

MODIFICACIONES HISTOQUIMICAS DE LOS RESIDUOS AZUCARES EN LOS GLUCOCONJUGADOS DE LAS GLANDULAS PALATINAS HUMANAS DURANTE SU DESARROLLO Y MADURACION

HISTOCHEMICAL MODIFICATIONS OF SUGAR RESIDUES IN GLYCOCONJUGATES
OF HUMAN PALATINE GLANDS DURING DEVELOPMENT AND MATURATION

**María E Samar, Rodolfo E Avila, Javier Fernández, René Fernández,
Nelson L Rugani, Adriana Massone, Luis Olmedo**

Cátedra A de Histología y Embriología. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba.
Ciudad Universitaria. Córdoba. Argentina. msamar@latinmail.com. Subsidio SECYT 123/04
(Programa de incentivos)

RESUMEN

Antecedentes: Algunos investigadores estudiaron las características morfológicas e histoquímicas durante el desarrollo, histogénesis y maduración de las glándulas palatinas, en tanto que no se conocen observaciones sobre el patrón de glicosilación de sus proteínas y la distribución de glicoproteínas con uniones N y O-glucosídicas y sus posibles implicancias funcionales.

Objetivos: En base a estos antecedentes nos propusimos investigar con histoquímica básica y lectin histoquímica las glándulas palatinas humanas de diferentes grupos etarios para determinar el inicio de la secreción de mucinas y la presencia de glicoproteínas con uniones N y O-glucosídicas durante la diferenciación y maduración glandular.

Materiales y métodos: Glándulas palatinas humanas de embriones y fetos, recién nacidos, jóvenes y adultos fueron estudiadas con métodos histoquímicos (PAS, Dane, Alcian blue a pH 2,5 y 1,0, Azul de toluidina) y lectin histoquímica.

Resultados: Las variaciones observadas en los glicoconjugados durante el desarrollo y maduración de las glándulas palatinas humanas demuestran que su secreción comienza en etapas tempranas del desarrollo prenatal y está compuesta por una variedad de azúcares

que cumplirían un papel fundamental en los periodos prenatales y postnatales.

Conclusiones: El estudio de las modificaciones de los residuos azúcares en las glándulas palatinas humanas durante la embriogénesis, diferenciación y maduración, nos permite obtener una mayor información sobre su histofisiología y sobre los potenciales cambios durante el envejecimiento y procesos patológicos de las glándulas salivales maduras.

Palabras clave: Glándulas palatinas- Desarrollo - Maduración - Azúcares - Histoquímica.

ABSTRACT

Antecedents.- Most of the literature has focused on the morphological and histochemical characteristics of palatine glands during the development, histogenesis and maturation process. However, there are no publications regarding protein glycosylation and the distribution of glycoproteins with N and O-glycoside bonds, and their possible functional role.

Objective .- Based on this background we committed ourselves to studying the human palatine glands in different age groups in order to determine the beginning of mucine secretion and the presence of glycoproteins with N and O-glycoside

bonds during the processes of differentiation and maturation.

Materials and method.- Human palatine glands were obtained from embryos, fetuses, newborn infants, youngsters and adults. They were studied using histochemical methods (PAS, Dane, Alcian blue, Toluidine blue), and lectin histochemistry.

Results.- The variations observed in glycoconjugates during the development and maturation of human palatine glands show that secretion starts at early stages of prenatal development; it is made up of various sugars that might play an important role in the pre-natal and postnatal periods.

Conclusions.- The study of modifications in sugar residues in the human palatine glands during embryogenesis, differentiation and maturation processes allows us to have further knowledge of their histophysiology and possible changes taking place during aging. This study may also help to understand pathological processes in mature salivary glands.

Key words: Palatine glands.- Development.- Maturation.- Sugars.- Histochemistry.

INTRODUCCION

La mucosa bucal actúa como una barrera contra productos tóxicos y patógenos presentes en los alimentos, manteniendo el equilibrio huésped / medio ambiente (1). Las mucinas salivales forman parte de esta barrera y están involucradas en la lubricación y humectación de los alimentos y en la formación de una película protectora contra la desecación, las agresiones tóxicas externas y el desarrollo microbiano (2-3).

