON	Acinos, conductos intercalares y estriados	Acinos, conductos intercalares y estriados	Acinos, conductos intercalares y estriados

Tabla 1. Distribución de las células mioepiteliales en tres especies de mamíferos: humano, rata y ratón.

Ultraestructuralmente las células mioepiteliales comparten muchas características descritas en las células del músculo liso como: arreglos paralelos de filamentos reunidos en cuerpos densos anclados a la membrana basal en placas de anclaje; núcleos fusiformes paralelos al eje mayor o a la prolongación citoplásmica más larga; numerosas caveolas principalmente en la porción basal de la membrana; partículas de glucógeno; retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi dispersos y una lámina basal. Están unidas a las células secretoras y epiteliales por desmosomas (Chaudhry, 1987; Redman, 1994). Los núcleos tienen forma de disco cóncavo, pero son fáciles de reconocer en cortes transversales por su yuxtaposición con las células epiteliales. Pueden ser distinguidas de células de músculo liso por su anclaje a células parenquimatosas mediante desmosomas y a la lámina basal por hemidesmosomas (Redman 1994).

La localización de las células mioepiteliales utilizando microscopía de campo claro con técnicas histológicas convencionales es extremadamente difícil, por lo que se han utilizado recientemente herramientas como la inmunohistoquímica

e inmunofluorescencia, que utilizan proteínas específicas de la superficie celular para marcarlas con colorantes enzimáticos o fluorescentes, respectivamente, y facilitar su observación. Los marcadores más comúnmente utilizados para marcar a estas células pueden ser de tres tipos (Ogawa, 2003):

a) Marcadores de proteínas musculares como actina alfa de musculo liso (alpha-SMA), SMMHC (cadena pesada de miosina de musculo liso), h-caldesmona y calponina básica que se expresan en CME y vasculatura mesenquimal.

b) Proteínas expresadas por CME y células ductales que incluyen queratinas 14, 5 y 17, integrina alfa-1 beta-1 y metalotioneina.

c) Vimentina, que marca CME, células mesenquimales y algunas ductales.

En este estudio y de acuerdo con lo descrito por Draeger en 1991 y Ogawa en 2003 empleamos los marcadores SMA α , queratina 14 y desmina siendo los más específicos y mejor descritos en las células mioepiteliales.

1.5 Glándulas salivales y murciélagos

Los murciélagos tienen las mismas glándulas salivales mayores encontradas en otros mamíferos, con la diferencia de que frecuentemente la glándula submandibular está dividida en una glándula principal y una accesoria. El término principal se reserva para la glándula de apariencia mixta similar a la de otras especies, y la accesoria es comúnmente la más pequeña, aunque hay casos en los que su histología difiere independientemente del tamaño (Dobrosielski-Vergona, 1993). A este respecto, cuatro de las especies de murciélagos que se alimentan de ranas presentan folículos en lugar de acinos y los conductos carecen de las características citológicas de otros mamíferos, sus células foliculares tienen cuerpos citoplásmicos inusuales, mitocondrias con cuerpos cristaloides y ambos elementos –túbulos y folículos- están rodeados de células mioepiteliales inervadas con terminaciones hipolemales; se cree que secretan neutralizantes de toxinas, los acumulan y luego los expulsan rápidamente con ayuda de las CME (Tandler 1997). En el vampiro común (*Desmodus rotundus*), ambas glándulas varían, la principal presenta túbulos serosos con casquetes mucosos, la accesoria presenta acinos mucosos con semulinas mucosas que difieren en contenido con los acinos y las células tubulares están especializadas para la dieta extremadamente alta en cloruro de sodio (Tandler 1997). En el caso de algunas especies como

Tadarida thersites esta división no ocurre en la glándula submandibular, si no en la parótida, en la que la glándula principal es de tipo serosa y la accesoria tiene el mismo parénquima pero en lugar de conductos intercalares tiene conductos con luz muy amplia llamados macroductos con el mismo tipo de epitelio, que reducen su tamaño conforme se acercan a la periferia glandular (Nagato, 1998).

Dentro de este contexto, también se sabe que la morfología de las células de las glándulas salivales de 7 especies de murciélagos del género *Artibeus* – incluyendo a *A. jamaicensis*- es idéntica constando principalmente de acinos seromucosos con gránulos esféricos y conductos intercalares cortos. *Artibeus obscurus* es el único que difiere teniendo células acinares conteniendo megamitocondrias en las que, por motivos desconocidos, la estructura de su matriz es totalmente diferente (Tandler 1997). La glándula submandibular del género *Artibeus* es considerada mixta con acinos serosos y semilunas seromucosas (Tandler 1997).

ANTECEDENTES

Como se ha mencionado los quirópteros son una de las especies de mamíferos más exitosas y diversas que existen constituyendo la segunda familia más numerosa (Altigram, 2011). Los murciélagos han desarrollado diferentes habilidades para obtener y asimilar nutrientes y esto se ve reflejado en su historia evolutiva, existiendo especies cuya alimentación se basa en insectos (insectívoros), carne (carnívoros), fruta (frugívoros), néctar (nectarívoros), sangre (hematófagos) o, incluso, omnívoros (Dobrosielski-Vergona, 1993).

Los diversos hábitos alimenticios se han logrado relacionar con la morfología craneal en estudios realizados con varias especies de murciélagos frugívoros, encontrándose diferencias anatómicas entre las especies que se alimentan de frutas suaves y las que se alimentan de frutas duras (Zubaid et al, 2006). Así mismo, se sabe que las glándulas salivales de diferentes especies de quirópteros con diferentes hábitos alimenticios difieren morfológicamente entre sí (Dobrosielski-Vergona, 1993).

Como se mencionó, una de las funciones principales de la saliva es la digestiva, sin embargo también contiene sustancias con funciones tan diversas como la protección de los dientes contra ataques bacterianos, lubricación y protección de la mucosa bucal, etcétera. En mamíferos que incluyen en su dieta agentes potencialmente tóxicos (por ejemplo de ranas que poseen glándulas tóxicas en la piel) la saliva llega a neutralizar a estos agentes nocivos; los murciélagos vampiros secretan activadores de plasminógeno para evitar la coagulación sanguínea y permitir su alimentación; se sabe que en ciertos animales la saliva influencia el comportamiento sexual como por ejemplo, para marcar el territorio. A pesar de estas diferencias funcionales las glándulas salivales en mamíferos están constituidas bajo el plan general descrito anteriormente (Tandler, 1993).

Los murciélagos tienen los mismos tres pares de glándulas salivales mayores encontrados en otras especies de mamíferos (parótida, submandibular y sublingual); sin embargo difieren en que frecuentemente presentan dos glándulas sublinguales a cada lado que son divididas en principal y accesoria. Debido a la diversidad alimentaria de los murciélagos es de suponer que exista

una gran diversidad morfológica de las glándulas salivales tanto entre diferentes especies como en una misma especie (Dobrosielski-Vergona 1993). Como se ha descrito, existen numerosos estudios que describen las características de las glándulas salivales en murciélagos centrándose principalmente en sus porciones secretoras, sin embargo las células mioepiteliales en estos mamíferos no han sido estudiadas a profundidad a pesar de su importancia en la fisiología de las glándulas salivales.

En este estudio utilizamos y cuantificamos los marcadores más comunes de células mioepiteliales para su localización en las glándulas salivales mayores del murciélago frugívoro *Artibeus jamaicensis*. Debido a la participación de las células mioepiteliales en la etiopatogénesis de diversas neoplasias de glándulas salivales, la comprensión a profundidad de sus características también permitirá un mayor entendimiento de su participación en estas patologías (Fraga lanez, et al 2010). De esta manera, la información obtenida en este estudio podría ser de utilidad para localizar a las células mioepiteliales en otras especies y en patologías de glándulas salivales.

3. JUSTIFICACIÓN

Al conocer la distribución y morfología de las células mioepiteliales en las glándulas salivales del murciélago frugívoro *Artibeus jamaicensis* podemos establecer si existen diferencias con otras especies de quirópteros con dietas diferentes y relacionar estas diferencias con el tipo secretor de las glándulas salivales de otros organismos.

4. HIPOTESIS

La morfología y distribución de las células mioepiteliales será diferente según el tipo de glándula salival, tanto en las porciones secretoras como ductales. De la misma manera, estas diferencias estarán relacionadas con el tipo de dieta del organismo.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las células mioepiteliales en las glándulas salivales del murciélago frugívoro *Artibeus jamaicensis*.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar anatómicamente las glándulas salivales mayores en el murciélago *A. jamaicensis*
- Identificar histológicamente los componentes de las glándulas salivales.
- Analizar estructural y ultraestructuralmente las células mioepiteliales que conforman las glándulas salivales serosas, mucosas, seromucosas y mixtas.
- Establecer el patrón de expresión para marcadores de células mioepiteliales (SMA α , queratina 14 y desmina).
- Cuantificar los niveles de expresión tanto del ARNm como de la proteína de SMA α , queratina 14 y desmina.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta, manejo y sacrificio de animales

La captura de murciélagos de la especie *Artibeus jamaicensis* se realizó en el municipio de Yautepec en el estado de Morelos con el permiso otorgado por la SEMARNAT (SGPA/DGVS/09713/13).

Las capturas fueron realizadas por la noche utilizando redes tipo niebla colocadas cerca de los lugares de forrajeo de los murciélagos, comúnmente árboles frutales. Inmediatamente después de caer en la red los murciélagos fueron clasificados por especie utilizando tablas taxonómicas (Medellín, Arita y Sánchez, 2008) y colectados únicamente los identificados como *A. jamaicensis*, los murciélagos de otras especies fueron liberados. Los animales colectados fueron colocados en bolsas de manta con alimento y llevados al laboratorio. Inmediatamente después de su llegada al laboratorio los murciélagos fueron pesados y sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico equivalente a 70mg/kg de peso. Para el presente estudio, se emplearon un total de 15 individuos, de los cuales 8 fueron machos y 7 fueron hembras.

Microscopía de campo claro y electrónica

Con la finalidad de realizar el análisis ultraestructural de las células mioepiteliales del murciélago *A. jamaicensis* se obtuvieron cortes de 10 μm en parafina y se tiñeron con Hematoxilina (Electron Microscopy Sciences, USA) y Eosina (AMRESCO, USA) o HE. Por otro lado, se obtuvieron cortes semifinos incluidos en resina epóxica de 1 μm con un ultramicrotomo (EPON 812), los cuales fueron teñidos con azul de toluidina para su observación al microscopio de campo claro. Para la técnica de tinción con HE, fue realizada la escisión de los tres pares de glándulas salivales mayores, posteriormente estos tejidos se fijaron en paraformaldehído (PFA) y procesados para su inclusión en parafina (Paraplast. Leica Biosystems, USA). Para la observación de cortes semifinos los tejidos se fijaron en solución Karnovsky por 1 hora, se lavaron con amortiguador de cacodilatos a pH7.3 y posfijaron en tetróxido de Osmio por 1h.

Posteriormente se lavaron con agua bidestilada y se deshidrataron en alcohol a concentraciones crecientes (70 a 100%); los tejidos se colocaron en Acetonitrilo (JT Baker) y posteriormente en mezclas de acetonitrilo y resina epóxica (EPON 812) a proporciones crecientes (1:1, 1:2) para finalmente ser polimerizados en EPON por 24 hrs. Se realizaron cortes semifinos y se tiñeron con azul de toluidina (Electron Microscopy Sciences, USA).

El mismo procesamiento se utilizó para realizar cortes finos de 600nm, los cuales fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser observados en el microscopio electrónico de transmisión.

Nota: Los microscopios utilizados son enumerados en el anexo 1

Los reactivos utilizados son enumerados en el anexo 2

Inmunohistoquímica

Los tejidos fueron fijados en Paraformaldehído (PFA) al 4% preparado con amortiguador de fosfatos (PBS). Posteriormente, fueron lavados con PBS e incubados en una solución de sacarosa (Sigma-Aldrich, USA) al 30% en PBS a 4°C toda la noche. Los tejidos fueron colocados y orientados en cápsulas Beam y posteriormente embebidos en medio de inclusión OCT (Tissue Tec, Sakura Finetek, USA) para ser congelados en hexano (JT Baker) a -70°C.

Se realizaron cortes en criostato a -24°C con grosor de 20µm y se colocaron tres cortes por glándula por laminilla en orden descendente iniciando con la glándula parótida, después la submandibular y por último la sublingual (figura 4). Se utilizaron laminillas eléctricamente cargadas (Superfrost-Plus Slide, Electron Microscopy Sciences, USA) para minimizar la posibilidad de desprendimiento del tejido de la laminilla, además de una burbuja de vacío para mejorar la adhesión.

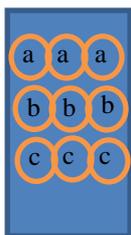


Fig 4. Orden de colocación de muestras en laminilla para inmunohistoquímica. a) Glándula parótida; b) Glándula submandibular; c) Glándula sublingual

Para la detección de las proteínas Desmina, SMA α y Citoqueratina 14 (K14) mediante inmunohistoquímica en los cortes obtenidos por congelación, las laminillas se colocaron en cámaras húmedas y los cortes fueron rehidratados con PBS y se bloquearon las peroxidasa endógenas con agente bloqueador (Blocking Reagent, Biocare Medical PX968MM) durante 30 min. Las secciones se lavaron con PBS y se trataron en solución de Tritón (Sigma) 1x para ser bloqueadas con una solución de albúmina de suero bovino (BSA, Albumine Bovine Serum, Sigma-Aldrich) al 1% por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó el anticuerpo primario correspondiente en la concentración indicada en la tabla 1 y se incubó a 4^o centígrados durante una noche. Se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se bloqueó con BSA durante 15 minutos para ser incubados a temperatura ambiente (TA) con el anticuerpo secundario correspondiente a la concentración indicada en la tabla 2.

Finalmente, la reacción fue revelada con diaminobencidina (DAB Chomogen. Dako, USA) preparada con una gota de cromógeno en 1ml de sustrato siguiendo las instrucciones del fabricante. El tiempo de revelado de cada anticuerpo se determinó mediante la observación al microscopio y la reacción se detuvo con agua bidestilada filtrada. Se realizó una tinción de núcleos con hematoxilina. Se utilizó una solución de montaje (Tissue-teck) para su posterior observación con un microscopio de campo claro.

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Anticuerpo primario	Origen	Marca y No. De catálogo	Dilución
Anti-SMA α	Policlonal generado en conejo	Abcam ab5694	1:200
Anti-K 14	Policlonal generado en conejo	Abcam ab15461	1:200
Anti-desmina	Policlonal generado en conejo	Abcam ab15200	1:200

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Anticuerpo secundario	Origen	Marca y No. De catálogo	Dilución
Anti-conejo acoplado a HRP	Generado en cabra	Invitrogen G21234	1:200
Anti-conejo conjugado Cy5	Generado en cabra	ZyMed 81-6116	1:100
Anti-conejo conjugado Cy3	Generado en cabra	Invitrogen A10520	1:100

Inmunofluorescencia

Los primeros pasos en ésta técnica, rehidratación con PBS y permeabilización con Tritón, fueron los mismos empleados en la inmunohistoquímica. También se emplearon los mismos anticuerpos primarios en las mismas concentraciones. Para esta técnica no es necesario el bloqueo de peroxidasas endógenas. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a fluorógenos (Tabla 2), los cuales fueron incubados por una hora, posteriormente los cortes se lavaron 3 veces 5 minutos con PBS y se procedió al montaje con medio Dako, para su posterior observación al microscopio confocal.

