

MODIFICACIONES DE LOS RESIDUOS AZUCARES EN LOS GLUCOCONJUGADOS DE LAS GLANDULAS SALIVALES LINGUALES DEL POLLO DURANTE SU DESARROLLO Y CRECIMIENTO

ME Samar¹, RE Avila², A Massone³, L Olmedo¹, FP Marino³

Departamento de Biología Bucal. Facultad de Odontología¹. II Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas². Universidad Nacional de Córdoba. Instituto de Patología Bernardo Epstein. Facultad de Ciencias Veterinarias³. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: En vista del escaso conocimiento sobre las secreciones de las glándulas salivales menores de las aves, el propósito del presente trabajo fue investigar la naturaleza y variaciones de la fracción hidrocarbonada en glándulas linguales del pollo durante su desarrollo embrionario y posnatal. Lenguas de embriones de 9 a 19 días, pollos recién nacidos y adultos se procesaron para PAS, Alcian blue y lectinohistoquímica. Los esbozos glandulares aparecieron en embriones de 9 días. Desde los 15 días apareció una secreción PAS positiva y alcianófila a pH 2.5, en glándulas linguales anteriores y posteriores. Desde los 19 días los glicosaminoglicanos sulfatados se localizaron en las células mucosas de las glándulas posteriores y aumentaron hasta la edad adulta. Por el contrario, los glicosaminoglicanos no sulfatados predominaron en las glándulas anteriores. La afinidad variable de estas glándulas con las diferentes lectinas dependió del tipo de lectina, edad del ave y fracción glandular. Nuestros resultados indican que: a) Los cambios histoquímicos se relacionan con el desarrollo y la maduración celular, cumpliendo probablemente algunos azúcares un rol en la inducción y regulación en las primeras etapas de la diferenciación glandular. b) La heterogeneidad del contenido de azúcares en las glándulas linguales anteriores y posteriores indicaría que cumplen diferentes funciones.

Palabras clave: embrión de pollo, lengua, glándulas salivales, glucoconjugados, histoquímica

CHANGES IN SUGAR RESIDUES OF GLYCOCONJUGATES OF CHICKEN SALIVARY LINGUAL GLANDS DURING DEVELOPMENT AND GROWTH

ABSTRACT: Taken into account the scarce data available regarding the secretions of avian minor salivary glands, we undertook to study the nature and the variations of the carbohydrates residues of glycoconjugates in the chicken lingual glands during embryonic life and postnatal growth. Tongues of 9 to 19 day chick embryos, post-hatched and adult chickens were analyzed by H/E, PAS, Alcian blue and lectin histochemistry. At the 9th day of incubation, primordia of the lingual glands were observed. From the 15th day, an appreciable degree of reactivity with PAS, Alcian blue and lectin histochemistry was detected at the cells of anterior and posterior lingual glands. From the 19th day of incubation sulfated glycosaminoglycans were located in mucous cells of the posterior lingual glands, which showed an increase in stainability till adult chickens. On the contrary, nonsulfated glycosaminoglycan were predominant in the anterior lingual glands. Lectin staining depended on the lectin type that was applied, but also on the age and glandular part both in anterior and posterior lingual glands. The results showed that the degree of histochemical changes depends upon the stage of differentiation and maturation of the glands; some sugar residues seemed to play a role inducing and regulating the first differentiate steps of the glands. Differences in sugar content, in both anterior and posterior lingual glands would indicate their various roles.

Key words: chick embryo, tongue, salivary glands, glycoconjugates, histochemistry.

Fecha de recepción: 13/11/02

Fecha de aprobación: 19/03/03

Dirección para correspondencia: M E Samar Departamento de Biología Bucal. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. Catamarca 1546 (5000). Córdoba. Fax 54 351 4334126.

E-mail: msamar@latinmail.com

INTRODUCCIÓN

Las lectinas son carbohidratos unidos a proteínas, de origen no inmune, que aglutinan y/o precipitan glucoconjugados, permitiendo la identificación, localización y diferenciación *in situ* de los carbohidratos tisulares con especificidad y selectividad importantes, tanto en tejidos normales como patológicos y constituyéndose en pruebas histoquímicas sensibles para definir cambios en el comportamiento celular (1).

Las lectinas marcadas han sido usadas ampliamente en cortes histológicos de glándulas salivales para estudiar el patrón de glicosilación de los glucoconjugados de los gránulos secretorios en células parenquimatosas de una gran variedad de especies (2). Estos estudios han demostrado una considerable heterogeneidad en la glicosilación de las proteínas de las glándulas salivales.

En investigaciones previas realizadas en glándulas salivales de aves adultas con hábitos alimenticios diferentes demostramos su gran desarrollo y el predominio de mucinas con uniones O-glicosídicas, relacionadas con funciones protectoras adicionales a las de lubricación y transporte de los alimentos (3, 12).

Por otro lado, tanto en aves como en mamíferos, incluyendo la especie humana, los glucoconjugados de las glándulas salivales menores han sido poco estudiados durante el desarrollo embrionario (13, 15).

