

TESIS DE MAESTRÍA EN ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA ANIMAL.

LECTINHISTOQUÍMICA DEL EPITELIO INTESTINAL
EN LOS MAMÍFEROS DOMÉSTICOS.
ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL EQUINO, EL CERDO Y EL CONEJO.

Autor: Méd. Vet. Jorge M. GALOTTA
Director: Dr. Claudio BARBEITO
Lugar: Universidad Nacional de Río Cuarto
Fecha: junio de 2006

Resumen

Las lectinas son proteínas y glicoproteínas de unión específica a residuos de azúcares dentro de oligosacáridos y polisacáridos. La lectinohistoquímica es una técnica que utiliza a estas proteínas para determinar el patrón de sacáridos en los tejidos. En la presente tesis se realizó un estudio lectinohistoquímico de diversas regiones del intestino del cerdo, el equino y el conejo.

A continuación se enumeran las lectinas que se utilizaron para incubar los cortes, agrupadas según su afinidad por los distintos carbohidratos:

Grupo I: afinidad por glucosa / manosa

Con A (*Concanavalina ensiformes*)

Grupo II: afinidad por Nacetilglucosamina

WGA (*Triticum vulgare*). Esta lectina también posee afinidad por el ácido siálico

Grupo III: afinidad por Nacetilgalactosamina / galactosa

DBA (*Dolichus biflorus*)

SBA (*Glycine max*)

PNA (*Arachis hypogaea*)

RCA I (*Ricinus communis*)

Grupo IV: afinidad por L fucosa

UEA I (*Ulex europeus*)

Se utilizaron el complejo biotina-avidina (ABC) para la amplificación, la diaminobencidina (DAB) como cromógeno y la hematoxilina para la coloración de contraste. Los cortes se evaluaron por microscopía óptica. Se analizaron los enterocitos (EC) y células caliciformes (CC) de criptas y vellosidades, se consideraron variaciones zonales entre la región basal y superficial de estas estructuras. De acuerdo a La unión de las lectinas fue evaluada subjetivamente en: (-) negativa, (+) débilmente positiva, (++) positiva y (+++) fuertemente positiva.

La marcación con la lectina CON A resultó negativa para las células caliciformes, con excepción de algunas células del recto del cerdo y equino. El comportamiento de la marcación de los EC con CON A no indicó un patrón que pudiera relacionarse con el eje cráneo-caudal del intestino. Así, mientras en el conejo la marcación se hizo más intensa hacia el intestino grueso, en el cerdo, la lectina CON A mostró una mayor afinidad en el intestino delgado, en especial en el íleon. En el equino la menor afinidad se encontró en el colon.

Con respecto a la lectina WGA, el patrón de marcación en las CC fue heterogéneo, tanto para las distintas especies, como para los distintos sectores intestinales estudiados. En el conejo, la intensidad de la marcación fue escasa y llegó a ser negativa en íleon. En el equino la marcación también fue leve, excepto en el íleon donde resultó intensa. Los E se marcaron con WGA en todos los sectores estudiados.

La lectina DBA marcó en forma heterogénea las CC de los distintos sectores intestinales, con excepción del colon del cerdo en el que no se encontró marcación. En algunos casos, como en el intestino grueso del conejo, las células positivas predominaron en el fondo de la cripta. Sin embargo en el intestino grueso del equino y en el yeyuno del conejo las células marcadas predominaron en la región más cercana a la luz. Con respecto a los EC del intestino delgado y del colon del cerdo, no se evidenciaron en ellos sitios de unión para DBA. En cambio, en el recto se observó marcación en las células superficiales. En el recto del equino se encontró un resultado positivo como en el cerdo, pero también se halló marcación en otros sectores del intestino como el yeyuno y la base de las criptas del íleon y colon. En el conejo, no se evidenciaron sitios de unión para DBA en el intestino grueso. Con respecto al intestino delgado de esta especie, el patrón de marcación es fue poco habitual, ya que en el íleon la positividad fue mayor en el fondo de las criptas intestinales mientras que en el yeyuno lo fue en la superficie.

La lectina SBA marcó las células caliciformes, excepto en el colon de caballo y cerdo. En los EC la lectina SBA marcó tanto el glicocálix como el citoplasma en la mayor parte de los casos. Además, con esta lectina, fue frecuente el hallazgo de un patrón de marcación supranuclear. Este último patrón puede relacionarse, por su ubicación intracelular, con la marcación del aparato de Golgi.