En el caso de los cortes procesados para inmunofluorescencia doble, antes del montaje de la laminilla se procedió a realizar una postfijación con PFA 4% durante 15 minutos, posteriormente se hicieron 4 lavados con PBS de 5

minutos cada uno y se repitió el procedimiento desde la permeabilización del tejido con tritón hasta el montaje de los cortes.

Los cortes se mantuvieron protegidos de la luz a 4°C hasta su observación al microscopio confocal (LSM5 Pascal, Carl Zeiss).

Nota: Los reactivos utilizados son enumerados en el Anexo 3

RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction)

Para realizar esta técnica en primera instancia es necesaria la extracción del ARN total (ARNt) de las muestras obtenidas. El método utilizado para la obtención del ARNt fue por Trizol (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA.)/Cloroformo (JT Baker, USA). Para esto, se obtuvieron las glándulas salivales parótida, submandibular y sublingual las cuales se congelaron en 100µl de Trizol utilizando hielo seco y se almacenaron en un ultracongelador a -70° C.

- Extracción de ARN total.
1. Homogenización: se homogeneizó el tejido en 500µl de Trizol y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (TA)
 2. Separación de fases: se añadieron 200µl de cloroformo por cada mililitro de Trizol utilizado, se mezcló manualmente 15 seg y se incubó 3 minutos a TA. La muestra se centrifugó a 12000 gravedades (g) a 4°C durante 15 min para separar la muestra homogeneizada en una fase inferior de fenol cloroformo, una fase intermedia y una fase acuosa superficial en la que se encuentra el RNA.
 3. Aislamiento de ARN: la fase acuosa obtenida fue tratada con 10 mg de glucógeno libre de DNAsas. Las muestras así tratadas se colocaron en un tubo eppendorf nuevo y se precipitaron con 250µl de Isopropanol

- (J.T.Baker) a TA por 10 minutos. Se centrifugaron las muestras a 12000 g por 10 min a 4°C para obtener el botón de ARN total (ARNt)
4. Lavado del ARNt: se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500µl de alcohol etílico al 80% preparado con agua tratada con DEPC (libre de RNasas), se separó del fondo del tubo en el Vortex y se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4°C. Se decantó la fase acuosa y se dejó secar el botón por 10 min a T. A
 5. Resuspensión: se disolvió el botón de ARNt en 20 a 30 µl de agua con DEPC

La muestra se cuantificó en un espectrofotómetro de masas (BioPhotometer, Eppendorf) utilizando 1µl de muestra en 99 µl de agua libre de RNasas (1:100). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 260 y 280 nanómetros (nm) y se obtuvo la concentración y pureza. Se corrió 1µg de ARNt en un gel de agarosa (Gibco) al 1.5% preparada en agua tratada con DEPC para verificar la integridad del ARNt obtenido.

Debido a que en la bibliografía consultada no se encontraron secuencias de oligonucleótidos publicadas para *A. jamaicensis* de los genes *Acta2*, *Krt14* y *Des*, que codifican SMAα, K14 y desmina respectivamente, se utilizó el programa Oligo Calculator en el cual se obtuvieron las secuencias que se enumeran en la tabla 3 junto con su temperatura media de alineación y el tamaño del producto respectivo en pares de bases.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la técnica de RT-PCR

Gen	Oligonucleótido	Pb	Tm	Número de primer
Acta2	ctgacagaggcaccactgaa (forward)	160	60°C	224844H01
	catctccagagtccagcaca (reverse)			224844H02
Krt14	gtgaagatggccttgatgt (forward)	203	60°C	224844G11
	gtagcctcgctgacaacctc (reverse)			224844G12
Des	cctctggctctcagtcaccc (forward)	206	60°C	224844H05
	agggacaatacaggggctct (reverse)			224844H06

Para realizar la técnica de RT-PCR se siguió el siguiente protocolo utilizando el kit SuperScript RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen, USA):

1. El ARNt se trató con DNasa I (Invitrogen, USA) para evitar la amplificación de ADN genómico. Se empleó 1µl de amortiguador de reacción (10x), 1 µl de la enzima DNasa I y 1 µg de RNAt que se llevaron a un volumen final de 9 µl con en agua libre de DNasa. La mezcla se incubó 15 min a TA y posteriormente con EDTA 10 min a 65°C para inactivar la DNasa I.
2. Para la amplificación se realizó la mezcla de 1µl RNA tratado con DNasa con los reactivos contenidos en el kit para un volumen final de 20µl. Además se utilizó el gen de *β-actina* (*ACTA1*) como control de expresión. Las condiciones utilizadas para establecer el programa de amplificación para los tres genes fueron: 1 ciclo de 30 min a 50°C, un ciclo de 5 min a 94°C; 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 60°C, 30 seg a 72°C; un ciclo de 5 min 72°C.

Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% preparado en TAE 1x con Bromuro de Etidio (BioRad, USA). Se corrió con un voltaje constante de 100mV. Los geles fueron visualizados mediante un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiados con cámara Polaroid (Polaroid, Waltham. MA), revelados en película Fuji FP asa 100B.

Nota: Los reactivos utilizados son enumerados en el Anexo 4

Western blot

Para ésta técnica primero se obtuvieron las proteínas de las glándulas salivales mayores. Para esto se utilizó buffer de lisis en el que se homogeneizaron las muestras y las proteínas obtenidas fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro de masas y una curva estándar de BSA.

Para lograr condiciones desnaturalizantes y lograr la movilización y visualización de las proteínas en el gel se utilizó un sample buffer o Buffer de Leiden en el que se desnaturalizaron las proteínas extraídas. Posteriormente, se hirvieron "baño maría" a aproximadamente 98°C por 5 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo para detener la reacción. La mezcla resultante se separó mediante centrifugación a máxima velocidad durante 10 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante y se hicieron alícuotas para su almacenaje a -70°C hasta su utilización.

Para separar las proteínas se emplearon dos geles, un superior que mantiene la proteína en el pozo en el que se coloca y uno inferior preparado al 10% que facilita que la proteína corra. Ambos fueron preparados con buffers que constan de agua ultrapura y Tris, SDS y HCl, así como acrilamida, PSA 10%, TEMED a diferentes concentraciones para tener un gel inferior más denso que el superior. Las proteínas se cargaron en los pozos y se corrieron en una cámara para transferencia húmeda (Bio-Rad Miniprotein Tetra System) a 20mA y 100 Volts.

Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose Membranes, 0.45µm. Bio-Rad USA) en la misma cámara. En una base de plástico se colocó en forma sucesiva de abajo hacia arriba una esponja, papel absorbente (Wattman), el gel que contiene las proteínas, la membrana de nitrocelulosa, otro papel Wattman y otra esponja. Se presionó con un rodillo para eliminar burbujas y se cerró la base para ser colocada en la cámara sumergida en hielo por una hora a 400mA en buffer de transferencia. Posteriormente, se tiñó la membrana con rojo Ponceau (Sigma USA) para verificar que las proteínas se hubieran transferido correctamente.

La membrana se lavó con TBST y se bloqueó con leche preparada al 5% con TBST durante 1 hora en agitación a TA o toda la noche a 4°C. Se utilizó el mismo anticuerpo utilizado en la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia preparado en la solución de bloqueo a las siguientes concentraciones:

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para realizar el Western blot

Anticuerpo	Concentración
Anti-SMA α	1:2000
Anti-K 14	1:2000
Anti-desmina	1:2500

El anticuerpo se lavó con TBST y la membrana se reveló mediante un kit de quimioluminiscencia (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Thermo Scientific USA) y fue observada en films American Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

Nota: Los reactivos utilizados son enumerados en el Anexo 5

8. RESULTADOS

8.1 Localización anatómica de las glándulas salivales mayores de *A. jamaicensis*

Anatómicamente las glándulas salivales mayores de *Artibeus jamaicensis* se encuentran localizadas de manera similar al ser humano siendo la glándula parótida la de mayor tamaño, seguida por la sublingual y la submandibular. Una vista general de la ubicación de los tres pares de glándulas salivales se ilustra en la figura 5.

8.1.1 Glándula parótida

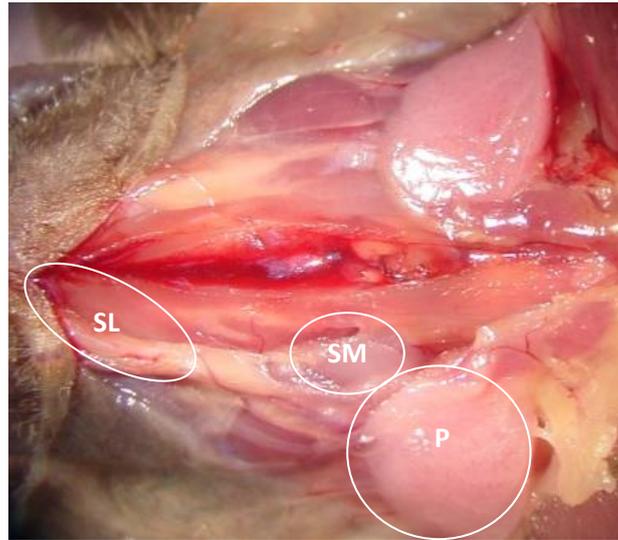
La glándula parótida se encuentra localizada por delante del oído externo extendiéndose hasta el cuello. Se observó ubicada profunda a la piel de la región que cubre al músculo masetero, con más detalle la glándula en sí descansa sobre la cara externa de este músculo. Esta glándula se extiende por debajo del borde de la mandíbula hacia la línea media, y en su profundidad localizada entre los dos lóbulos se encontró la arteria carótida externa.

8.1.2 Glándula submandibular

La glándula submandibular en *A. jamaicensis* se observó de forma piramidal y adherida a la cara medial del cuerpo de la mandíbula. Medial y anteriormente contacta con el músculo milohioideo. Se ubica profunda a la piel de la región que se encuentra entre el borde inferior de la mandíbula y está cubierta por una membrana de tejido (fascia). Se extiende posteriormente hasta el ángulo de la mandíbula.

8.1.3 Glándula sublingual

La glándula sublingual es una sola glándula bien diferenciada de forma aplanada transversalmente y alargada. Lateralmente se ubica en contacto con el cuerpo de la mandíbula y se ubica en la cara inferior de la parte anterior del músculo milohioideo, profunda a la piel de la región cercana a la sínfisis mandibular. Medialmente está en contacto con la masa muscular de la lengua, mientras que anteriormente se prolonga hasta la línea media pudiendo estar en contacto con la glándula opuesta.



Anterior

Posterior

Figura 5. Localización anatómica de las glándulas salivales mayores de *A. jamaicensis*. (P) glándula parótida; (SM) glándula submandibular; (SL) glándula sublingual.

8.2 Identificación histológica de las glándulas salivales mayores de *A. jamaicensis*

8.2.1 Glándula parótida

En cortes realizados en parafina es posible observar que la glándula se encuentra atravesada por tabiques de tejido conjuntivo laxo que dividen el parénquima glandular en lóbulos y que, a su vez, estos están divididos en lobulillos más pequeños. A sí mismo, se observan conductos de diferentes calibres y de epitelio simple a estratificado según aumente el calibre de los mismos. A mayor aumento se observan piezas terminales tanto de forma acinar como tubular, así como conductos estriados en cortes transversales y longitudinales. La tinción se observa eosinófila en el citoplasma, más marcada en los componentes tubulares, y basófila intensa en los núcleos, que se observan en posición basal en las células secretoras y central en las células del epitelio de los conductos. Las células mioepiteliales no son visibles con esta tinción (Fig 6a, 6b).

En cortes semifinos realizados en EPON y teñidos con azul de toluidina se observa que las células que conforman las piezas terminales son de dos tipos:

i) las de piezas terminales de forma acinar (acinos), las cuales son de forma piramidal, con un núcleo basal y presentan una tinción basal más intensa; presentan gran cantidad de gránulos de secreción en su porción coronal de tinción clara por lo que se clasificaron como células de secreción seromucosa.

li) las piezas terminales de forma tubular (túbulos secretores), las cuales se tiñen con menos intensidad, su núcleo se encuentra en posición central y presentan una gran cantidad de gránulos de secreción intensamente teñidos en su porción apical, en la cual no se observan límites celulares definidos. Se observan conductos estriados, así como células mioepiteliales rodeando a las porciones secretoras y ductales estriadas. (Fig 6c, 6d).

8.2.2 Glándula submandibular

En cortes realizados en parafina se puede observar la misma disposición general de la glándula parótida. El parénquima está dividido en lóbulos separados por tabiques de tejido conjuntivo laxo, así mismo los lóbulos se dividen en lobulillos más pequeños y se compone tanto de porciones secretoras como ductales, logrando ser observados conductos excretores y estriados (Fig 7a).

La tinción se observa basófila en el citoplasma de las células secretoras y eosinófila en el citoplasma de las células de los conductos. Se observan semilunas de tinción basófila rodeando a algunos acinos principales. A mayor aumento se puede observar que la basofilia se concentra en las regiones basales de las células y que sus regiones apicales son de tinción más clara debido a que en esta región se encuentran los gránulos secretores. Los núcleos celulares se observan de tinción intensamente basófila (Fig 7b).