Pruebas histoquímicas convencionales y lectinas han sido ampliamente usadas en cortes histológicos de glándulas salivales para estudiar sus mucinas y el patrón de glicosilación de los glucoconjugados almacenados en sus gránulos secretorios en gran variedad de especies (4-5). Se demostró una considerable heterogeneidad en la

glicosilación de las proteínas de las glándulas salivales. Sin embargo, existe escasa información sobre la identificación de las mucinas en glándulas salivales menores humanas y, particularmente, en glándulas palatinas durante la embriogénesis y maduración. Además, los métodos histoquímicos empleados se limitan fundamentalmente a la caracterización de glicoproteínas y glicosaminoglicanos ácidos (6-7).

Algunos investigadores estudiaron las características morfológicas de las glándulas palatinas durante el desarrollo, histogénesis y maduración, en tanto que no se conocen observaciones sobre el patrón de glicosilación de sus proteínas (7-8).

Adi et al (8) investigaron el patrón lectinohistoquímico de las glándulas linguales y labiales en fetos humanos, no así el de las glándulas palatinas.

A partir de estos antecedentes, el propósito del presente trabajo fue investigar con histoquímica básica y lectinohistoquímica la fracción hidrocarbonada en el epitelio secretor de glándulas palatinas humanas de diferentes grupos etarios para determinar la época de inicio de la secreción de mucinas, la presencia y distribución de glicoproteínas con uniones N-glucosídicas y O-glucosídicas (mucinas) y sus posibles implicancias funcionales.

Este estudio nos permitirá obtener una mayor información sobre la fisiología celular de las glándulas salivales menores y sobre potenciales cambios patológicos en glándulas adultas, ya que como bien se conoce ocurren variaciones en la estructura química, cantidad y distribución de los carbohidratos en los glucoconjugados durante la diferenciación, maduración y transformación maligna de diversos tejidos.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron las glándulas salivales en la mucosa palatina de:

- **Embriones y fetos humanos** (n=25) provenientes de abortos espontáneos y muerte fetal por partos prematuros, en buen estado de conservación y exentos de

anormalidades macroscópicas. La edad osciló entre 8 y 32 semanas del desarrollo, establecidas según longitud vértex-cóccix.

Recién nacidos (hasta 30 días; n=5).

Jóvenes (menores de 25 años; n=5).

Adultos (30 a 55 años; n=15).

Para la obtención del material se respetaron los principios éticos de las Normas Internacionales para investigaciones en seres humanos.

Las muestras de mucosa palatina se procesaron para la siguiente metodología:

- Estudio estructural e histoquímico convencional (9):

Los tejidos se fijaron en formol al 10%, a pH 7.4 y se procesaron según la técnica histológica de rutina. En cortes seriados (de 5 μ m) de cada muestra se aplicaron las coloraciones: H/E, PAS, tricrómico de Masson, tricrómico de Dane/Alcian blue

pH 2,5 para carboximucinas y sulfomucinas, Alcian blue a pH 1,0 para sulfomucinas, Azul de toluidina pH 3,8 para sustancias basófilas y metacromáticas alcohol-resistentes.

- **Digestión con sialidasa:** El ácido siálico fue removido tratando algunos cortes con una solución de buffer acetato 0,25mol/l, a pH 5.5 conteniendo 0,1 unidad/ml de sialidasa Tipo X de *Clostridium perfringens* (Sigma), 5.0 mmol/l de CaCl_2 y 154 mmol/l de ClNa , durante 18 horas a 37 ° C, antes de la coloración con Alcian blue a pH 2.5 y con la lectina PNA. El control se realizó utilizando la solución buffer sin la enzima. (10).

- Determinación lectinohistoquímica de oligosacáridos en mucinas salivales (10):

Se emplearon 7 lectinas biotiniladas (Sigma) y se aplicó el método de avidina biotina

Tabla 1 : Lectinas utilizadas para la marcación histoquímica de residuos azúcares

Lectina nombre en latín (common name)	Abreviatura	Residuo azúcar específico	Concentración $\mu\text{G/ML}$
<i>Canavalia ensiformis</i> (jack bean)	ConA	α -D-manosa, α -D-glucosa	30
<i>Triticum vulgare</i> (wheat germ)	WGA	α -D-N-acetilglucosamina	30
<i>Ricinus communis</i> (castor bean)	RCA-I	β -D-galactosa	30
<i>Arachis hypogaea</i> (peanut)	PNA	β -D-galactosa (1 \rightarrow 3) D-N-acetilgalactosamina	10
<i>Ulex europaeus</i> (gorse seed)	UEA-I	α -L-fucosa	30
<i>Dolichos biflorus</i> (horsegram)	DBA	α -D-N-acetilgalactosamina	30
<i>Glycine max</i> (soybean)	SBA	α -D-N-acetilgalactosamina \rightarrow α -D-galactosa	30

RESULTADOS

A- Observaciones morfológicas e histoquímicas convencionales

Desde las 12 semanas del desarrollo prenatal se observó la proliferación de los esbozos glandulares hacia el mesénquima subepitelial. A partir de las 14 semanas las células glandulares contenían abundantes granulaciones fuertemente PAS reactivas y era evidente la formación de una luz incipiente con glicocáliz PAS positivo y alcianófilo a pH 2,5. Además comenzaba la diferenciación del sistema de conductos (Fig. 1 A y B).

