

Evaluación histoquímica preliminar para determinar la presencia de algunos glucocomponentes de la mucosa de las bolsas guturales de los equinos*

Preliminary histochemical evaluation to determine the presence of some glycosaminoglycans of the equine guttural pouches mucosa

María Patricia Arias Gutiérrez^{1*}, MV, MSc, PhD; Diego Alonso Zuluaga Araque¹, MV, cEsp.

^{1*}Grupo de investigación INCA-CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad CES. Calle 10 No 22-04, Medellín, Colombia. E-mail: marias@ces.edu.co

(Recibido: 30 de abril, 2010; aceptado: 17 de noviembre, 2010)

Resumen

Las bolsas guturales (BG) del equino son divertículos de las trompas de Eustaquio cuya función no ha sido establecida aún. Por su gran capacidad de albergar un volumen considerable de aire, la teoría de Keith Baptiste, quien postula que las BG participan en la termorregulación, es la más aceptada. La caracterización de los componentes oligosacáridicos que tapizan la mucosa de un órgano ayuda a determinar su funcionamiento, por lo cual, se caracterizaron los gluco-componentes de su mucosa mediante histoquímica convencional, con las tinciones de Periodic Acid Shift (PAS), Alcian Blue (AB) a pH 1,0 y AB a pH 2,5, para determinar la presencia de glicanos ácidos, neutros y sulfatados en la mucosa. Se encontró una gran cantidad de mucosubstancias con componentes carboxilo en su vecindad atribuido al ácido siálico. Adicionalmente, se encontró que las células de la mucosa produjeron gluco-componentes sulfatados atribuidos a material glucídico carboxilado. Debido a la capacidad del ácido siálico de retener agua, al formar una capa higrófoba en la superficie de la mucosa que tapiza, es probable que una de las funciones de las BG sea participar en la termorregulación, enfriando la sangre que pasa por la arteria carótida interna y que va al cerebro, especialmente durante el ejercicio.

Palabras clave

Ácido siálico, bolsas guturales, gluco-componentes, oligosacáridos, termorregulación.

Abstract

Equine guttural pouches (GP) are diverticula from the Eustaquian tube and their function has not been established yet. Because of their capacity to contain a considerable amount of air, the theory of Babtiste who postulates that GP

*Para citar este artículo: Arias MP, Zuluaga DA. 2010. Evaluación histoquímica preliminar para determinar la presencia de algunos glucocomponentes de la mucosa de las bolsas guturales de los equinos. Rev CES Med Vet Zootec; Vol 5 (2):37-43.

participate in thermoregulation is the most accepted. The ultra structure of an organ can determine its functioning, therefore, to look for explain the main function of GP, the glycoconponents of the GP mucosa were characterized by conventional histochemistry, by de Periodic Acid Shift (PAS) staining, and Alcian Blue (AB) at pH 1,0 and AB at pH 2,5 staining methods. It was found a great amount of mucosubstances with vicinal carboxyl components attributed to sialic acid. In addition, it was found that mucosal cells produced sulphated glycoconponents attributable to carboxylic glucidic material. Because of the sialic acid capacity of retaining water, forming a hydrophobic layer on the mucosa, probably one of the functions of GP is to participate in thermoregulation, cooling the blood of the internal carotid artery which goes to the brain, especially during exercise.

Key words

Glyco-components, guttural pouches, oligosacharides, sialic acid, thermoregulation.

Introducción

Las bolsas guturales (BG) son divertículos ventrales de las trompas de Eustaquio que comunican el oído medio con la nasofaringe y se ubican en la región parotidea, y que están presentes todos los animales perisodáctilos³. Esta conexión está cerrada normalmente, excepto durante la deglución, cuando el orificio salpingo-faríngeo se abre (Figura 1). Los equinos poseen las BG más grandes entre las especies en las cuales están presentes, ocupando una amplia área en la porción caudal de la cabeza; en caballos adultos cada una tiene una capacidad de volumen entre 300 a 600 mL⁷.

Cada bolsa gutural se comunica con la faringe a través de un orificio de salida ubicado rostro-ventral al la hendidura faríngea. Las secreciones mucosas producidas normalmente drenan hacia la faringe, a través de los orificios faringotubáricos, que son las partes más declives cuando la cabeza del caballo esta relajada o descendida. Los orificios sólo se abren cuando el caballo deglute, así pues que el consumo de pasto favorece el drenaje de las secreciones de las bolsas⁸.