La marcación con PNA en CC fue negativa en el intestino delgado, excepto en algunas células del equino. Los EC se evidenciaron con PNA. Esta marcación fue más frecuente en las células de las vellosidades que en las de las criptas.

RCA-I marcó en forma heterogénea las CC, con excepción del intestino grueso del equino en que no hubo marcación alguna. En los EC del conejo y del equino la marcación fue más intensa en el intestino delgado, mientras que en el cerdo la menor marcación se observó en el yeyuno. En general, en el cerdo se encontró una elevada positividad para RCA-I, lo que se corresponde con lo observado por otros investigadores.

PNA, SBA, DBA y RCA-I forman un grupo de lectinas con afinidad por galactosa y N-acetilgalactosamina. Sin embargo, la intensidad de la unión puede variar notablemente para ambos monosacáridos. Estas características explican los resultados divergentes encontrados en la misma especie animal y dentro del mismo sector del intestino, para las diversas lectinas del grupo. En la

marcación con estas lectinas encontramos diferencias regionales en las criptas del intestino grueso, variando la intensidad de la misma según la hilera celular considerada.

La lectina UEA-I, que determina la presencia de fucosa, marcó intensamente en la mayoría de las CC excepto en el intestino delgado del conejo, en el colon del caballo y el recto del cerdo.

Nuestros resultados permiten establecer un patrón general de unión a lectinas en el intestino de distintas especies de mamíferos domésticos. Este patrón debe considerarse característico dentro de ciertas condiciones ya que puede variar en situaciones fisiológicas como la edad o con distintas dietas. También debe considerarse que las diferencias intra e interespecíficas en el patrón de glicosilación de la mucosa intestinal estarían relacionadas con la fisiología de ese sector del intestino y con la interacción entre el epitelio y los microorganismos intestinales y por lo tanto son, al menos parcialmente, el resultado de un proceso coevolutivo. Aun más, estas variaciones no solo son producidas por el efecto directo de los microorganismos sino también por la acción que las citoquinas secretadas por el hospedador ejercen sobre las células intestinales.

Otro aspecto relevante de nuestros resultados es la diferencia entre el patrón de carbohidratos entre los EC y CC. Esto coincide con lo observado en otras especies y se relaciona con el hecho que, si bien ambas células sintetizan mucinas, el control de la secreción es diferente en estas dos poblaciones celulares.

En síntesis, nuestro estudio revela la existencia de variaciones en el patrón de carbohidratos en distintas especies, sectores intestinales, regiones del eje cripta-vellosidad y tipo celular. No se evidenció una relación directa con el tipo de dieta ya que no se estableció un patrón común para las tres especies, lo que podría explicarse por la multicausalidad en la variación de la composición de los glicocomplejos intestinales. La importancia de nuestro estudio reside en que analiza tanto distintas especies como diferentes sectores intestinales, mientras que la mayoría de los trabajos consultados se limitan a la descripción del patrón de lectinohistoquímica en una única especie y en algunos segmentos intestinales.

Abstract

Lectins are proteins that bind specifically to terminal carbohydrate residues in oligosaccharides and polysaccharides. Lectin histochemistry is a technique that employs these proteins to determine the pattern of saccharides in tissues. In the present thesis a lectin histochemical study of diverse regions of the intestine of horses, pigs and rabbits was performed.

The lectins employed to incubate the histological sections, grouped according to their affinity to different carbohydrates, are indicated next:

Group I: affinity for glucose / mannose

Con-A (*Concanavalia ensiformes*, specifically binding -D-Man and -D-Glc)

Group II: affinity for Nacetylglucosamine

WGA (*Triticum vulgare*, binding specificity -D GlcNAc and NeuNAc). This lectin has also affinity for sialic acid.

Group III: affinity for N acetylgalactosamine / galactose

DBA (*Dolichus biflorus*, with binding specificity to -D-GalNAc)

SBA (*Glycine Maximus*, binding specificity to -D-GalNAc, -D-galNAc and -Gal)

PNA (*Arachis hypogea*, that specifically binds -D-Gal and (1-3) GalNAc)

RCA-1 (*Ricinus communis*-1, binding specificity -D-Gal and -D-Gal)

Group IV: affinity for L fucose

UEA-1 (*Ulex europaeus*-1, binding specificity LFuc)

The jejunum, ileum, colon and rectum slides were incubated with an avidin-biotin-peroxidase complex for amplification. Diaminobenzidine and hematoxylin were used as chromogen and contrast staining, respectively. Enterocytes (EC), goblet cells (GC) from villi and crypts were analyzed and zonal variations between basal and surface regions of these structures were taken in consideration. The intensity of lectin binding was subjectively scored as follows: (-) none, (+) weakly positive, (++) positive, (+++) strongly positive.