En fetos de 18 a 20 semanas los acinos alcanzaban una mayor diferenciación, con células mucosas PAS y Alcian blue pH 2,5 positivas.

A las 24 semanas las glándulas palatinas estaban estructuralmente diferenciadas, con reacciones histoquímicas más intensas al igual que la basofilia citoplasmática, con Azul de toluidina a pH 3,8, tanto en células mucosas como en el contenido luminal de los conductos.

En fetos de 32 semanas se destacó el sistema de conductos, con importante secreción en su luz.

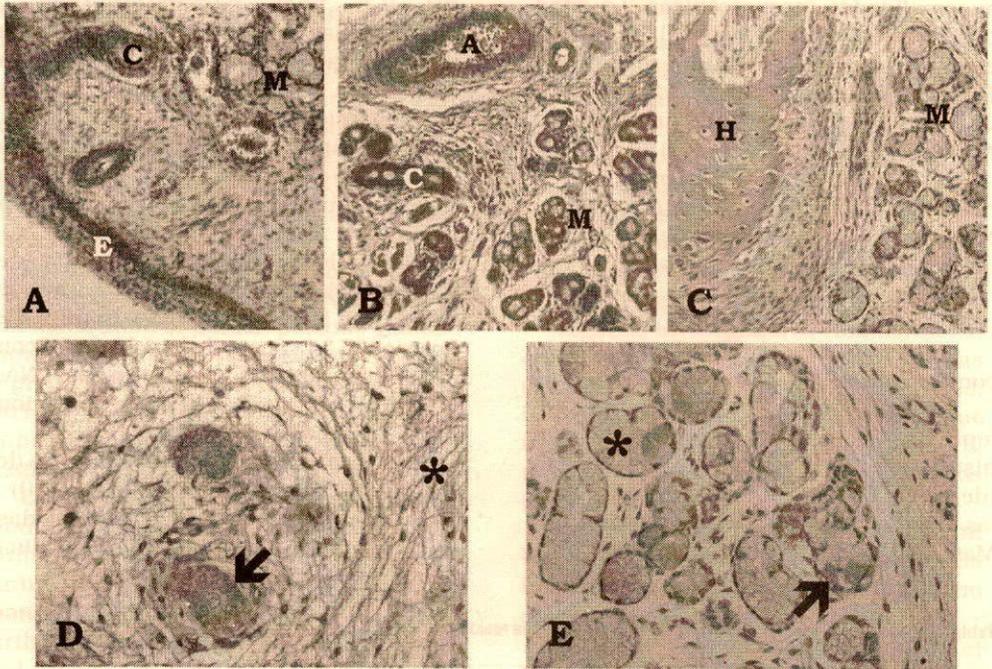


FIGURA 1: GLÁNDULAS PALATINAS DE FETOS

A- Feto de 14 semanas. Se observa la diferenciación del sistema de conductos (C). Epitelio de la mucosa palatina (E). Acinos mucosos en diferenciación (M). Coloración H/E. 200x.

B- Feto de 18 semanas. Conducto excretor (C). Acinos mucosos (M). Arteria (A). Coloración H/E. 100x.

C- Feto de 32 semanas. Mucosa palatina. Acinos mucosos (M). Hueso (H). Coloración H/E. 200x.

D- Feto de 12 semanas. Esbozo glandular. Membranas basales con marcación positiva (flecha). Mesénquima periglandular moderadamente reactivo (asterisco). Lectina WGA. 400x.

Feto de 32 semanas. Acinos mucosos. Células con moderada (flecha) y débil (asterisco) marcación positiva. Lectina RCA-1. 200x.

En recién nacidos y hasta el mes de edad las glándulas palatinas eran similares a las de fetos de 32 semanas (Fig. 1C).

El rasgo distintivo fue la aparición de células mucosas con moderada metacromasia alcohol-resistente, con fuerte incremento hacia la edad adulta al igual que la alcianofilia a pH 1.0.