La función de las BG en equinos no es clara todavía, pues la dificultad de crear un modelo experimental que permita explicar su función en animales vivos no ha permitido que se explique satisfactoriamente su función^{7,8}. La primera función que se le atribuyó a estos órganos es que actuarían como una caja de resonancia, sin embargo, hoy se

sabe que si la entrada a las BG está obstruida los sonidos emitidos por el animal se replican de la misma manera¹¹. Carter *et al.* (1978), propusieron que las BG ayudan a equilibrar presiones entre el oído medio y la faringe, pero esta función no explica su gran tamaño⁷. Rooney *et al.* (1997), proponen que las BG facilitan la fisiología de la deglución, debido a su flexibilidad y posición estratégica, expandiéndose y aumentando la capacidad de la faringe especialmente cuando el animal come pasto, pero esta teoría no ha sido experimentalmente comprobada aún¹⁴.

Keith Baptiste (1998) propone que las BG participan en la termorregulación, y mediante un modelo experimental en cadáveres y posteriormente en caballos anestesiados demostró que la ventilación de las BG permite enfriar la sangre que pasa por la arteria carótida interna por debajo de la temperatura central.

Según esta teoría, el intercambio normal de aire durante la respiración puede ser un mecanismo de enfriamiento cerebral para disipar el calor generado por el metabolismo, especialmente durante el ejercicio, permitiendo que el aire que entra a las BG enfríen la sangre que pasa por la arteria carótida interna, que en su recorrido pasa por la delgada pared de las BG^{8,11}, sin embargo, las conclusiones de sus estudios son discutidas aun (Figura 2).

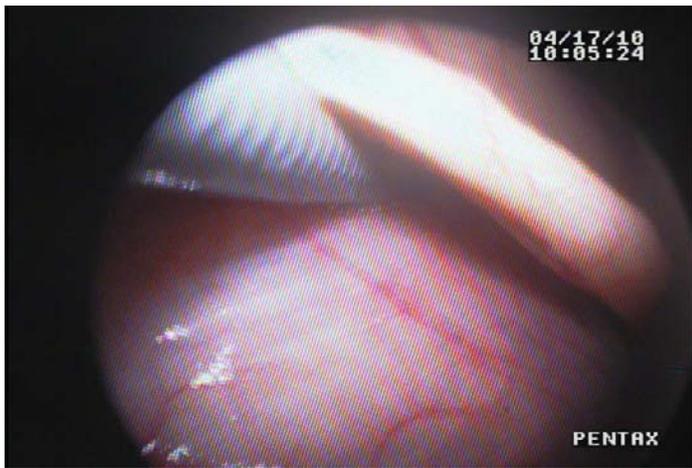


Figura 1. Endoscopia de las bolsas guturales: entrada del endoscopio a una de las BG a través del orificio faríngeo. La flecha señala el pliegue salpingofaríngeo.

(Fotografía tomada en el Centro de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad CES con un endoscopio Pentax® FG 29x, con fines ilustrativos)

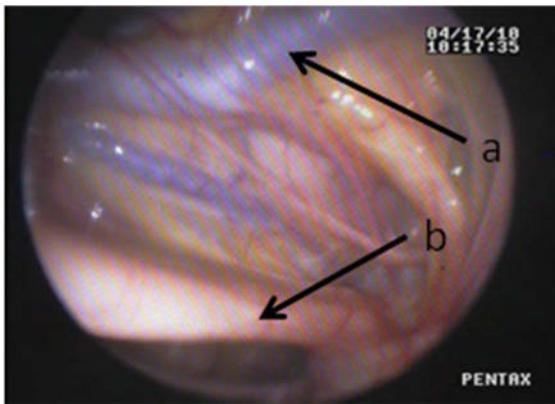


Figura 2. Endoscopia de las bolsas guturales: Se observa el paso de la arteria carótida interna (a) en su recorrido bajo la delgada pared de compartimento medial de la BG, y el hueso estilohiideo (b) que separa los compartimentos medial y lateral.

(Fotografía tomada en el Centro de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad CES con un endoscopio Pentax® FG 29x, con fines ilustrativos).

Histológicamente, las BG están cubiertas por una mucosa compuesta por un epitelio columnar pseudo-stratificado ciliado con abundantes células caliciformes localizadas principalmente en los pliegues; son evidentes las microvellosidades de la mucosa¹⁴. El grosor de la lámina propia es variable, y allí se encuentran numerosas glándulas mucosas, serosas y mixtas. Las glándulas tubuloacinares agrupadas en la lamina propia – submucosa y sus conductos excretores están delineados por un epitelio cúbico simple o columnar característico de las vías

respiratorias superiores¹².