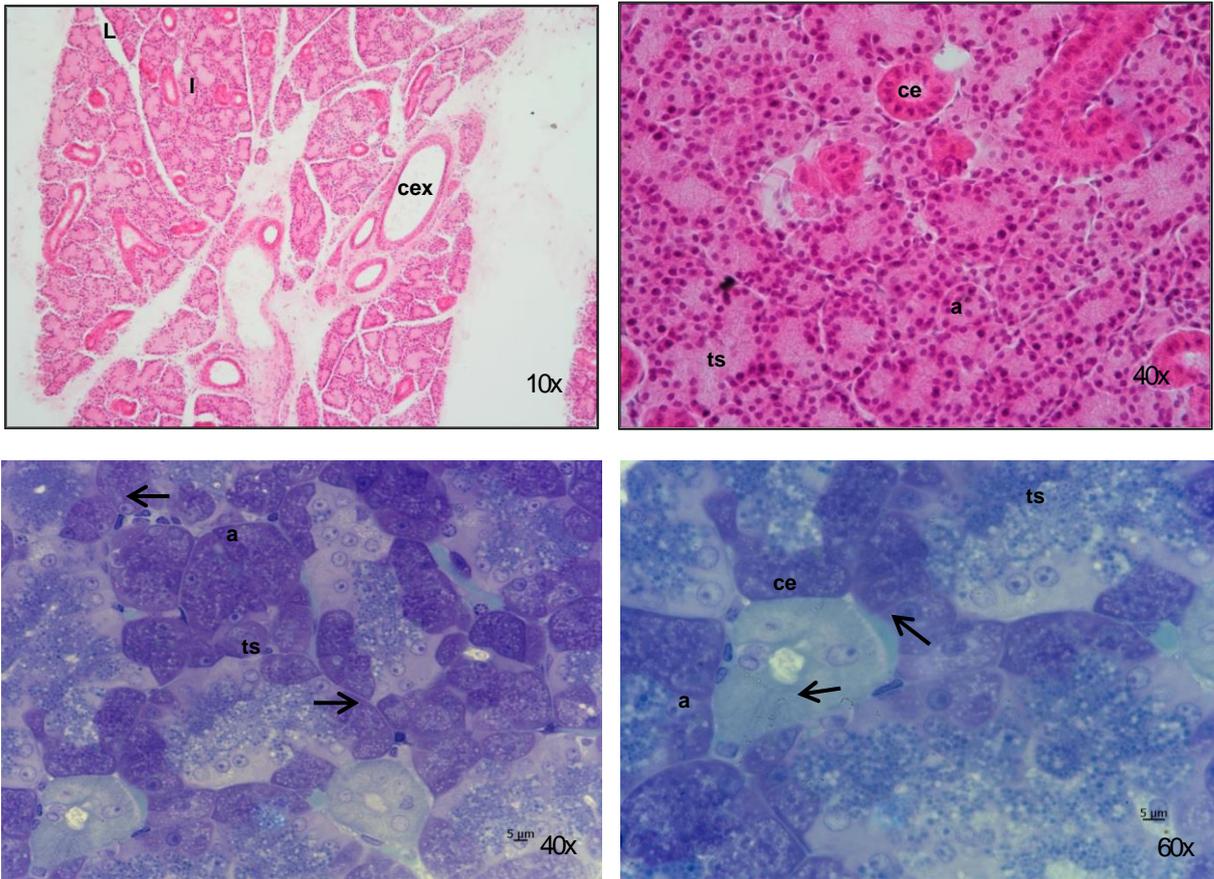


Figura 6. Identificación histológica de la glándula parótida *A. jamaicensis* y sus componentes. (a) corte en parafina donde se observa la división del parénquima glandular en lóbulos y lobulillos, así como el sistema de conductos, aumento 10x; (b) fotografía a mayor aumento donde se observan componentes secretores acinares y tubulares, así como conductos estriados, aumento 40x. (c y d) cortes semifinos en EPON donde se observan los mismos componentes que con HE, sin embargo se pueden observar que los tipos secretores de los componentes acinares y tubulares difieren entre sí, también se observan células mioepiteliales en porciones secretoras y conductos estriados, aumento 40x y 60x respectivamente. Lóbulos (L); lobulillos (I); acinos (a); túbulos secretores (ts); conductos estriados (ce); conductos excretores (cex); células mioepiteliales (flechas).

En los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina se puede ver que las porciones secretoras son de forma redondeada, presentan una luz en el centro, sus células son de forma piramidal y se encuentran llenas de vesículas secretoras de tinción clara en la región apical que desplazan al núcleo, que se observa redondeado y hacia la región basal. Las semilunas presentan las mismas características observadas en los acinos. Así mismo, es posible observar los conductos de menor calibre (intercalares), que están formados por epitelio cúbico simple y presentan núcleo central. También se observan numerosos capilares. Las células mioepiteliales son claramente observables en los acinos como células aplanadas rodeando a las células epiteliales bajo la membrana basal y en los conductos intercalares y estriados rodeando a las

células epiteliales que los forman, observándose sobresalientes hacia los tejidos circundantes (Fig 7c,d).

A mayor aumento se puede ver que las vesículas secretoras de las células acinares son tenuemente teñidas, por lo que el tipo secretor de esta glándula se ha clasificado como mucoso con semilunas mucosas. (Fig 7d).

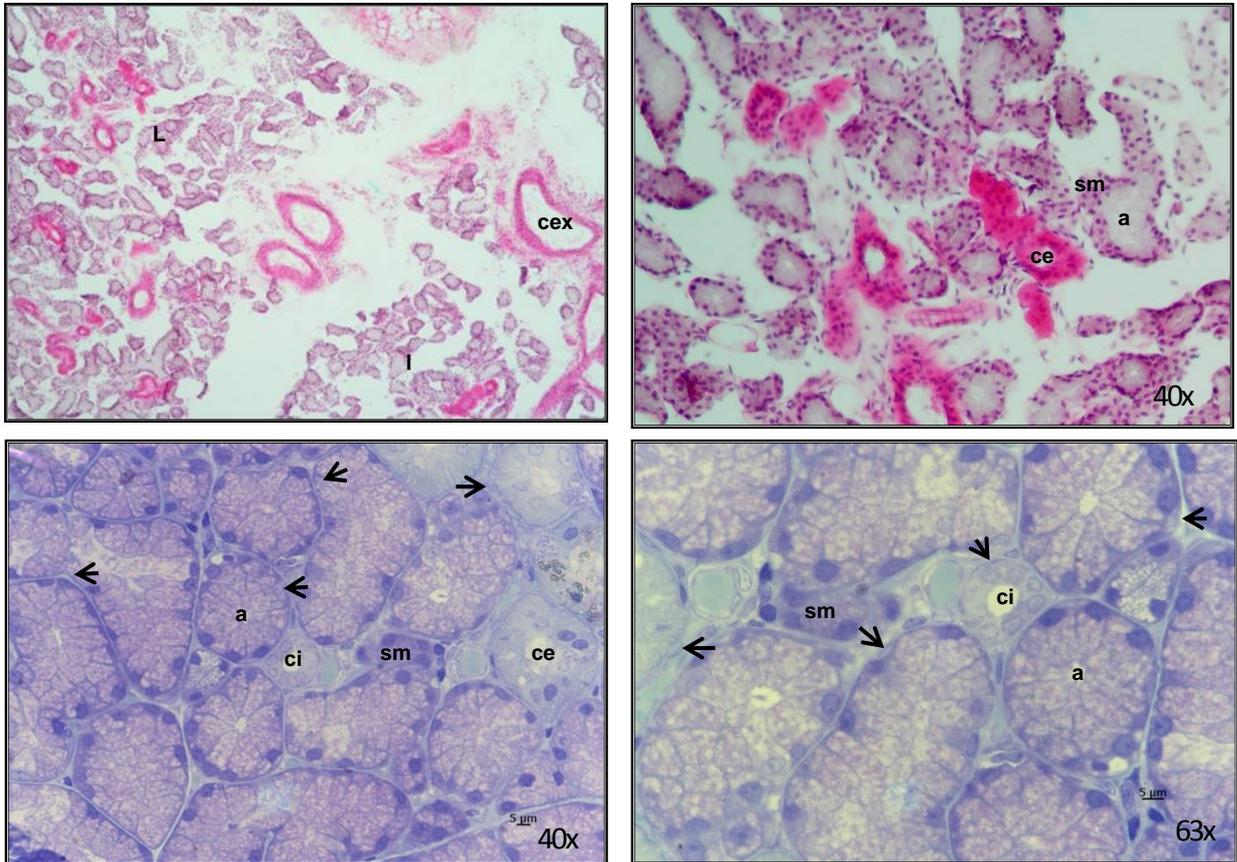


Figura 7. Identificación histológica de la glándula submandibular de *A. jamaicensis* y sus componentes. (a) corte en parafina donde se observa la organización del parénquima aumento 10x; (b) fotografía a mayor aumento donde se observan componentes secretores acinares, semilunas y túbulos, así como conductos estriados, aumento 40x. (c y d) cortes semifinos en EPON donde se observan los mismos componentes que con HE, sin embargo se pueden observar las vesículas de secreción apenas teñidas en acinos y semilunas. También se observan células mioepiteliales en porciones secretoras y conductos estriados, aumento 40x y 60x respectivamente. Lóbulos (L); lobulillos (I); acinos (a); túbulos secretores (ts); conductos estriados (ce); conductos excretores (cex); semilunas (sm); células mioepiteliales (mec).

8.2.3 Glándula sublingual

Al observar los cortes teñidos con HE y al igual que en las glándulas salivales analizadas se pueden identificar lóbulos y lobulillos con componentes secretores, túbulos estriados de epitelio simple y túbulos excretores de epitelio estratificado (Fig 8a). A mayor aumento se observan porciones secretoras de morfología acinar con células piramidales de núcleo redondo basal y citoplasma de tinción más intensa en la porción basal que en la apical. Se observan conductos estriados de tinción eosinófila intensa, con epitelio cúbico simple, los conductos excretores de mayor calibre están formados por epitelio que va del estratificado cúbico al estratificado escamoso (Fig 8b).

En los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina podemos observar acinos con luz en el centro llena de productos de secreción y compuestos por células piramidales con vacuolas de tinción clara. Los conductos estriados parecen estar formados por dos tipos de células, unas con citoplasma de tinción clara y núcleo con heterocromatina y otras con citoplasma de tinción más oscura y núcleos con presencia de heterocromatina. Es posible observar células mioepiteliales en los componentes secretores y conductos estriados (Fig 8c, d). Los conductos excretores presentan células con morfología similar a células mioepiteliales, sin embargo puede tratarse de células basales (Fig 8e).

8.3 Ultraestructura de las células mioepiteliales de las glándulas salivales mayores de *A. jamaicensis*

Después de ser incluidos en EPON y realizados cortes semifinos de 1µm, se realizaron cortes finos de 0.7 µm. Estos cortes fueron contrastados y observados en el MET.

8.3.1 Glándula parótida

En cortes a bajo aumento se puede confirmar que esta glándula es de secreción de tipo seromucoso (Fig 9a). Los límites entre células secretoras se encuentran bien delimitados. Los acinos se encuentran rodeados de células mioepiteliales y separados entre sí por tabiques de tejido conjuntivo. A nivel ultraestructural se observa que las células mioepiteliales se encuentran sobre

las células secretoras y debajo de la membrana basal. Es posible observar la presencia de desmosomas que unen a las células mioepiteliales y células secretoras, y hemidesmosomas que unen las CME con la membrana basal. Así mismo, aparece un fibroblasto que forma parte de los tabiques e tejido conjuntivo.

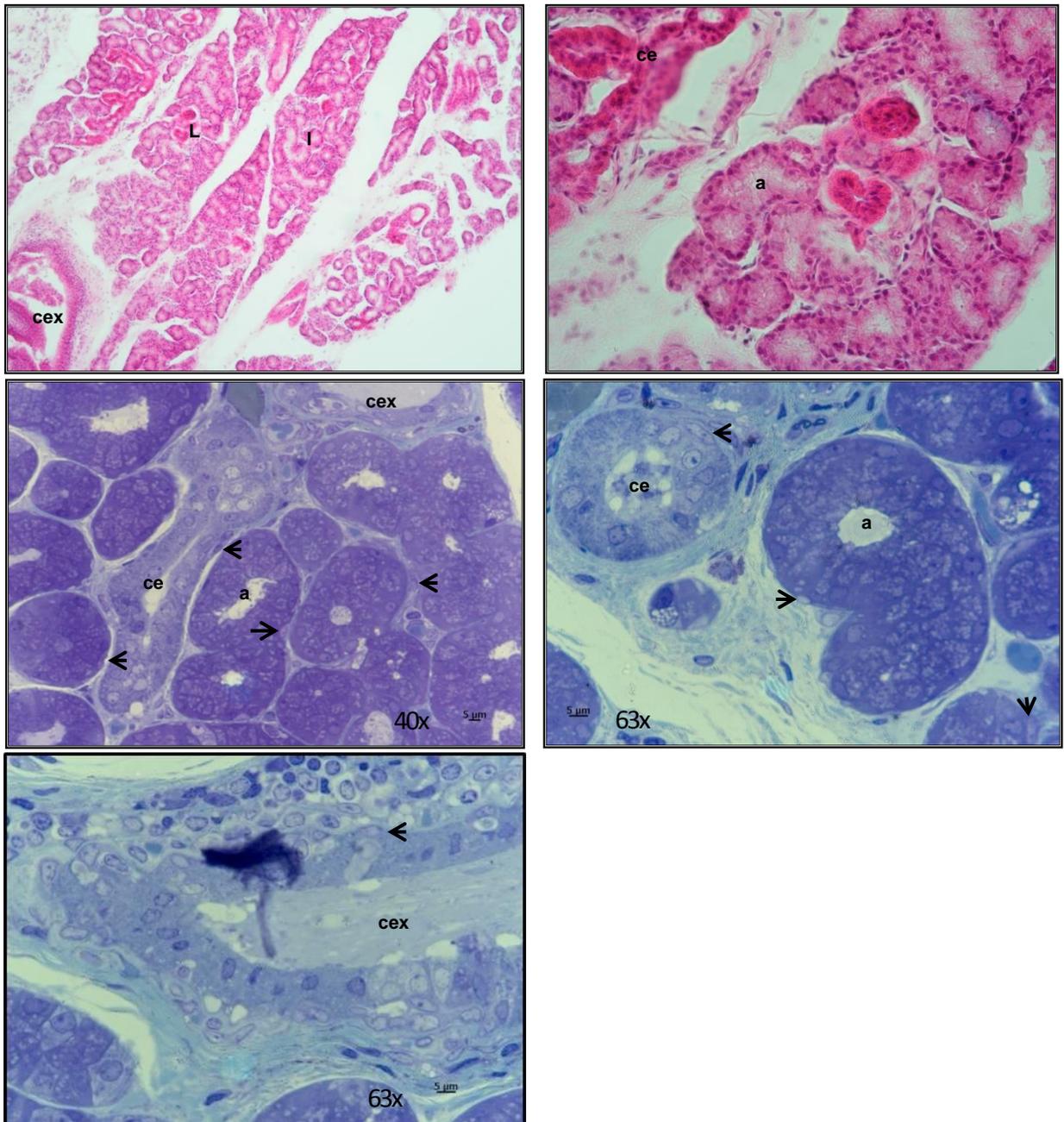


Figura 8. Identificación histológica de la glándula sublingual de *A. jamaicensis* y sus componentes. (a) Corte en parafina donde se observa la organización del parénquima aumento 10x; (b) fotografía a mayor aumento donde se observan componentes secretores acinares y conductos estriados, aumento 40x. (c y d) cortes semifinos en EPON teñidos con azul de toulidina donde se pueden observar vesículas secretoras apenas teñidas. También se observan células mioepiteliales en porciones secretoras y conductos estriados, aumento 40x y 60x respectivamente. (e) Fotografía a 60x de conducto excretor donde se pueden observar células con morfología similar a células mioepiteliales. Lóbulos (L); lobulillos (l); acinos (a); túbulos secretores (ts); conductos estriados (ce); conductos excretores (cex); células mioepiteliales (cme).