CON A labelling resulted negative for goblet cells except for scarce cells in the pig's and horses' rectum. The enterocytes CON A labelling did not show a pattern that could be related to the cranial-caudal intestine axis. Thus, in the rabbit the labelling resulted more intense toward the large bowel whereas in the pig it revealed a greater affinity in the small bowel, particularly in the ileum. In the horse, CON A minor affinity was found in the colon.

Regarding WGA, there was a heterogeneous GC lectin binding pattern both, among species and different intestinal sectors. In the rabbit, the intensity of the bearing was little and got to be negative in ileum. In horses the labelling also was weak, except in ileum where it was intense. Enterocytes were positive for WGA in all the studied sectors.

Lectin DBA produced heterogeneous staining of the GC in the different intestinal sectors, with exception of the pig's colon which was not labelled. In some cases, as in the large intestine of the

rabbit, the positive cells predominated at bottom of crypt. Nevertheless in the horse's large intestine and rabbit's in jejunum the labelled cells predominated in the superficial cells. With respect to the EC of the small intestine and the colon of the pig, no DBA binding sites were demonstrated. However, labelling of the superficial cells was observed in the rectum. In the horse there was a positive result as in the pig, but staining was also found in other sectors of the intestine, i.e. jejunum and the crypt's base of ileum and colon. In the rabbit, no DBA binding sites were demonstrated in the large intestine. With respect to the small intestine of this species, the labelling pattern was unusual, since in the ileum the positive staining was greater at the bottom of the crypts whereas in jejunum it was revealed in the surface.

Lectin SBA labelled GC, except in the colon of horse and pig. In the E this lectin labelled glycocalyx and the cytoplasm in most of the cases. In addition, the finding of a pattern of supranuclear staining with this lectin was frequent. This last pattern can be related, by its intracellular location, with the labelling of the apparatus of Golgi.

PNA staining in GC was negative in the small intestine, with the exception of some cells of the horse. The EC were demonstrated with PNA; this labelling was more frequent in the villi than in those of crypts.

RCA-I bound in a heterogeneous form to GC, with exception of the large bowel of the horse in which there was no labelling. In the EC of the rabbit and the horse the staining was more intense in the small bowel, whereas in the pig the minor staining was observed in jejunum. In general, in the pig a high RCA-I labelling was found, in good agreement to observations from other investigators.

PNA, SBA, DBA and RCA-I constitute a group of lectins that display high affinity for galactose and *N*-acetylgalactosamine. However the binding intensity can vary notably for each monosaccharide. These characteristics explain the divergent results found for the diverse lectins of this group, in a single animal species within a same intestinal sector. We found regional differences in the labelling of these lectins for the large bowel crypts as the intensity of staining varied according to the cell tier.

The UEA-I lectin, that determinates fucose presence, labelled strongly most of the GC with the exception of the small intestine of the rabbit, the colon of horse and the rectum of the pig.

Our results allow us to establish a general lectin binding pattern in the intestine of different domestic mammalian species. This pattern should be considered within certain conditions for it may be modified according to different physiological conditions such as age or diet. Also, regional and interspecific differences of the mucin could reflect the interaction between epithelium-microorganisms and the effects of various cytokines produced by the host in response to such interaction. These interactions could modify the glycolisation pattern, as a result of a coevolutive process.

Another relevant aspect of our results is the differential carbohydrates pattern found in GC and EC. This is in coincidence with reports for other species and can be related to the fact that, although both cellular types produce mucin, the regulatory secretion control is different in each cell-type.

In synthesis, our study reveals the existence of variations in the carbohydrate pattern in different species, intestinal sectors, regions along the crypt-villus axis and cellular type. A direct relation to the type of diet was not demonstrated since a common pattern for the three species was not settled down; this could be explained by the multicausality in the variation of the composition of the intestinal glycoconplexes. The importance of our study resides in that it analyzes different species as much as different intestinal sectors, whereas most of the consulted investigations are limited to the description of the lectin histochemical pattern in a single species and in some intestinal segments.