La caracterización de los glicanos de la mucosa de las bolsas guturales podría arrojar indicios que ayuden a apoyar alguna de las teorías existentes en cuanto al papel de las bolsas guturales, pues es reconocida la importancia que tienen las glicoproteínas y en particular, los glucosaminoglucanos en la determinación de la función de diversos órganos¹. La superficie del epitelio respiratorio en equinos está tapizado por una capa de moco que se renueva constantemente formando un moco visco elástico^{4,10}.

Las propiedades visco elásticas del moco protegen las células epiteliales de la mucosa. Las glicoproteínas y los gluco-componentes forman las mucinas que son abundantes componentes de las secreciones del tracto respiratorio¹¹. Los gluco-componentes interactúan con gran variedad de péptidos y hormonas, y se ha postulado que pueden estar involucrados en mecanismos inmunes, formando una barrera que atrapa agentes patógenos y partículas oxidativas^{6,15}. Aunque parece contrario a lo anterior, múltiples estudios han descrito una interacción entre los gluco-componentes de la mucosa con microorganismos, principalmente bacterias, que las utilizan como receptores para colonizar los tejidos¹⁰.

En el presente estudio se evaluó la secreción de gluco-componentes por parte de la mucosa de las BG por histoquímica convencional, con el fin de reunir más elementos que permitan aclarar el papel principal de estos órganos en los equinos.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

Estudio de tipo descriptivo.

Recolección del tejido

Se tomaron muestras de 1cm de diámetro de la pared de las BG de los compartimentos medial y lateral de 6 caballos sanos, machos castrados, pertenecientes a las razas de engorde: Caballo Agrícola Italiano, Avelignese, Franches Montagnes, Tolfetano y Murgese; estos caballos fueron sacrificados en la planta municipal de sacrificio de Sefro, región Le Marche, Italia. Las muestras fueron fijadas inmediatamente en

Carnoj por 24 horas y posfijadas en una solución de acetato de calcio al 2% y paraformaldehído al 4% (1:1 v/v) por 3 horas a temperatura ambiente. Luego, las muestras fueron deshidratadas en escala gradiente de alcohol, aclaradas en xileno y embebidas en parafina. Se realizaron 10 secciones por animal de 5 µm, (5 del compartimiento medial y 5 del compartimiento lateral), para un total de 60 secciones a ser analizadas. Las secciones se montaron en portaobjetos (*Superfrost Plus slides, Bio-Optica, Milano*), y luego las muestras se sometieron a la tinciones de AB y PAS a pH 1,0 y 2,5.

Histoquímica convencional

Para evaluar la producción de glicanos, se prepararon 5 secciones por muestra. Una de las secciones se coloreó con Hematoxilina – Eosina como control, para observar la integridad y normalidad del tejido; en cada una de las muestras se observó el grosor del epitelio, el grosor de la submucosa, la presencia de glándulas y sus conductos en la submucosa, la vascularización del tejido, la presencia de células caliciformes y de cilias en el epitelio, y la ausencia de células inflamatorias para determinar que no hubo cambios en la arquitectura del tejido. Los tejidos se compararon con placas histológicas de colección. Las 4 secciones restantes se tiñeron usando las técnicas de histoquímica convencional: AB y PAS, según el protocolo propuesto por Spicer S y Schulte A (1992)¹⁸, como se describe a continuación:

1. PAS: para detectar azúcares neutros con residuos de ácido siálico.
2. PAS pH 1,0: para detectar azúcares neutros y ésteres O-sulfatados.
3. AB a pH 1,0: para detectar ésteres O-sulfatados.
4. AB a pH 2,5: para detectar ésteres O-sulfatados, ácido siálico, y grupos carboxilos con ácido urónico o glucurónico.

En las secciones sometidas a la tinción de PAS y AB se determinó la positividad como indicador de la presencia de GAGs ácidos y neutros y ésteres

sulfatados en la mucosa de las BG, observados en 10 campos de 400X, para cada una de las secciones.

Resultados

Los hallazgos histológicos de las muestras sometidas a Hematoxilina-Eosina revelaron la normalidad el tejido (Figura 3). En ninguna de las secciones se encontraron alteraciones histopatológicas en la mucosa de las BG. No se observó diferencia significativa en cuanto a la composición tisular ni en cuanto a la distribución de las glándulas de la submucosa entre las muestras obtenidas de los compartimientos medial y lateral.