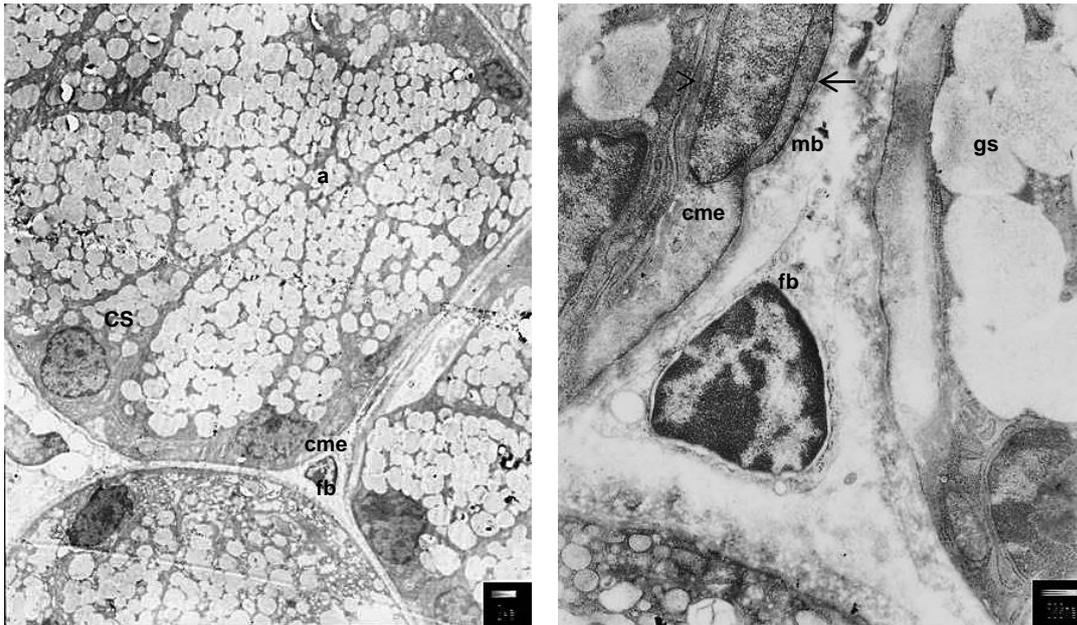


Figura 9. Ultraestructura de las porciones secretoras de la glándula parótida de *A. jamaicensis*. (a) porciones secretoras o acinos donde se observan células secretoras de contenido levemente electrodensso, células mioepiteliales y un fibroblasto en el tejido conjuntivo entre los acinos; (b) fotografía a mayor aumento donde se observan las células gránulos de secreción llenos de gránulos levemente elecrodensos; una célula mioepitelial por fuera de la célula secretora y debajo de la membrana basal, se observan los hemidesmosomas que la unen dicha membrana y desmosomas que la unen a la célula secretora. También se observa el fibroblasto presente en (a). Acinos (a); células mioepiteliales (cme); fibroblasto (fb); membrana basal (mb); hemidesmosomas (flechas); desmosomas (punta de flecha).

8.3.2 Glándula submandibular

La porción secretora de la glándula submandibular está formada por células piramidales con un gran número de vesículas de secreción conteniendo una gran cantidad de material electrodensso. Se encuentra rodeada por tejido conjuntivo, así como por CME. Se observan células secretoras con mitocondrias de gran tamaño (Fig 10a). Las CME están rodeadas por la membrana basal y unidas por hemidesmosomas, así como unidas a las células secretoras por desmosomas (Fig 10b).

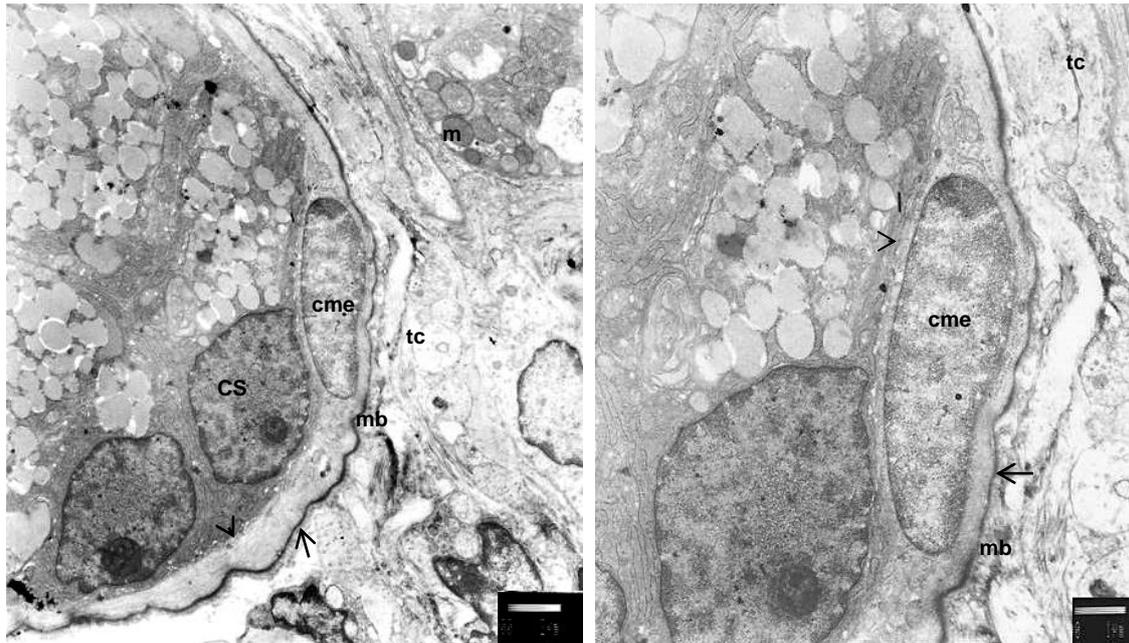


Figura 10. Ultraestructura de las porciones secretoras de la glándula submandibular de *A. jamaicensis*. (a) porciones secretoras o acinos donde se observan células secretoras de contenido electrodenso, prolongaciones celulares de células mioepiteliales y otros componentes del tejido conjuntivo; (b) fotografía a mayor aumento donde se observan las células secretoras llenas de gránulos electrodensos; una célula mioepitelial rodeando la porción secretora ubicada por debajo de la membrana basal, se observan los hemidesmosomas y desmosomas. Acinos (a); células mioepiteliales (cme); tejido conjuntivo (tc); membrana basal (mb); aparato de golgi (ag); retículo endoplásmico rugoso (rer); hemidesmosomas (flechas); desmosomas (punta de flecha).

8.3.3 Glándula sublingual

A nivel ultraestructural se observan acinos con células secretoras que constan de células secretoras piramidales bien delimitadas con núcleo basal y gránulos de secreción con material electrodenso en su interior (Fig.11). Hay presencia de prolongaciones citoplasmáticas de células mioepiteliales observadas como regiones claras bien delimitadas debajo de la membrana basal y separadas del citoplasma de las células secretoras. A mayor aumento es reconocible la membrana basal que rodea tanto a las CME como a la células secretoras acinares, de igual forma son visibles hemidesmosomas que unen a las CME con la membrana basal y desmosomas que las unen con las secretoras. También se observa el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso en células secretoras relacionadas a las CME (Fig.11b).

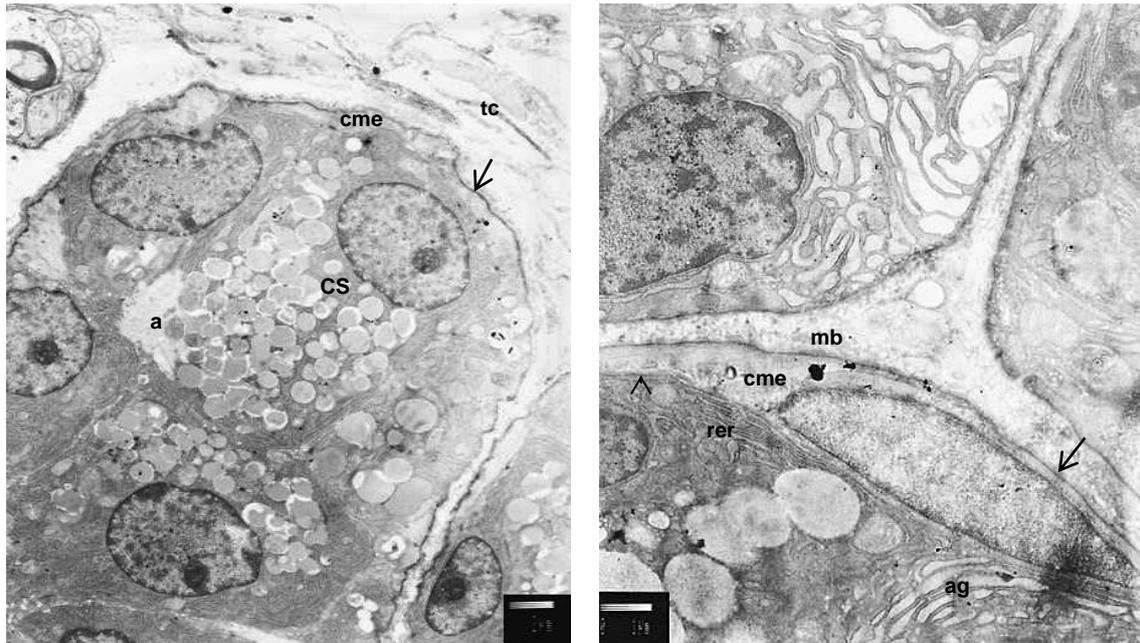


Figura 11. Ultraestructura de las porciones secretoras de la glándula submandibular de *A. jamaicensis*. (a) porciones secretoras o acinos donde se observan células secretoras de contenido moderadamente electrodenso, células mioepiteliales y otros componentes de los tabiques de tejido conjuntivo entre los acinos; (b) fotografía a mayor aumento donde se observan las células secretoras llenas de gránulos levemente electrodensos; una célula mioepitelial rodeando la porción secretora por debajo de la membrana basal, se observan los hemidesmosomas y desmosomas. Acinos (a); células mioepiteliales (cme); tejido conjuntivo (tc); membrana basal (mb); hemidesmosomas (flechas); desmosomas (punta de flecha).

8.4 Patrón de expresión de los marcadores de células mioepiteliales

8.4.1 Glándula parótida

Las tres proteínas utilizadas como marcadores de células mioepiteliales (K14, SMA α y desmina) fueron detectadas en todas las glándulas salivales mayores del *A. jamaicensis*. En la parótida están presentes en todos los componentes del parénquima, logrando identificar las células mioepiteliales en las porciones secretoras y ductales, a excepción de los conductos excretores en los que se puede observar cierto grado de marca positiva en células que morfológicamente corresponden a células basales del epitelio ductal (Fig 12). K14 fue identificada en el epitelio de estos conductos excretores, reconociéndose como marca cruzada con células epiteliales de los mismos (Fig 12a, b). SMA α fue observada marcando células mioepiteliales y capa muscular de vasos de grueso calibre, encontrándose únicamente en estas células (Fig 12c, d). La localización de la proteína desmina fue similar en lo que respecta a las células mioepiteliales, aunque fue observada en algunas áreas de tejido

conjuntivo. Las células mioepiteliales se observan como células aplanadas de núcleo ovalado con extensiones citoplasmáticas alrededor de las porciones secretoras y conductos (Fig12).

8.4.2 Glándula submandibular

En la glándula submandibular existe marca positiva en todos los componentes parenquimatosos (Fig 13). El patrón de expresión de K14, SMA α , y desmina es similar al observado en la parótida, ubicándose la marca alrededor de las estructuras parenquimatosas. K14 marca también algunas células epiteliales de los conductos (Fig 13a), mientras que SMA α se detecta en la capa muscular de algunos vasos) y desmina en algunos componentes del tejido conjuntivo. La proteína desmina es observada en el citoplasma que rodea al núcleo, sin embargo sólo algunas prolongaciones citoplásmicas son visibles (Fig 13). A mayor aumento es posible observar con los tres marcadores las prolongaciones citoplásmicas de las células mioepiteliales que rodean a los acinos y semilunas, así como a los conductos estriados. Esta marca resulto mucho más evidentes que la observada en la glándula parótida (Fig 13b,d,f). Las células mioepiteliales son identificadas como células con citoplasma alargado, núcleo ovalado y prolongaciones citotoplásmicas envolviendo a las semilunas y rodeando a los acinos y conductos.

8.4.3 Glándula sublingual

La glándula sublingual es positiva a los anticuerpos contra K14, SMA α y desmina en todos los componentes glandulares. El patrón de expresión en esta glándula, como en las anteriores, no se limita a las células mioepiteliales, todos los anticuerpos marcan también células fuera de los componentes de la silaona (Fig 14a,c,e). El anticuerpo contra desmina es positivo en los cuerpos celulares, sin embargo esta reactividad es menor en las prolongaciones citoplásmicas. La expresión en los conductos excretores se observó cruzada con las células del epitelio ductal y las características morfológicas detectadas con azul de toluidina asemejan a las características de las células mioepiteliales. Sin embargo, las características identificadas con MET las descartan como células mioepiteliales y las identifican como células epiteliales

basales (Fig 14b,d,f). Es posible identificar a las células mioepiteliales por sus prolongaciones celulares rodeando acinos y conductos y presentan núcleos ovales.