Tanto en jóvenes como en adultos, el citoplasma de las células mucosas era pálido y vacuolado con H/E y Masson (Fig. 2A). La PAS positividad fue intensa y homogénea en el citoplasma y la luz acinar y ductal (Fig. 2B). Una fuerte alcianofilia se manifestó con Alcian blue a los diferentes grados de acidez (Fig. 2C). Células metacromáticas alcohol-resistentes se coloreaban también de manera homogénea con Azul de toluidina.

Las mucinas fueron sensibles a la sialidasa, como se reveló con Alcian blue a

pH 2,5 con y sin tratamiento enzimático previo.

B- Lectinohistoquímica

***Lectina PNA:** Entre las 12 y 14 semanas del desarrollo, el glicocáliz de los esbozos glandulares mostraron una positividad moderada a fuerte frente a esta lectina, específica para el disacárido β -D-galactosa 1 \rightarrow 3 D-N acetilgalactosamina. Reactividad moderada a intensa se observó en el mesénquima que circunscribía a los esbozos glandulares.

Entre las 20 a las 32 semanas y hasta los 30 días posteriores al nacimiento apareció una reactividad moderada en algunas células acinares entre células negativas, las que sí se colorearon luego de la digestión con sialidasa. Las cubiertas celulares eran fuertemente positivas.

Gran cantidad de células no reactivas y escasas células de positividad moderada a

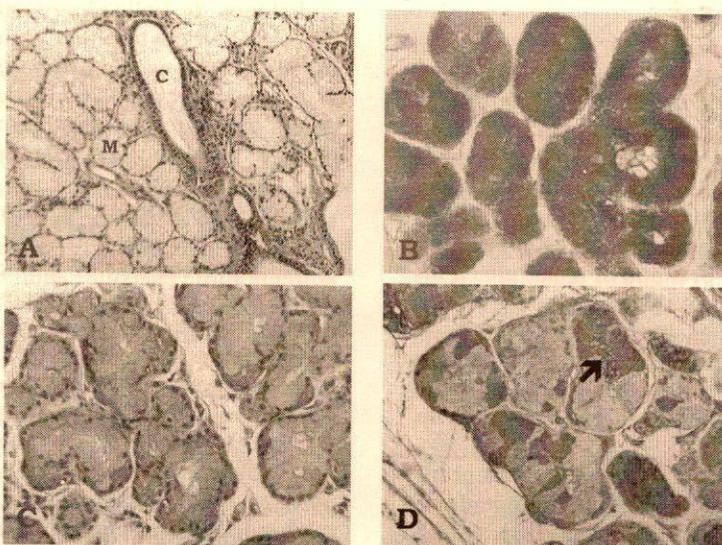


FIGURA 2: GLÁNDULAS PALATINAS DE ADULTOS.

A- Glándulas mucosas con células de citoplasma pálido y vacuolado (M). Conducto excretor (C). Coloración tricrómico de Masson. 200x.

B- Células mucosas con citoplasmas repletos de glicoproteínas fuertemente PAS positivas. Coloración PAS. 400x.

C- Células mucosas alcianofilicas. Coloración tricrómico de Dane/Alcian blue. 400x.

Acinos mucosos con células fuertemente coloreadas con lectina WGA (flecha). Lectina WGA. 400x.

fuerte se observaron en glándulas palatinas de jóvenes y adultos.

El tratamiento con sialidasa incrementó la afinidad hacia PNA de las células negativas.

***Lectina ConA:** Las cubiertas celulares de los esbozos glandulares mostraron una marcación moderada entre las 12 y 14 semanas de gestación con la lectina ConA, con afinidad por oligosacáridos con alto contenido en α -D manosa.

En fetos de 32 semanas los acinos contenían células secretoras ConA negativas y pocas células con positividad débil. En glándulas palatinas de recién nacidos y hasta la edad adulta la región basal de las células mucosas se marcaba débilmente.

***Lectina RCA-1:** Los glicocálices y las membranas basales de los esbozos glandulares presentaron marcación positiva moderada a intensa, al igual que el mesénquima a las 12 a 14 semanas de desarrollo fetal. A partir de esta edad y hasta la edad adulta se observaron acinos mucosos con moderada reactividad y otros cuyas células, moderadamente positivas, se entremezclaban con células débilmente positivas y negativas (Fig. 1E).