La naturaleza bioquímica de los oligosacáridos de la mucosa de las BG fue evidenciada por histoquímica convencional, permitiendo obtener conclusiones más relevantes sobre los glicanos secretados por los diferentes tipos de células de la mucosa. Se encontró que las células secretoras producen una gran cantidad de glico-componentes. En particular, se observó una importante producción de material glucídico neutro con hidroxilos vecinos, la mayoría de ellos conteniendo mucosustancias ácidas, en especial, condroitin sulfato B, heparina y heparan sulfato (Figura 4).

Adicionalmente, se encontraron mucosustancias con componentes carboxilo en su vecindad atribuido al ácido siálico (Figura 5). Las células de la mucosa produjeron gluco-componentes sulfatados atribuidos al material glucídico carboxilado (Figura 6). En las células acinares se encontró una gran producción de sialomucinas, sulfomucinas, glucanos neutros, y ácido siálico con grupos O- acetil en el C4 (Figura 7). En las células ductales se encontraron glucanos esencialmente sulfatados, y en menor cantidad, residuos de ácido siálico. La mayoría de estas moléculas fueron identificadas como mucosustancias con componentes ácidos y neutros.

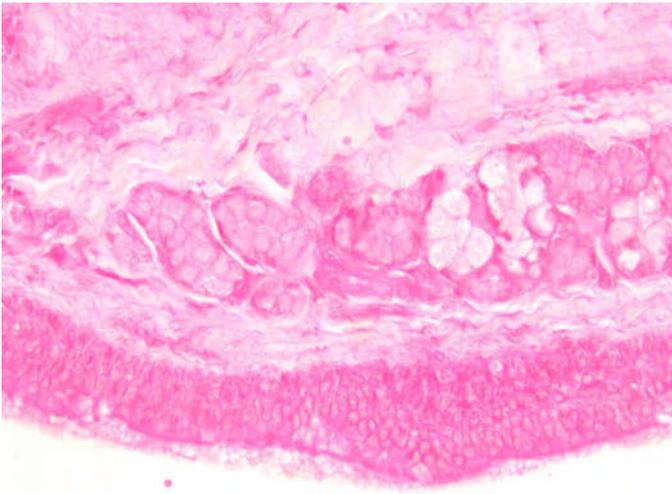


Figura 3. La tinción con H-E muestra la normalidad del tejido. No se observaron cambios histopatológicos del epitelio o de la submucosa.

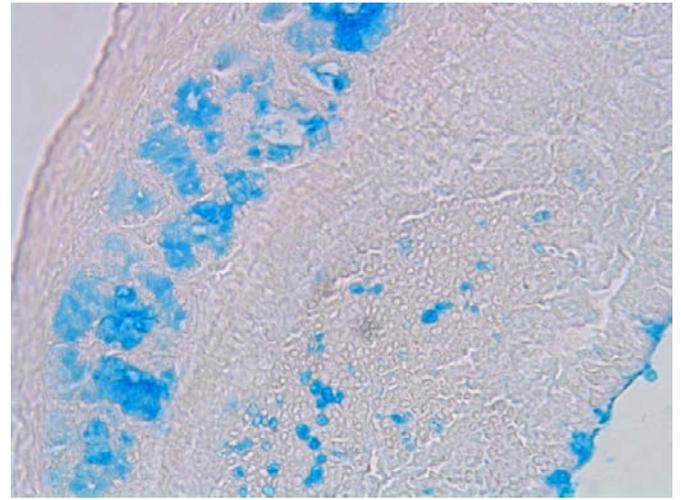


Figura 6. La positividad al AB pH a 1.0 muestra la presencia de ésteres O-sulfatados en las glándulas submucosas.

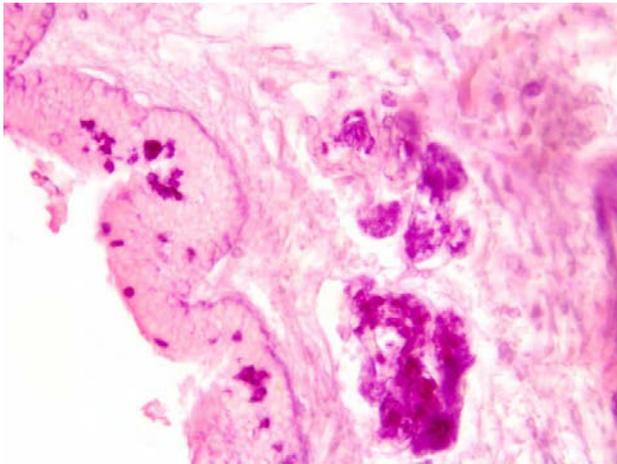


Figura 4. La tinción con PAS evidencia la presencia de azúcares neutros con gran cantidad de residuos de ácido siálico el epitelio y en las glándulas de la submucosa.