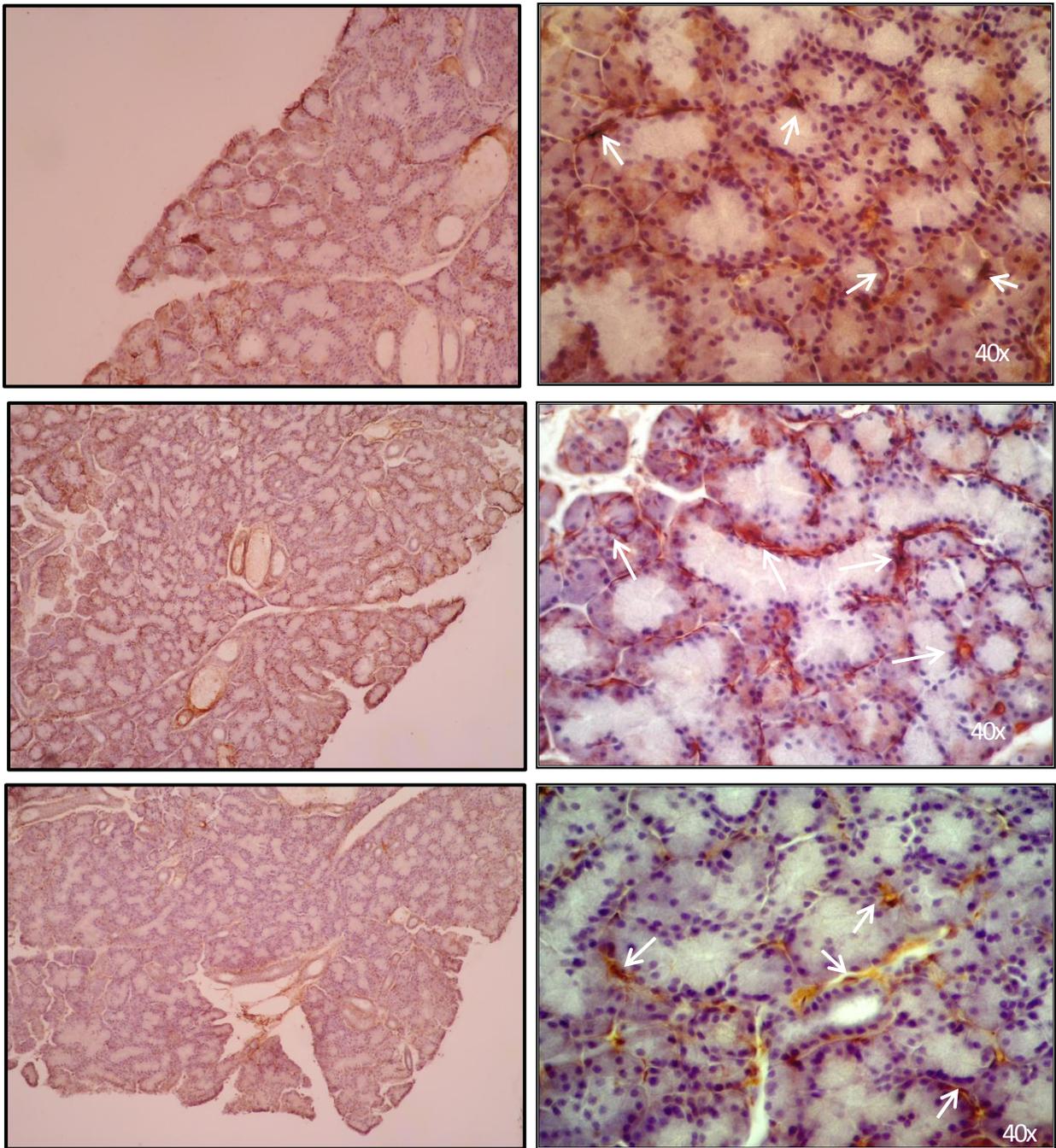


Figura 12. Localización células mioepiteliales en la glándula parótida de *A. jamaicensis*. (a,b) Marca positiva a K14; (a) marca tanto en acinos como en el sistema ductal, se observan algunos conductos excretores marcados; (b) micrografía a mayor aumento donde se identifican las células mioepiteliales rodeando acinos, tubulos secretores y conductos estriados. (c,d) Marca positiva a SMA α ; (c) se observa marca en porciones secretoras y ductales así como algunos vasos de grueso calibre. (d) Fotografía a mayor aumento donde se identifican células mioepiteliales rodeando porciones secretoras y conductos estriados. (e,f) Marcaje positivo de la proteína desmina; (e) marca positiva en porciones secretoras y ciertas regiones de tejido conjuntivo; (f) micrografía a mayor aumento en la que se observan las células mioepiteliales positivas a desmina rodeando conductos y porciones secretoras. Acinos (a); túbulos secretores (ts); conductos estriados (ce); conductos excretores (cex); células mioepiteliales (flechas). Figuras a, c, e aumento 10x; figuras b, d, e aumento 40x

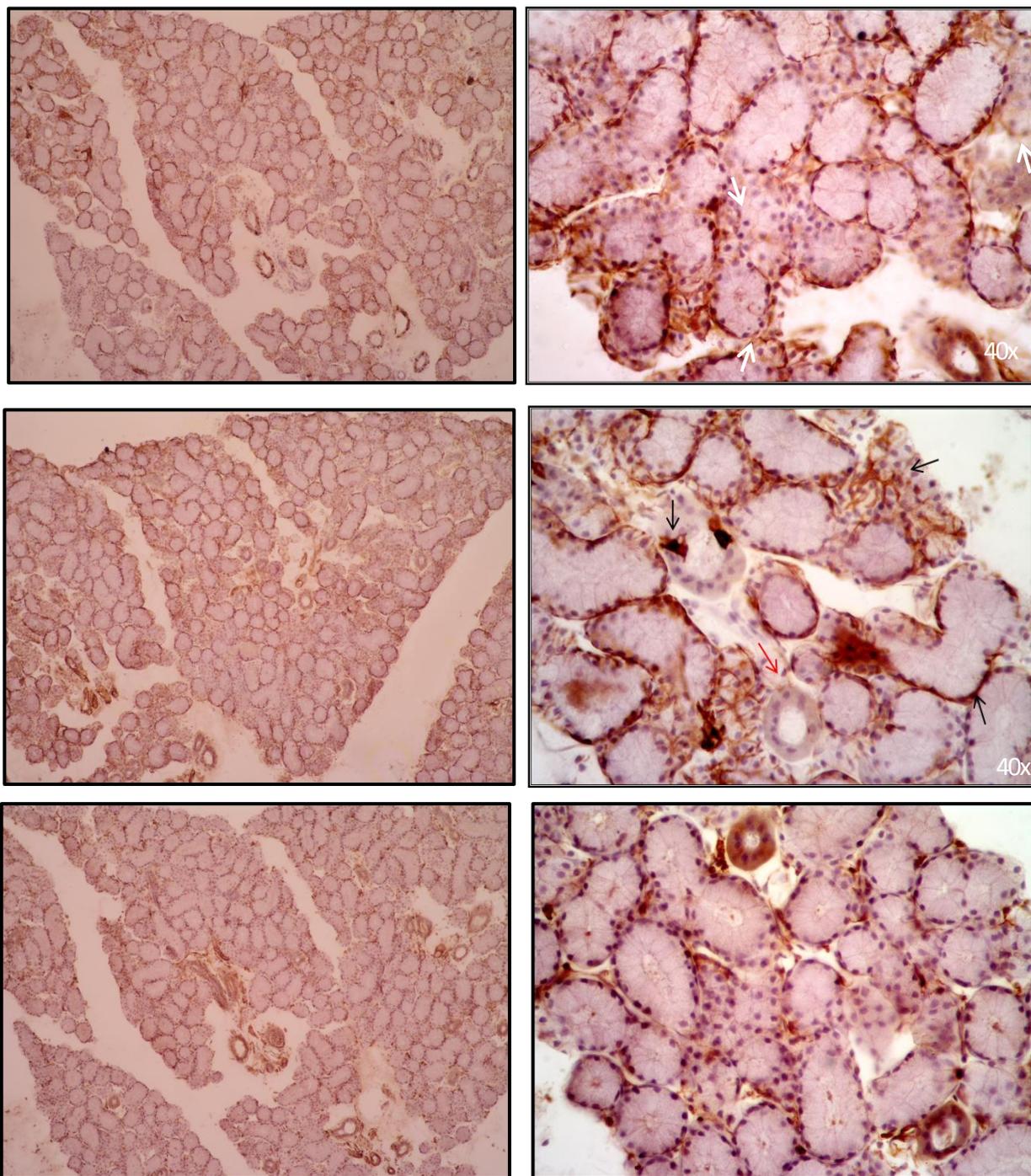


Figura 13. Localización células mioepiteliales en la glándula submandibular de *A. jamaicensis*. (a,b) Marca positiva a K14; (a) marca tanto en acinos como en el sistema ductal, se observan algunos conductos excretores marcados; (b) micrografía a mayor aumento donde se identifican las células mioepiteliales rodeando a las semilunas de los acinos y conductos estriados. (c,d) Marca positiva a SMA α ; (c) se observa marca en porciones secretoras y ductales así como algunos vasos de grueso calibre. (d) Fotografía a mayor aumento donde se identifican células mioepiteliales rodeando porciones secretoras y conductos estriados. (e,f) Marcaje positivo de la proteína desmina; (e) marca positiva en porciones secretoras y ciertas regiones de tejido conjuntivo; (f) micrografía a mayor aumento en la que se observan las células mioepiteliales positivas a desmina rodeando conductos y porciones secretoras, nótese la menor cantidad de prolongaciones citoplásmicas positivas respecto a los otros marcadores. Acinos (a); túbulos secretores (ts); conductos estriados (ce); conductos excretores (cex); células mioepiteliales (flechas). Figuras a, c, e aumento 10x; figuras b, d, e aumento 40x

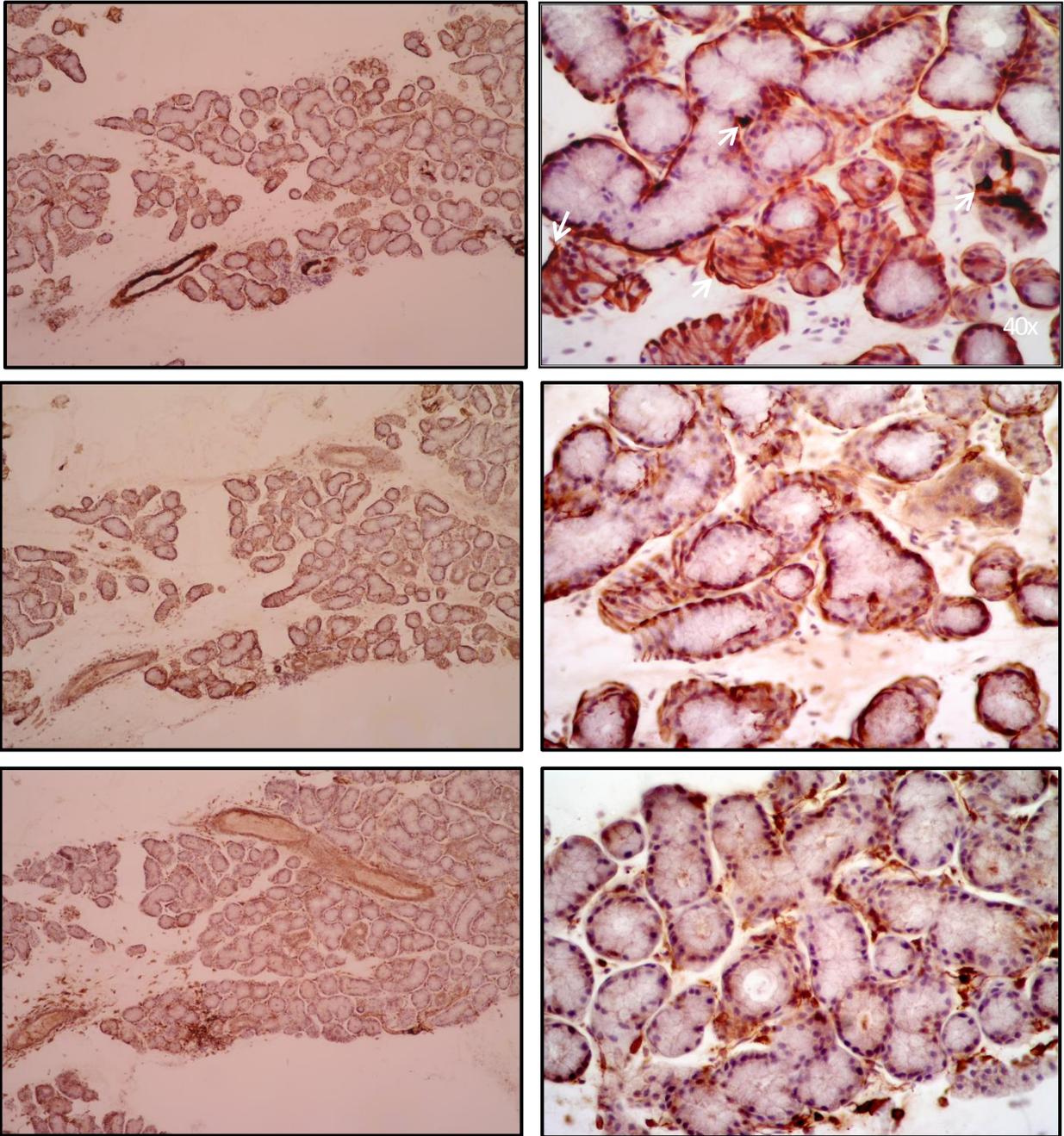


Figura 14. Localización células mioepiteliales en la glándula sublingual de *A. jamaicensis*. (a,b) Marca positiva a K14; (a) marca positiva en acinos y sistema ductal, se observan algunos conductos excretores marcados; (b) micrografía a mayor aumento donde se identifican las células mioepiteliales rodeando acinos y conductos estriados. (c,d) Marca positiva a SMA α ; (c) se observa marca en porciones secretoras y ductales así como algunos vasos. (d) Fotografía a mayor aumento donde se identifican células mioepiteliales rodeando porciones secretoras y conductos estriados. (e,f) Marcaje positivo de la proteína desmina; (e) marca positiva en porciones secretoras y ciertas regiones de tejido conjuntivo; (f) micrografía a mayor aumento en la que se observan las células mioepiteliales positivas a desmina en el citoplasma que rodea su núcleo y menor cantidad de prolongaciones citoplásmicas positivas a la proteína. Acinos (a); túbulos secretores (ts); conductos estriados (ce); conductos excretores (cex); células mioepiteliales (flechas). Figuras a, c, e aumento 10x; figuras b, d, e aumento 40x

Con base a nuestros resultados anteriormente descritos, se decidió utilizar los marcadores K14 y SMA α para localizar con mayor especificidad a las células mioepiteliales dado que estos aparecen positivos tanto en los cuerpos celulares como en las prolongaciones citoplásmicas. Se utilizó inmunofluorescencia doble para este propósito, utilizando los marcadores fluorescentes Cy3 (rojo) para K14 y Cy5 (azul) para SMA α .

En las tres glándulas de encontraron las mismas características descritas para la técnica de inmunohistoquímica. Fue confirmada la localización de las células mioepiteliales con ambas proteínas al colocalizar ambos fluoróforos (Cy3 y Cy5) dando como resultado un pseudocolor rosa. Esto permitió confirmar la presencia de las CME en porciones secretoras y túbulos estriados (Figs. 15, 16 y 17).