***Lectina WGA:** Desde la 12 semanas del desarrollo embrionario los glicocálices de los esbozos glandulares y el mesénquima circundante tenían fuerte marcación positiva (Fig. 1D). A partir de esta edad en las células acinares la reactividad era positiva. Las glándulas de recién nacidos, jóvenes y adultos presentaron células coloreadas con diferentes intensidades y secreción ductal fuertemente positiva (Fig. 2D).

***Lectina UEA-1:** Desde las 12 semanas los esbozos glandulares tenían células moderadamente positivas, reacción que se pudo observar a través de todo el desarrollo prenatal. Entre el nacimiento y la edad adulta se observaron acinos con células mucosas fuerte y moderadamente coloreadas entre células débilmente coloreadas y negativas.

***Lectinas SBA y DBA:** El patrón de coloración con SBA y DBA fue similar en todas las edades investigadas. Durante la etapa prenatal se observó una marcación positiva moderada en tanto que desde el nacimiento y hasta la edad adulta los acinos mucosos se coloreaban en una escala de moderada a negativa.

DISCUSIÓN

Las glándulas palatinas humanas fueron estudiadas con métodos histoquímicos durante su desarrollo y maduración. Con las técnicas histoquímicas convencionales (PAS y Alcian blue) comprobamos que la secreción de glucoconjugados se inicia en estas glándulas entre las 18 y 20 semanas del desarrollo prenatal al igual que en las glándulas linguales humanas, como demostramos en investigaciones previas (11). Por el contrario, en glándulas labiales comprobamos que las mismas están histofisiológicamente diferenciadas ya a las 14 semanas (12).

Es bien conocido que las mucinas salivales actúan después del nacimiento no sólo en la lubricación, fluidificación y humectación del bolo alimenticio sino también en la defensa inmunológica primaria de la boca formando una cubierta mucosa lubricante y demulcente y una barrera semipermeable contra la desecación y agresiones externas (3). Es probable que algunas funciones protectoras empiecen a desarrollarse en la etapa embrionaria ya que las mucinas también protegen a las mucosas contra agresiones ácidas y enzimas digestivas.

Algunos autores (8) relatan que las secreciones de las glándulas salivales fetales contribuyen al volumen total de líquido amniótico. Es muy probable que estas secreciones tengan un efecto amortiguador contra sustancias producidas por los sistemas urinario y digestivo fetales humanos.

Por otro lado, la acidez de los grupos sulfato, que se inicia en glándulas palatinas de recién nacidos y es intensa en el adulto probablemente prepare a la cavidad oral contra la proliferación de gérmenes patógenos, como sostienen algunos autores (13).

En embriones de 12 a 14 semanas la presencia de residuos β -D-galactosa (1 \rightarrow 3) D-N acetilgalactosamina, α -D-N acetilglucosamina y α -D-manosa en los glicocálices de los esbozos glandulares sugiere una acción inductora y reguladora de la diferenciación celular, como se observó en glándulas linguales, epidermis, mesonefros y sistema nervioso de

embriones de pollo. Las lectinas PNA y WGA marcaron también azúcares en el mesénquima y membranas basales, estructuras que participan en la regulación de los intercambios epitelio/mesénquima durante el inicio del desarrollo glandular (10).

Los escasos sitios ConA positivos desde el nacimiento hasta la edad adulta indica la escasa presencia de manosa, lo que coincide con resultados previos de nuestro grupo de trabajo en glándulas salivales palatinas de aves (14). Estos resultados indican que sólo existen vestigios de glicoproteínas con uniones N-glucosídicas en las células mucosas de las glándulas palatinas humanas. No ocurre lo mismo con las células serosas de los acinos mixtos de las glándulas de Blandin y Nuhn, cuya fuerte marcación positiva demuestra su alto contenido en manosa, corroborado por el bloqueo de la lectina con su azúcar respectivo (15).

Nuestros resultados con UEA-1 en glándulas maduras, fueron similares a los obtenidos en glándulas de Blandin y Nuhn (15).

La lectina PNA reconoce fundamentalmente la secuencia β -D-galactosa (1 \rightarrow 3) D-N acetilgalactosamina. Su positividad se enmascara en células diferenciadas por la presencia de residuos de ácido siálico en posición terminal (10). Los sitios β -D-galactosa (1 \rightarrow 3) D-N acetilgalactosamina se exponen luego de remover los grupos sialil terminales con sialidasa (10).

Nosotros observamos que en las glándulas palatinas de adultos existía gran cantidad de células negativas frente a PNA, ricas en ácido siálico, lo que se corrobora con la digestión con sialidasa.