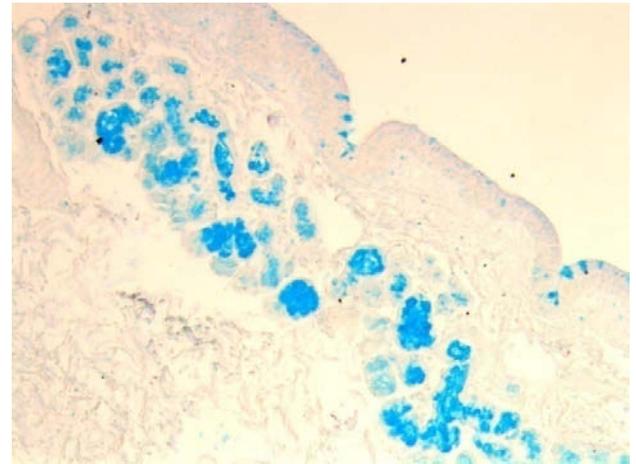


Figura 7. La tinción con Alcian Blue a pH 2.5 evidencia ésteres O-sulfatados, ácido siálico, y grupos carboxilos con ácido urónico o glucurónico.

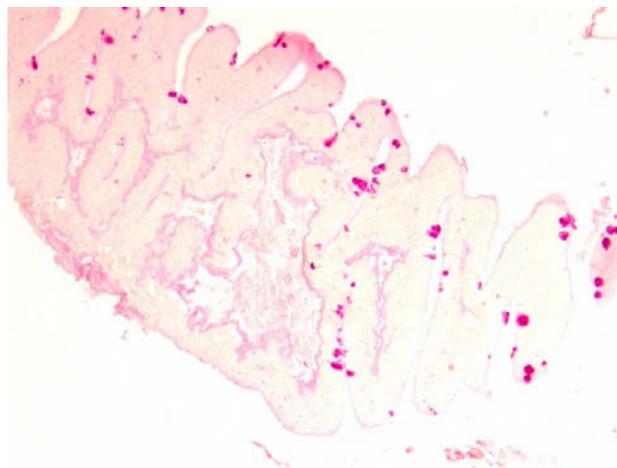


Figura 5. La tinción con PAS a pH 1.0 muestra

Discusión

La diversidad de los gluco-componentes de la mucosa de las BG sugiere que estas moléculas están involucradas en diversas funciones, como participar en la respuesta inmunológica y de señalización intracelular. Los hallazgos del presente estudio están de acuerdo con la teoría de Baptiste (2001), quien sugiere que las BG participan en la termorregulación¹⁰. La gran cantidad de ácido siálico amerita considerar su papel como micro molécula en la mucosa.

Se sabe que por su naturaleza química, el ácido siálico se rodea de moléculas de agua en medios solubles, ejerciendo un efecto higroscópico en la mucosa^{15,17}, lo cual permite pensar que este componente es esencial para mantener hidratada la superficie de las BG, las cuales están sometidas a deshidratación por la entrada continua de aire a las BG.

Adicionalmente, es probable que la presencia de componentes sulfatados, evidenciada por la fuerte positividad a la tinción con AB a diferentes pH, ayuden al ácido siálico a mantener el estado de hidratación en la mucosa, dado que la afinidad química de estos glicanos por las moléculas de agua es bien conocida⁵, de tal manera que todos estos componentes encontrados en la mucosa constituyan un posible mecanismo de defensa para disipar calor, especialmente durante la actividad física, cuando aumenta la ventilación y el movimiento de aire hacia las BG.

La presencia de estas sustancias en la mucosa, entonces, podría retardar la desecación de dicha superficie no sólo durante el ejercicio sino también cuando la temperatura corporal aumenta por diversas causas, contribuyendo a los mecanismos de enfriamiento de aire y evaporación.