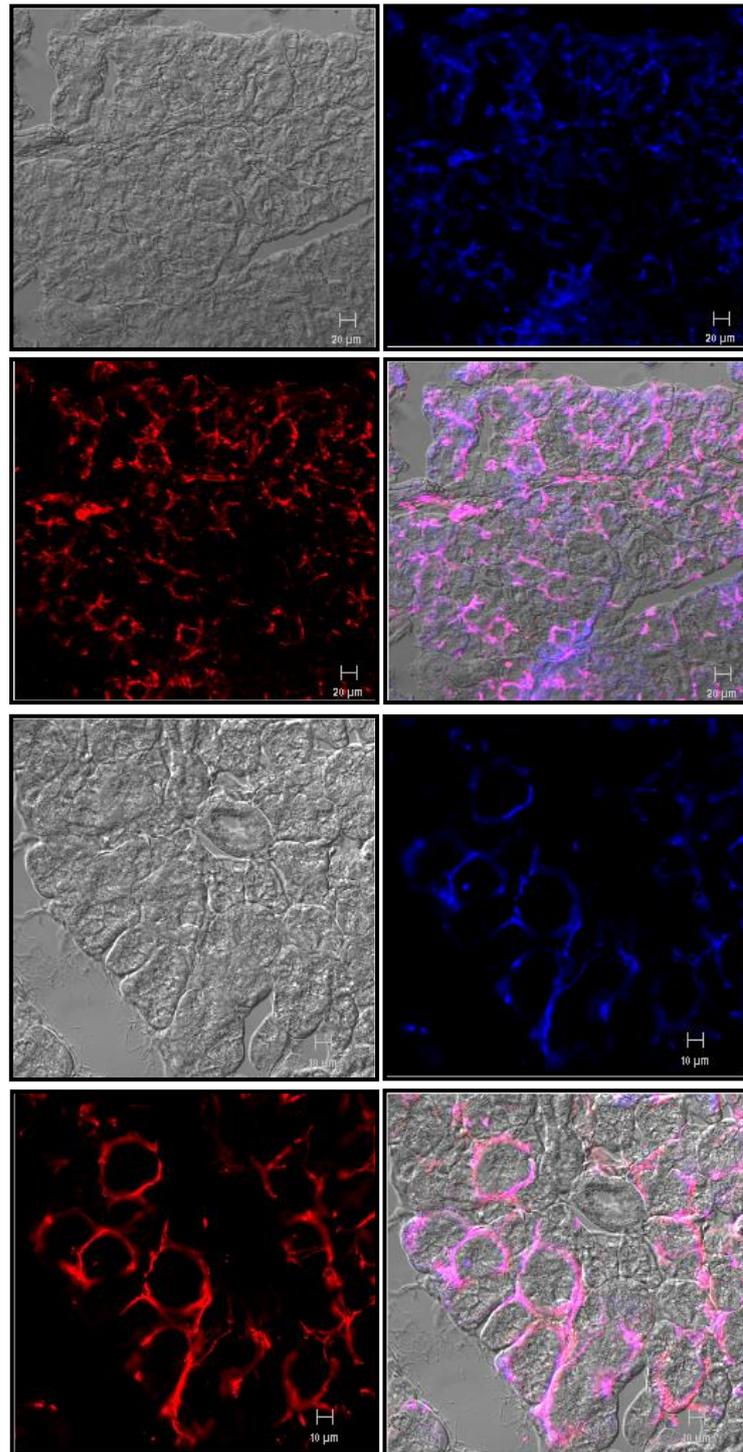


Figura 15. Inmunofluorescencia de glándula parótida utilizando los fluoróforos Cy5 y Cy3. (a-d) micrografía a bajo aumento. (a) técnica de Nomarski donde se observa la disposición general de la glándula; (b) Cy3 (rojo) marcando SMA α ; (c) Cy5 (azul) marcando K14; (d) colocalización de ambas proteínas, al ser citoplásmicas la superposición de fluorescencia roja y azul da un color rosado en las células mioepiteliales. (e-h) fotomicrografías a mayor aumento. (e) técnica de Nomarski donde se observa la disposición general de la glándula; (f) Cy3 (rojo) marcando SMA α ; (g) Cy5 (azul) marcando K14; (h) colocalización de ambas proteínas.

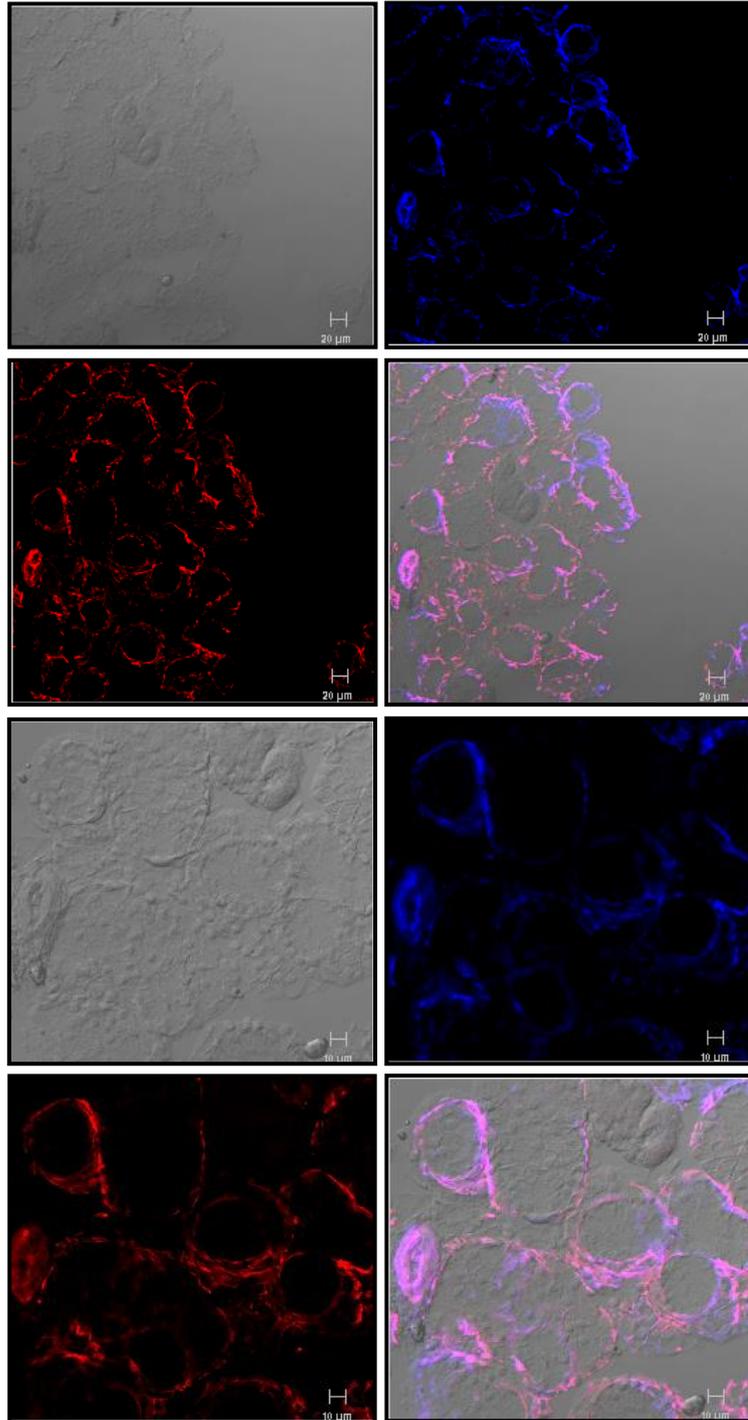


Figura 16. Inmunofluorescencia de la glándula submandibular utilizando Cy5 y Cy3. (a-d) micrografía a bajo aumento. (a) técnica de Nomarski; (b) Cy3 (rojo) marcando SMA α ; (c) Cy5 (azul) marcando K14; (d) colocalización de SMA α y K14 en las células mioepiteliales. (e-h) fotomicrografías a mayor aumento de las figuras a-d.

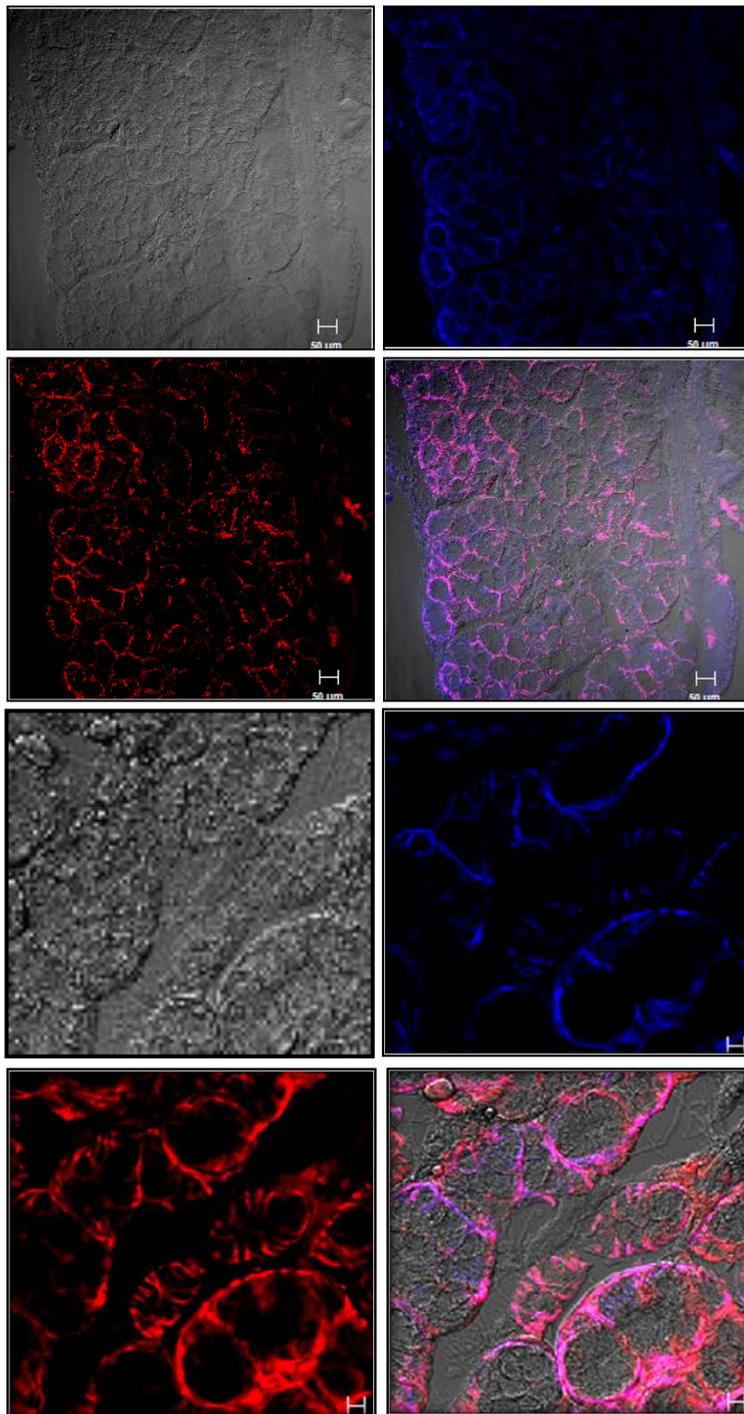


Figura 17. Inmunofluorescencia de glándula sublingual utilizando Cy5 y Cy3. (a-d) micrografía a bajo aumento. (a) técnica de Nomarski; (b) Cy3 (rojo) marcando SMA α ; (c) Cy5 (azul) marcando K14; (d) colocalización de ambas proteínas en las células mioepiteliales. (e-h) fotomicrografías a mayor aumento.

8.5 Amplificación de los fragmentos de ARNm de ACTA2, K14 y Des

Para lograrlo, primero fue realizada la extracción de RNA total de las tres glándulas salivales mayores del *A. jamaicensis* observándose mayor intensidad en las bandas 18S y 28S de la glándula parótida que en las bandas obtenidas de la glándula submandibular y sublingual, lo cual corresponde a la mayor cantidad de ARNr extraído de esta glándula (Fig. 14).

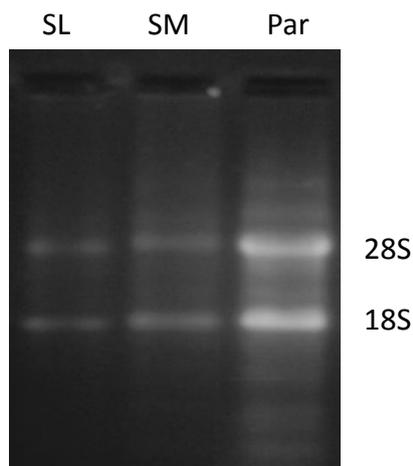


Figura 18. Gel de agarosa que muestra la presencia de las subunidades 28S y 18S del ARNr de la glándula parótida (Par), submandibular (SM) y sublingual (SL).

Para realizar la amplificación del ARN mensajero de las proteínas K14, SMA α y desmina se utilizó la técnica de reacción en cadena de polimerasa–transcriptasa reversa (RT-PCR) a un solo paso utilizando oligonucleótidos específicos para los genes correspondientes a las tres proteínas. Los resultados fueron positivos para todos los oligonucleótidos (Krt 14 para K14, ACTA2 para SMA α y DES para desmina) en todas las glándulas salivales. Se detectaron bandas más intensas en la glándula parótida y menos intensas en la glándula sublingual, la glándula submandibular presenta bandas de intensidad intermedia. La banda para el gen ACTA2 presento un peso de 150 pares de bases (pb), para Krt14 y DES fue de 200 pb, mientras que para el control positivo ACTA1 fue de 240 pb. A demás se utilizó un control negativo sin ARNm para corroborar que no existe contaminación de las muestras (Fig 19).

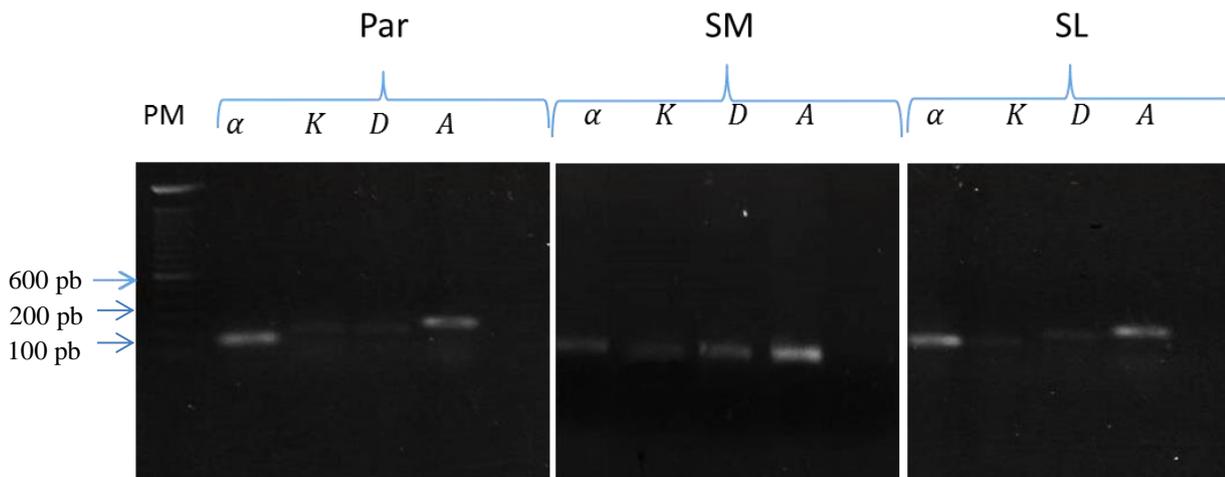


Figura 19. RT-PCR de muestras de glándula parótida (Par), submandibular (SM) y sublingual (SL). Se observan bandas de alrededor de 150 pares de bases (pb) para el gen ACTA2 (α), 200 pb para los genes Krt14 (K) y Des (D) y una banda de 240 pb para el control positivo ACTA1 (A) de manera similar en las tres glándulas salivales.

8.6 Cuantificación de los niveles de proteína por Western blot

Se realizó la extracción de proteínas de las tres glándulas y se visualizaron posteriormente a la transferencia húmeda en la membrana de nitrocelulosa con rojo Coomasie (Fig. 20).