El ácido siálico previene la difusión bacteriana en tejidos infectados y contribuye al mantenimiento de la viscosidad de la saliva. Con grupos fuertemente ácidos, como los sulfato, lubrica y protege a los tractos respiratorio y digestivo (16).

La marcación lectinohistoquímica de las glándulas palatinas humanas en la presente investigación evidencia el predominio de uniones O-glucosídicas sobre las N-glucosídicas.



CONCLUSIONES

- Las lectinas se unen a los azúcares de los acinos mucosos desde edades tempranas del desarrollo prenatal, con intensidad de marcación, débil a fuerte, según la edad y la lectina empleada, posiblemente relacionada con la síntesis de diferentes glucosustancias por diferentes células mucosas en momentos diferentes a través de glucosiltransferasas genéticamente determinadas. Esto posibilita identificar subpoblaciones celulares que, frente a PAS y Alcian blue se colorean homogéneamente.

- La secreción de glucoconjugados se inicia en etapas tempranas del desarrollo prenatal, compuesta por una variedad de azúcares con un papel fundamental en los periodos prenatales y postnatales.

- Las modificaciones etarias de los residuos azúcares en glándulas palatinas humanas nos informan sobre su histofisiología y sobre potenciales cambios durante el envejecimiento y procesos patológicos de las glándulas salivales maduras.

REFERENCIAS

1. Slomiany B L, Murty V L, Piotrowski J M, Slomiany A: Salivary mucins in oral mucosal defense. *Gen Pharmacol* 1996, 27: 761-771.
2. Niew Amerongen A V, Bolscher J G, Veerman E C: Salivary mucins: Protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology* 1995, 5: 733-740
3. Tabak L: In defense of the oral cavity. Structure, biosynthesis and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol* 1995, 57: 547-564.
4. Garret J, Proctor G, Zhang X, Shori D, Schulte B A: Use of lectin-probes for correlative histochemical and biochemical assessment of the glycosylation patterns of secretory proteins, including kallikreins, in salivary glands and saliva. *Histol Histopathol* 1996, 11: 503-512.
5. Pinkstaff C: The cytology of the salivary glands. *Int. Rev. Cytol.* 1980, 63: 142-261.
6. Eversole L R: The histochemistry of mucosubstances in human minor salivary glands. *Archs Oral Biol* 1972, 17: 1225-1239.
7. Ferraris M E, Samar M E, Busso C, Avila R E, Ferraris R, Fabro S P: Prenatal development of human palatine glands: a structural and histochemical study. *Acta Odont Latinoamer* 1993, 7: 23-29.
8. Adi M M, Chisholm D M, Waterhouse J P: Histochemical study of lectin binding in the human fetal minor salivary glands. *J Oral Pathol Med* 1995, 24: 130-135.
9. Samar M E, Avila R E, Esteban Ruiz F: Técnicas histológicas. Fundamentos y aplicaciones. SeisC ed. Córdoba. 2000. p.109-117. 2º edición.
10. Samar M E, Avila R E, Massone A, Olmedo L, Marino F P: Modificaciones de los residuos azúcares en los glucoconjugados de las glándulas salivales linguales del pollo durante su desarrollo y crecimiento. *Analecta Vet* 2002, 22: 22-32.
11. Samar M E, Ferraris M E, Avila R E, Ferraris R, Fabro S. Morphogenesis of human lingual glands: A structural and histochemical study. *Acta Odont Latinoamer* 1986, 13: 81-88.
12. Samar M E, Avila R E, Ferraris M E, Ferraris R, Fabro S. Embryogeny of human labial glands: A structural, ultrastructural and histochemical study. *Acta Odont Latinoamer* 1993,7: 23-32.
13. Suprasert A, Fujioka T, Yamada K: Glycoconjugates in the secretory epithelium of the chicken mandibular glands. *Histochem J* 1986; 18: 115-121.
14. Samar M E, Avila R E, Esteban F, Olmedo L, Dettin L, Massone A, Pedrosa J A, Peinado M A: Histochemical and ultrastructural study of the chicken salivary palatine glands. *Acta Histochem* 2002, 104:199-207.
15. Fernández J, Samar M E, Avila R E, Fernández R, Rabino M: Glándulas linguales de Blandin y Nuhn: Estudio histoquímico de los glucoconjugados de las células serosas y mucosas. *Claves Odont* 2004, 56: 5-8.
16. Traving C, Schauer R: Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Biol* 1998, 54: 1330-1349.