De otra parte, se ha descrito que los glicanos de la mucosa de diversos órganos participan en la respuesta inmune². Se ha reportado que el ácido siálico es un receptor importante para microorganismos, en particular, bacterias de la especie *Streptococcus* tienen una alta afinidad por los glicocomponentes de la mucosa respiratoria⁵. En humanos se han realizado estudios sobre la adherencia de *Streptococcus pyogenes* a los glicosamionoglicanos de la mucosa de las trompas de Eustaquio¹³, también en suinos se ha descrito la colonización temprana de *Streptococcus suis* a la mucosa del tracto respiratorio, específicamente de la orofaringe mediante adherencia a glicanos⁹.

Es posible que en equinos suceda un fenómeno similar con bacterias de la especie *Streptococcus*, las cuales tienen preferencia por colonizar la mucosa de las BG, sin embargo, se requieren más estudios para corroborar esta interacción.

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que por la naturaleza de los gluco-componentes observados en la mucosa de las BG es posible que una función importante de estas moléculas en la superficie de la mucosa de las BG sea protegerla de la deshidratación a la cual está expuesta continuamente, especialmente durante el ejercicio, debido principalmente a la gran cantidad de ácido siálico y glicanos sulfatados presentes en la mucosa de estos órganos.

Es importante estudiar más detalladamente los gluco-componentes de la mucosa de las BG en equinos, pues en la medida que se conozca su composición bioquímica, se podrá entender mejor el papel de estas moléculas en la superficie de estos órganos, y estudiar las interacciones entre estas moléculas y diversos microorganismos patógenos.

Agradecimientos

Al personal auxiliar del laboratorio de histopatología de la Universidad de Camerino-Italia, y al grupo EQUICES por su valiosa colaboración.

Referencias

1. Accili D, Menghi G, Gabrielli MG. Lectin histochemistry for in situ profiling of rat colon sialoglycoconjugates. *Histol Histopathol*. 2008. 23:863-875.
2. Anders K. Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Molecular Microbiology*. 1998. 29(1): 1-11.
3. Baptiste KE. A preliminary study on the role of the equine guttural pouches in selective brain cooling. *The Veterinary Journal*. 1998. 155:115-117.
4. Baptiste KE, Cake MH. Lipid analysis of lavage samples from the Equine guttural pouch (auditory tube diverticulum). *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1994. 103:383-388.
5. Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Functions of

- cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:729-77.
6. Brooks, S. Human N- and O-linked protein glycosylation - An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology.* 2008. 150(3), S162-S162.
 7. Cunningham JG. 2009. *Fisiología Veterinaria*^{2a} ed. México DF. Interamericana Mc Graw Hill. *Manual de Fisiología Médica.* 4^a ed.
 8. Frandson RD, Fails AD, Lee Wilke W. *Anatomy and Physiology of Farm Animals.* 6th edition. June 2009. Chapter 19: 171-89.
 9. Hasty TL, Ofek I, Courtney HS, Doyle RJ., Multiple adhesins of streptococci. *Infect Immun.* 1992. 60:2147-2152.
 10. Karlsson KA. Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Mol Microbiol.* 1998. 29:1-11.
 11. Kumar P, Timoney JF. Histology, immunohistochemistry and ultrastructure of the tonsil of the soft palate of the horse. *Anatomia, histologia, embryologia* 2006. 35(1):1-6.
 12. Lepage O. Hemorragie dans les poches gutturales. *Anatomie, diagnostic et étiologie. Partique Vétérinaire Equine.* 1994. 26: 255-261.
 13. Liu S., Sela G., Cohen J., Jadoun A., Cheung A., Ofek I. Insertional inactivation of streptolysin S expression is associated with altered riboflavin metabolism in *Streptococcus pyogenes*. *Microb Pathog.* 1997. 22; 227-234.
 14. McGorum DB, Dixon PM, Robinson NE, Shumacher J. *Equine Respiratory Medicine and Surgery.* Saunders Elsevier. 2007. Pp 419-420.
 15. Nieuw AV, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology* 1995. 5:733-740.
 16. Parillo F, Rossi G, Busoni V, Magi GE, Verini A. Differentiation of glycans occurring in the equine guttural pouches. *The Veterinary Journal.* 2009 May; 180 (2):246-52.
 17. Rousseau K, Kirkham S, McKane S, Newton R, Clegg P, Thornton DJ. Muc5b and Muc5ac are the major oligomeric mucins in equine airway mucus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007. 292: L1396-L1404.
 18. Spicer S, Schulte B. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *J Histochem Cytochem.* 1992; 40:1