Al realizar el Western blot se lograron visualizar las tres proteínas en las tres glándulas salivales mayores, siendo desmina la proteína presente en menor cantidad. En las tres glándulas salivales se encontraron bandas positivas a SMA α de 42kD, positivas a K14 de 52kD, y positivas a desmina de 53kD (Fig. 21).

Se realizó una semicuantificación de las proteínas utilizando el western blot con los resultados enlistados en la tabla 3. Esta fue elaborada conociendo la cantidad de pixeles en las bandas encontradas en el western blot y se comparó la cuantificación de pixeles de la proteína de mayor concentración con las dos de menor concentración en cada glándula. Los resultados de la proteína más concentrada se dividieron entre cada una de las otras proteínas para conocer

cuántas veces está más concentrada que las otras dos. Encontramos que la proteína SMA α es la que se encuentra en mayor concentración, lo que está en concordancia con las observaciones en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.



Figura 20. Observación de proteínas totales de las tres glándulas salivales en la membrana de nitrocelulosa teñidas con rojo Coomasie. (P) glándula parótida, (SM) glándula submandibular, (SL) glándula sublingual.

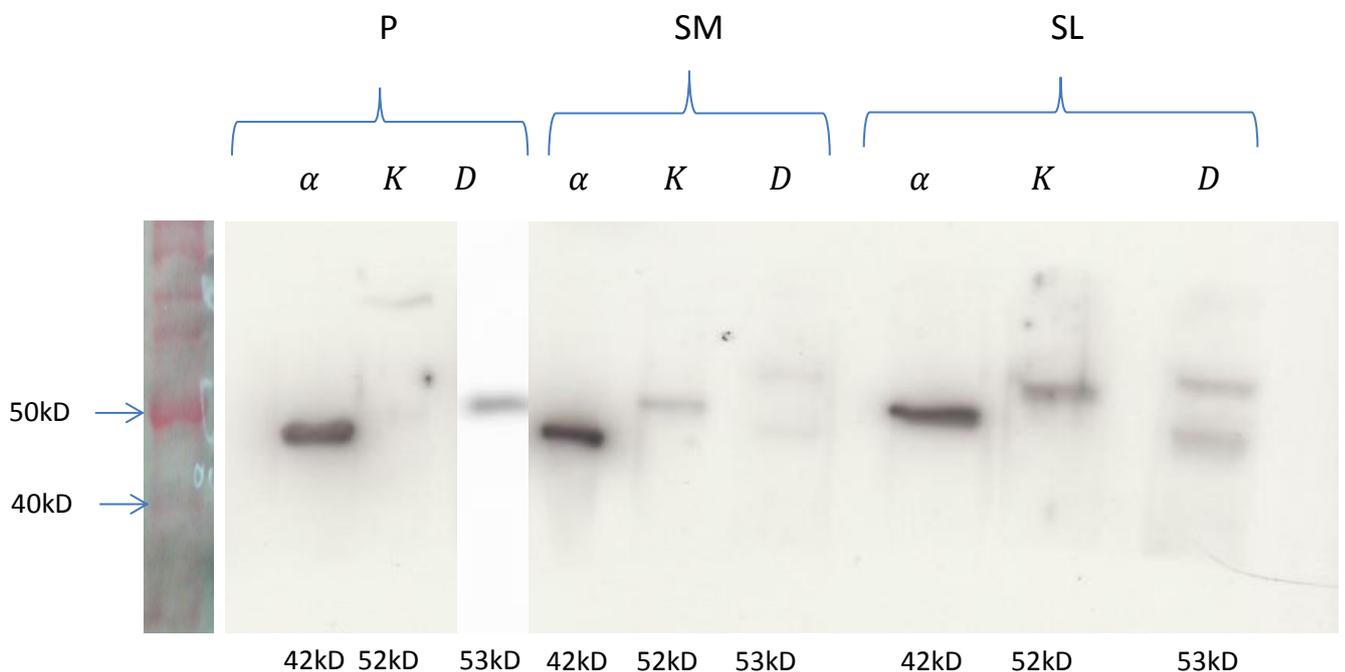


Figura 21. Western blot de las proteínas SMA α , K14 y desmina en las tres glándulas salivales. (P) glándula parótida, (SM) glándula submandibular, (SL) glándula sublingual, (α) SMA α , (K) K14, (D) desmina.

	Ab	P	C
	SMA α	3190	1
P	K14	992	3,21572581
	D	756	4,21957672
	SMA α	3186	1,00125549
SM	K14	837	3,81123059
	D	580	5,5
	SMA α	3724	0,8566058
SL	K14	1500	2,12666667
	D	510	6,25490196

Tabla 6. Semicuantificación de proteínas utilizando el Western blot de las tres glándulas salivales. (P) glándula parótida, (SM) glándula submandibular, (SL) glándula sublingual, (α) SMA α , (K) K14, (D) desmina, (Ab) anticuerpo, (P) pixelaje, (C) comparación.

9. DISCUSIÓN

Las células mioepiteliales (CME) están ampliamente distribuidas y presentes en la mayoría de las glándulas exócrinas, considerándose un componente esencial en la función de la expulsión de las sustancias producidas y previniendo el daño al parénquima por su acumulación. En las glándulas salivales, las CME se encuentran rodeando las estructuras secretoras, las primeras porciones de los sistemas de conductos o ambos, por lo que es de suponer que su función sea similar (Redman, 1994).

En algunas glándulas como la parótida de la rata, las células mioepiteliales se encuentran únicamente en el sistema de conductos, desde los intercalares hasta los estriados, sin embargo en ratas jóvenes estas células si son reconocibles en las porciones secretoras, disminuyendo su número hacia la edad adulta. Esto es atribuible a un cambio en el tipo de secreción y el número de gránulos secretores encontrados en los acinos, por lo que la presencia o ausencia de las CME puede relacionarse con estas variables. El inicio de producción de saliva serosa en la glándula parótida coincide con la desaparición de las CME en los acinos de esta glándula (Ogawa, 2010). Esto es corroborado por estudios en cabras que donde también relacionan la forma de las CME y su cantidad con el tipo secretor de cada glándula (Elewa, 2010).

En esta investigación se realizó un estudio exhaustivo de las características de las células mioepiteliales de las glándulas salivales mayores del murciélago *A. jamaicensis*, primero identificando cada glándula anatómicamente e histológicamente y posteriormente el tipo secretor de cada una de ellas. Así mismo las CME fueron descritas ultraestructuralmente y localizadas utilizando marcadores inmunohistoquímicos, los cuales fueron cuantificados con diferentes técnicas para encontrar el marcador más útil para las mismas.

En cuanto a su localización anatómica y comparándola con las tres especies mejor estudiadas (humanos, ratón y rata), las glándulas parótida, sublingual y submandibular son muy similares a las del ser humano.

La glándula parótida de *A. jamaicensis*, semejante a lo descrito en humanos (Rouvier y Delmas 2005), se encuentra ubicada por delante del oído externo extendiéndose hasta el cuello. Se ubica profunda a la piel de la región masetérica, que se ubica en la parte posterior de la mejilla y está limitada por arriba por el arco cigomático, anteriormente por el borde anterior del músculo

masetero, posteriormente por el borde posterior de la rama de la mandíbula e inferiormente por el espacio entre los límites anterior y posterior. Descansa sobre la cara externa del músculo masetero, extendiéndose por debajo del borde de la mandíbula hacia la línea media. Profunda en la parótida entre dos lóbulos se encuentra la arteria carótida externa.

La glándula submandibular es de forma piramidal, se encuentra adherida a la cara medial del cuerpo de la mandíbula, sobre la fosa submandibular, una depresión en el tercio posterior del cuerpo de la mandíbula. En la región media y anterior contacta con el músculo milohioideo. Comunica con la región submandibular medialmente al borde posterior del milohioideo. Su borde inferior sobrepasa el asta mayor del hueso hioides. Se ubica profunda a la piel de la región hioidea y está cubierta por una fascia, donde se extiende posteriormente hasta el ángulo de la misma.

La glándula sublingual es de forma aplanada transversalmente y alargada. Lateralmente se ubica en la fosa sublingual del cuerpo de la mandíbula y se ubica en la cara inferior de la parte anterior del músculo milohioideo y profunda a la piel de la región cercana a la sínfisis mandibular. Medialmente está en contacto con la masa muscular de la lengua. Anteriormente se prolonga hasta la línea media pudiendo estar en contacto con la glándula sublingual contralateral, similar a lo descrito en humanos (Rouviere y Delmas 2005). Sin embargo, la mayor diferencia visible entre estas especies se encuentra precisamente en las glándulas sublinguales. *A. jamaicensis* presenta una única glándula que se extiende hasta la línea media llegando a unirse con su homóloga contralateral; en contraste, en el ser humano las glándulas sublinguales normalmente pueden encontrarse como una glándula principal y varias de menor tamaño o como un conjunto de pequeñas glándulas distribuidas a lo largo de su conducto excretor en la submucosa de la región anterior del piso de la boca (Rouvier y Delmas, 2005).

A nivel estructural, nuestros estudios histológicos empleando microscopía de campo claro en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina muestran que la glándula parótida del murciélago *A. jamaicensis* está conformada por estructuras acinares y tubulares, sin semilunas, lo cual la hace diferente de las especies mencionadas anteriormente cuyas porciones secretoras son acinares serosas. Las porciones secretoras de forma acinar presentan secreción, según

los criterios de Tandler de 1993, de tipo seromucoso, mientras que las de forma tubular presentan gránulos de secreción de tipo seroso, por lo tanto se considera mixta. La glándula submandibular fue clasificada como de secreción mucosa con semilunas mucosas, similar a lo reportado en algunos carnívoros (Dobrosielzki, 1989). La glándula submandibular se identificó como glándula de secreción de tipo seromucosa, en contraste con lo reportado en humanos donde se ha catalogado como mixta (Dobrosielzki 1989, Redman, 1994).

Las células mioepiteliales fueron localizadas en todas las porciones secretoras no importando el tipo secretor, de la misma manera se lograron identificar en los conductos estriados. En la glándula submandibular fue posible ubicar conductos intercalares, corroborando la presencia de CME rodeándolos. Debido a su pequeño calibre y corta longitud, los conductos intercalares no fueron fáciles de localizar en la glándula parótida ni en la sublingual, sin embargo y tomando en cuenta que corresponden a la primera porción del sistema de conductos, asumimos la presencia de las CME rodeando a los conductos intercalares en todas las glándulas salivales. En los conductos excretores de la glándula sublingual se observaron células con morfología similar a la de las CME, sin embargo no obtuvimos colocalización al utilizar los marcadores SMA α y K14, lo que sugiere que pueden ser células basales tipo 1, descritas por Chaudhry et al. en 1987 como células basales que imitan la topografía y estructura fina de células mioepiteliales.

Al no existir acinos puramente serosos en ninguna de las tres glándulas salivales principales en el *A. jamaicensis*, concluimos que la presencia de las CME en todos los acinos y parte del sistema de conductos puede ser atribuible a que la saliva en las glándulas seromucosas y mucosas es de características más viscosas que la secretada por células serosas. La secreción más fluida no sería necesaria para el soporte de las CME de acuerdo a las observaciones sobre el desarrollo de las glándulas salivales de rata realizadas por Ogawa en 2010.

Para corroborar la presencia de las CME, se utilizaron métodos inmunohistoquímicos con los marcadores K14, SMA α y desmina, con los que se pudo verificar la misma distribución observada empleando microscopía de campo claro. Así mismo, se pudieron detectar diferencias en la morfología de las células mioepiteliales entre las glándulas salivales mayores de *A.*

jamaicensis. Estas diferencias son notables en la cantidad y distribución de las prolongaciones citoplásmicas observadas en los cortes realizados con inmunohistoquímica apareciendo en menor cantidad en la glándula parótida, cuya secreción es mixta (seromucosa/serosa), y en mayor cantidad rodeando acinos y conductos de la glándula sublingual, semilunas y conductos de las glándulas submandibular y sublingual. Esto parece estar en concordancia con la afirmación de que las CME presentan mayor cantidad de prolongaciones citoplásmicas en las glándulas salivales con secreción mucosa, así como una mayor cantidad de gránulos secretores (Elewa, 2010; Hata et al, 2010).

Debido a que no existe un marcador que únicamente identifique células mioepiteliales, realizamos inmunofluorescencia doble para lograr ubicar mediante colocalización los anticuerpos contra K14 y SMA α . De esta manera logramos confirmar la distribución observada con la tinción de azul de toluidina y la inmunohistoquímica, descartando positivos de células epiteliales de los conductos y de células musculares de vasos sanguíneos.

Para verificar no únicamente la presencia de la proteína, sino también del ARNm que la codifica, se utilizó la técnica de RT-PCR. Con esto pudimos confirmar que los genes ACTA2 (SMA α), Krt14 (K14) y DES (desmina) están presentes y transcribiéndose constantemente. El gen con mayor cantidad de ARNm en las CME es ACTA2, seguido por Krt14 y DES, en ese orden. Esto puede sugerir una mayor transcripción del gen ACTA2 en relación con los otros dos.

La cuantificación de proteínas utilizando la técnica de Western blot arrojó resultados similares, resultando SMA α la proteína más numerosa seguida de K14 y Desmina por último. Estos resultados concuerdan con los del RT-PCR. Si tomamos en cuenta lo mencionado por Redman (1994) y Elewa (2010), quienes afirman que, además de la contracción, las células mioepiteliales funcionan también dando sostén y protección al parénquima, la ubicación de las proteínas estudiadas podría estar relacionada con estas funciones. La proteína desmina fue la proteína cuantificada en menor cantidad y la menos observada en las prolongaciones citoplásmicas. SMA α y K14 marcaron intensamente a las CME, tanto en sus cuerpos celulares como en sus prolongaciones y fueron las encontradas en mayor cantidad en el Western blot. La función de contractilidad está dada por SMA α , proteína contráctil de células

musculares lisas (Redman 1994), mientras que probablemente la proteína K14, filamento intermedio de células epiteliales que proporciona resistencia a las células (Pan et al, 2012), otorgue capacidad de sostén a las CME.

Por otro lado existen autores que mencionan la posibilidad de que las CME disminuyan la posibilidad de invasión de células tumorales a tejidos circundantes en glándulas con tumores activos. Por ejemplo, en el cáncer de mama se evalúa la integridad de la capa de CME para determinar si existe invasión o no de los tumores malignos (Sánchez-Céspedes et al., 2011). Esto puede deberse a que pueden constituir un obstáculo más entre las células tumorales y la membrana basal, a la que tienen que superar. También existe evidencia de que producen factores que favorecen la apoptosis en células tumorales y que antagonizan las interacciones tumor-estroma (Pandey, et al. 2011). Las CME de las glándulas salivales poseen las mismas características estructurales tanto en *A. jamaicensis* como en otras especies, por lo que podrían contribuir de la misma manera a evitar o retrasar el crecimiento o invasión de tumores en las glándulas salivales.

Haciendo una analogía entre los marcadores utilizados en este estudio y los marcadores comúnmente utilizados en el estudio de las células mioepiteliales en enfermedades tumorales, podemos sugerir que el mejor marcador de éstas células es la SMA α , aunque actualmente se utilizan otros marcadores útiles, pero que también carecen de especificidad como podoplanina (Hata, 2010), S100 (Ogawa, 1999) y p63 (Pandey, et al., 2011). En el mismo sentido, también existen algunos otros como actina de músculo esquelético que se ha comprobado que en glándulas salivales es específica de CME, sin embargo hasta el momento no tenemos conocimiento de haber sido utilizada en humanos o procesos tumorales originados en éstas células (Nashida, 2013).

10. CONCLUSIONES

1. Las glándulas salivales mayores (parótida, sublingual y submandibular) del murciélago frugívoro *Artibeus jamaicensis* se localizaron anatómicamente similar a como se ubican en el ser humano, con algunas diferencias en sus relaciones anatómicas y morfología macroscópica.
2. En el murciélago *Artibeus jamaicensis*, la glándula parótida presenta características morfológicas de una glándula de secreción mixta, mientras que las glándulas submandibular y sublingual se identificaron como de tipo mucoso y seromucoso respectivamente.
3. A nivel estructural se observó que las CME localizadas en los tres tipos de glándulas salivales mayores en *A. jamaicensis* es similar a la morfología descrita en las glándulas mayores de otras especies como el humano y el ratón. Sin embargo, a nivel ultraestructural se detectaron diferencias en la conformación de estas CME. Mientras que en la glándula parótida se observan los núcleos celulares y los cuerpos de forma aplanada con prolongaciones citoplásmicas que envuelven acinos y conductos, en las glándulas submandibular y sublingual es posible observar como las CME presentan un gran número de prolongaciones citoplásmicas que parecen formar una red que envuelve a las porciones secretoras y a los conductos en los que están presentes.
4. Los marcadores SMA α , K14 y desmina resultaron positivos en las CME que componen las tres glándulas mayores de *A. jamaicensis*. De esta manera, las CME se pudieron ubicar tanto en las porciones secretoras como en las primeras porciones del sistema de conductos (conductos intercalares y estriados).
5. La expresión de los genes ACTA2, K14 y DES fue confirmada mediante RT-PCR indicando que los tres genes están presentes en las CME de las tres glándulas aunque en mayor cantidad en la glándula parótida que en la submandibular y sublingual, esto en concordancia con su mayor volumen. De igual forma mediante la técnica de western blot se pudo confirmar la presencia de las proteínas SMA α , K14 y desmina.

11. PERSPECTIVAS

La presencia de células mioepiteliales (CME) en todos los componentes de la unidad funcional salival (sialona) de las tres glándulas salivales mayores del murciélago *A. jamaicensis*), excepto en los conductos excretores, puede llevarnos a la conclusión de que son células indispensables para la correcta función de las glándulas salivales no importando de que tipo secretor se trate. Sin embargo, la mayor cantidad de prolongaciones celulares encontradas en la glándulas sublingual y submandibular puede demostrar que el tipo de secreción si influye en la morfología de las CME.

Para dilucidar exactamente que función cumple cada proteína analizada es necesario realizar estudios de proteómica buscando relaciones entre proteínas del citoesqueleto y contráctiles y cómo reaccionan las proteínas de refuerzo como K14 al momento de la contracción de las proteínas musculares. A sí mismo, deberán realizarse estudios *in vitro* e *in vivo* realizando knock-outs o knock-downs para establecer claramente la función de cada proteína tanto en las células mioepiteliales en condiciones normales como en células mioepiteliales en tumores de origen salival.

De la misma forma, es necesario realizar secuenciaciones tanto de los genes ACTA2, KRT14 y Des, como de las proteínas que codifican (SMA α , K14 y desmina) para obtener las secuencias exactas de los mismos y poder comparar filogenéticamente lo encontrado en *A. jamaicensis* con las especies más relacionadas, y así obtener una mayor perspectiva tanto de la función como de la evolución de las CME.

13. REFERENCIAS

- ALTIGRAM John. Bats: From Evolution to Conservation. 2nd Edition. Oxford University Press. Great Britain. 2011
- ORTEGA Jorge and Castro-Arellano Iván. *Artibeus jamaicensis*. American Society of Mammalogists 662: 2-9; June 2001
- ZUBAID Akbar, McCracken Gary and Kunz Thomas. Functional and Evolutionary Ecology of Bats. Oxford University Press. New York, U.S.A. 2006
- DOBROSIELSKI-VERGONA, Kathleen. Biology of the Salivary Glands. CRC Press. Florida, U.S.A. 1993
- GÓMEZ DE FERRARIS, María E., Campos Muñoz, A. histología y Embriología Bucodental. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2005
- GARTNER, Leslie P., Hiatt, James L. Texto y Atlas de Histología. 2ª Edición. McGraw-Hill. México D.F. 2002
- BAGÁN Sebastián, José Vicente; et all. Medicina Oral. Masson, S.A. Madrid, España. 2002.
- JUNQEIRA Luiz C., Carneiro José. Histología Básica Texto y Atlas. Tejido Conjuntivo. 6a edición. Pp 99. Masson. México 2005
- TANDLER, B; Philips, Carleton J. Structure of Serous Cells in Salivary Glands. MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE 26:32-48 (1993)
- TANDLER, Bernard. Structure of Mucus Cells in Salivary Glands. Microscopy Research and Technique 26:49-56 (1993)
- HARDY, G.; Kramer, B. The Myoepithelium of Human Salivary Glands Revisted. SADJ. 1998 Jul;53(7):371-5.
- REDMAN, RS. Myoepithelium of Salivary Glands. Microsc Res Tech. 1994 Jan 1;27(1):25-45.
- ELEWA, Yaser Hosny et al. Cytoarchitectural Differences of myoepithelial Cells Among Goat Mayor Salivary Glands. Vet Res Commun (2010) 34:557-567
- IKEDA, R., Aiyama, S., Redman, RS. Exogenous Thyroid Hormone Affects Myoepithelium and Proliferation of the Developing Rat Parotid Gland. Biotech Histochem. 2009 December ; 84(6): 267–274.
- OGAWA, Y. Inmunocytochemistry of Myoepithelial Cells in Salivary Glands. Prog Histochem Cytochem. 2003;38(4):343-426.

HATA, Minoru; et al. Inmuno Electron Microscopy Study of Podoplanin Localization in Mouse Salivary Gland Myoepithelium. *Acta Histochem. Cytochem.* 43 (2): 77–82, 2010.

NAGATO, T; Tandler, B; Phillips, CJ; Ultrastructure of the binary parotid glands in the free-tailed bat, *Tadarida thersites*. I. Principal parotid gland. *Anat Rec.* 1998 May;251(1):114-21.

TANDLER, B; Nagato, T; Phillips, CJ. Ultrastructure of the binary parotid glands in the free-tailed bat, *Tadarida thersites*. II. Accessory parotid gland. *Anat Rec.* 1998 May;251(1):122-35.

TANDLER, B; Phillips, CJ; Nagato, T. Histological convergent evolution of the accessory submandibular glands in four species of frog-eating bats. *Eur J Morphol.* 1996 Aug;34(3):163-8.

TANDLER, B; Toyoshima K; Phillips CJ. Ultrastructure of the principal and accessory submandibular glands of the common vampire bat. *Am J Anat.* 1990 Dec;189(4):303-15.

TANDLER, B; Nagato, T; Phillips, CJ. Ultrastructure of the unusual accessory submandibular gland in the fringe-lipped bat, *Trachops cirrhosus*. *Anat Rec.* 1997 Jun;248(2):164-75.

TANDLER, B; Nagato, T.; Phillips, CJ. Ultrastructure of the parotid salivary glands in seven species of fruit bats in the genus *Artibeus*. *Anat Rec.* 1997 Jun;248(2):176-88.

TANDLER, B; Toyoshima, K; Seta, Y; Phillips, CJ. Ultrastructure of the salivary glands in the midtongue of the common vampire bat, *Desmodus rotundus*. *Anat Rec.* 1997 Oct;249(2):196-205.

TANDLER, Bernanrd. Structure of the Duct System in Mammalian Mayor Salivary Glands. *Microscopy Reasearch and Technique* 26:57-74 (1993)

ROUVIERE, H; Delmas A. *Anatomía Humana Descriptiva, Topográfica y Funcional*; Tomo 1. Cabeza y Cuello. 11ª Ed. Masson

HATA, Minoru; et al. Expression of Podoplanin in Mouse Salivary Glands. *Archives of Oral Biology.* 53(2008) 835-841.

DRAEGER, A; et al. Cytokeratins, smooth muscle actin and vimentin in human normal salivary gland and pleomorphic adenomas. *Immunohistochemical*

studies with particular reference to myoepithelial and basal cells. *APMIS*. 1991 May;99(5):405-15

PAN, Xiaou; Hobbs, Ryan; Coulombe, Pierre A; The Expanding Significance of Keratin Intermediate filaments in Normal and Diseased Epithelia. *Curr Opin Cell Biol*. 2013 February ; 25(1): 47–56.

NASHIDA; et al. Atrophy of Myoepithelial Cells in Parotid Glands of Diabetic Mice; Detection Using Skeletal Muscle Actin, a Novel Marker. *FEBS Open Bio* 3 (2013) 130–134

TSUJIMURA et al. Changes in the Number and Distribution of Myoepithelial Cells in the Rat Parotid Gland During Postnatal Development. *Anat Embryol* (2006) 211: 567–574

HARUNAGA, J et al. Dynamics of Salivary Gland Morphogenesis. *J Dent Res* 2011 90: 1070

HSU, JC; Yamada, KM. Salivary Gland Branching Morphogenesis. Recent Progress and Future Opportunities. *Int J Oral Sci*, 2(3): 117–126, 2010

PINKSTAF, CA. Serous, Seromucous, and Special Serous Cells in Salivary Glands. *Microsc Res Tech*. 1993 Sep 1;26(1):21-31

CHAUDRY, AP. Ultrastructure of Normal Human Parotid Gland with Special Emphasis on Myoepithelial Distribution. *J. Anat.* (1987), 152, pp. 1-11

PANDEY, PR et al. Role of Myoepithelial Cells in Breast Tumor Progression. *Front Biosci.* ; 15: 226–236

IANEZ, RF et al. Human Salivary Gland Morphogenesis: Myoepithelial Cell Maturation Assessed by Immunohistochemical Markers. *Histopathology* 2010, 57, 410–417.

ANEXOS

Anexo 1. Microscopía

- Microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1010).
- Microscopio confocal laser. Scanning Microscope (LSM 5 Pascal, Carl Zeiss). Software versión 3.5 basado en Windows XP compatible con los siguientes tipos de láser:
 - 1 Ar/ML 458/488/514
 - 2 HeNe 543
 - 3 HeNe 633
 - 4 Blue laser diode 405
- Microscopio de campo claro Nikon Eclipse E200, con objetivos de 10x, 20x y 40x

Anexo 2. Soluciones utilizadas para procesamiento de muestras para microscopía.

Microscopía de campo claro

- PBS (Phosphate-buffered saline. Gibco) 1X , pH 7.1.
- Paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma, USA) preparado en PBS.
- Buffer de Cacodilatos 0.1M en agua ultrapura, pH7.2
- Fijador de Karnovsky (Paraformaldehído 1%, glutaraldehído 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4).

Microscopía electrónica de transmisión

- Fijador de Karnovsky (Paraformaldehído 1%, glutaraldehído 2.5% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4).
- Buffer de cacodilatos 0.1M en agua ultrapura, pH7.2
- Tetróxido de Osmio (OsO₄) al 1% preparado en amortiguador de Zetterqvist: para el amortiguador se mezclaron tres soluciones y se ajustó su pH a 7.2:
 - Solución A: Veronal sódico 1.47g+ acetato de sodio 0.97g
 - Solución B: HCl 0.1N 36% (8.6ml para 1l de agua)
 - Solución C: cloruro de sodio (NaCl) 4g+cloruro de potasio (KCl) 0.2g+cloruro de calcio (CaCl) 0.1g

Se utilizó una cápsula de 1g de OsO₄ en 52.2ml de agua ultrapura y se le agregó la mezcla de las soluciones anteriores

- Acetato de uranilo 2.5% en agua bidestilada
- Citrato de plomo 0.3% en agua bidestilada

Anexo 3. Reactivos utilizados para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

- PBS (Phosphate-buffered saline. Gibco) 1X , pH 7.1.
- Tritón (Sigma) 1x preparado en PBS.
- Solución de albúmina de suero bovino (BSA, Albumine Bovine, Sigma-Aldrich) al 1% en PBS.

Anexo 4. Reactivos para extracción de RNA y RT-PCR

- TAE 1x (Tris 48.4g, 11.5 ml de ácido acético, 20 ml de EDTA 0.5M a pH8 en agua desionizada).
- Gel de agarosa (Gibco) 1.5% en bufer TAE.
- Tris (Ultrapure Tris. Invitrogen, USA). Para preparar Tris 1M: 121.1g Tris base en 1l de agua desionizada. Se filtró en membrana calibre .22.
- di-etil-pirocarbonato (DEPC Sigma, USA). Para 1l: 990ml de agua desionizada+1ml DEPC+9ml etanol 100%. Se dejó en agitación una noche
- Bromuro de Etidio (BioRad, USA) a concentración de 0.25mg/ml

Anexo 5. Reactivos para Western blot

- Buffer de lisis. Tris 1M pH7.4 250µl + EDTA 0.5M 40 µl + NP40 25 µl + Agua 25ml.
- Sample buffer o Buffer de Leiden. Tris 0.5M pH6.8 1.25ml + dodecil sulfato de sodio (SDS) 2.3ml + glicerol 10% 1ml + β-mercaptoetanol 500 µl + azul de bromofenol 10 µl.
- Buffer de corrida. Tris 15.15g + glicina 74.55g + SDS 5g + agua 500ml
- TBS (Tris, borato, cloruro de sodio). Tris 12.11g + NaCl 43.83. + agua 500ml.
- Buffer para gel inferior pH8. Tris 1.5M 18.17g + SDS 4ml + agua 100ml
- Buffer para gel superior pH6.8. Tris 1.5M 6.06g + SDS 4ml + agua 100ml
- PSA 10%.
- TEMED (tetrametiletilenediamina, Bio-Rad USA).
- Para realizar los geles de corrida inferior al 10% y gel superior se utilizan los reactivos enumerados en las tablas 5 y 6 respectivamente
- Buffer de transferencia pH8.3. Tris 1.2g + glicina 7.2g + metanol 100ml + agua 500ml
- TBST (Tris, Borato, cloruro de sodio, tween). Se hace una dilución 1:10 de la solución de TBS y se agregan 250µl de Tween por cada 500ml de solución.

Tabla 7. Reactivos para preparar gel inferior al 10%

Solución	2 geles
Buffer inferior	2.25ml
Acrilamida	3.99ml
Agua	3.73ml
PSA (Bio-Rad USA) 10%	33.7µl
TEMED	11.2 µl

Tabla 8. Reactivos para preparar gel superior

Solución	2 geles
Buffer superior	1ml
Acrilamida	0.4ml
Agua	2.6ml
PSA (Bio-Rad USA) 10%	15µl
TEMED	5µl