Basándonos en estos antecedentes y teniendo en cuenta que ocurren cambios en la estructura química, cantidad y distribución de los carbohidratos de los glucoconjugados durante la diferenciación y maduración celular, el propósito del presente trabajo fue investigar y comparar en un modelo animal (las glándulas salivales linguales del pollo durante la embriogénesis y desarrollo postnatal) las modificaciones de los residuos azúcares con una batería de lectinas biotiniladas. Este estudio nos permitió obtener una mayor información sobre la fisiología celular y también sobre potenciales cambios patológicos en las glándulas salivales adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron las glándulas salivales linguales anteriores y posteriores de:

- Embriones de pollo de 8 a 19 días de incubación
- Pollos recién nacidos y de hasta 7 días de

edad.

- Pollos adultos.

Los embriones y animales empleados eran de raza Cobb's White Rock, provenientes de una granja local (Paraje Pajas Blancas, Provincia de Córdoba, Argentina).

Se disecaron las lenguas y se procesaron para los siguientes estudios (16):

· **Estudio estructural e histoquímica convencional:** las muestras se fijaron en formol al 10% a pH 7,4 en buffer de fosfato. Posteriormente se procesaron según la técnica de rutina de inclusión en parafina y se realizaron cortes seriados de cada muestra, de 5 μ m de espesor, los que se colorearon con hematoxilina y eosina, PAS y Alcian blue a pH 2,5 y 1,0.

· **Lectinohistoquímica:** Se utilizaron siete lectinas biotiniladas y se empleó el método de avidina-biotina (Vectastain Elite, Vector Labs, Inc. Burlingame CA, USA). En la Tabla 1 se indica la especificidad por los hidratos de carbono, abreviatura y concentración utilizada de cada lectina.

· **Procedimiento:** Cortes de lengua de 3 mm de espesor se montaron en portaobjetos recubiertos con polilisina, se desparafinizaron e hidrataron por pasajes en xilol y etanol en concentraciones decrecientes. La peroxidasa endógena fue bloqueada por tratamiento con H_2O_2 al 3% en metanol. La tinción inespecífica de fondo se redujo cubriendo las muestras con albúmina bovina al 0,1% por 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con lectinas biotiniladas. Posteriormente, se adicionó una solución del complejo avidina-biotina peroxidasa preparada según indicaciones de su fabricante, durante 30 min a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa se reveló con solución de diaminobencidina (20 mg por 100 ml de TRIS buffer). Se realizó la lectura con dos observadores, en forma independiente y los resultados comparados, graduándose la intensidad de la reacción cromogénica en un esquema cualitativo según la siguiente escala: -: negativa, +: positiva débil, ++: positiva moderada, +++: positiva fuerte. Se realizó un doble control negativo, bloqueándose las lectinas por el azúcar respectivo y sustituyendo las lectinas por solución fisiológica (16).

· **Digestión con sialidasa:** El ácido siálico fue removido tratando algunos cortes con una solución de buffer acetato 0,25 mol/l, a pH 5,5 con-

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

Table 1: Lectins used in histochemical studies

Lectina nombre en latín (common name)	Abreviatura	Residuo azúcar específico	Concentración µg/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 → 3) D-N- acetilgalactosamina	10
<i>Ulex europaeus</i>	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>α-D-galactosa	30

teniendo 0,1 unidad/ml de sialidasa Tipo X de *Clostridium perfringens* (Sigma), 5,0 mmol/l de Ca₂Cl y 154 mmol/l de NaCl, durante 18 h 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 (17).

RESULTADOS

Observaciones morfológicas e histoquímicas: Desde los 9 días del desarrollo *in ovo* se observó en las regiones anterior y posterior de la lengua la proliferación de numerosos brotes epiteliales compactos no ramificados, que crecían hacia el mesénquima subyacente (Fig. 1A). Estos brotes continuaban su expansión y entre los 12 y 13 días se elongaban aún más y comenzaban a ramificarse. Desde los 14 días se inició la formación de la luz glandular. Se observó además que el proceso de ramificación era bien manifiesto. Desde los 15 días se incrementó el tamaño y la cantidad de acinos, los que comenzaban la secreción de glucoproteínas PAS positivas y alcianofílicas a pH 2,5. No se observaron diferencias estructurales ni histoquímicas cuando se compararon las glándulas

linguales anteriores (GLA) y posteriores (GLP) (Fig. 1C y D). Las glándulas en desarrollo incrementaron su tamaño, lo que fue bien evidente a los 19 días. A esta edad la luz acinar era manifiesta y estaba revestida en las GLA por células seromucosas con material PAS positivo distribuido principalmente en el citoplasma apical y predominio de glicosaminoglicanos ácidos no sulfatados fuertemente coloreados con Alcian blue a pH 2,5 (Fig. 2A y C). Por el contrario, en las GLP se observaron células mucosas secretoras de glucoproteínas fuertemente PAS reactivas y de glicosaminoglicanos ácidos sulfatados y no sulfatados, como se demostró con Alcian blue a pH 2,5 y 1,0 (Fig. 2B y D).

En pollos recién nacidos y hasta la edad de 7 días las características estructurales de las GLA y GLP eran semejantes a las observadas en embriones de 19 días de incubación. Las células mucosas presentaban mayor cantidad de glucoproteínas, con una intensa coloración en todo el citoplasma tanto con PAS como con Alcian blue a los diferentes grados de acidez. Las células seromucosas presentaban una reacción positiva con

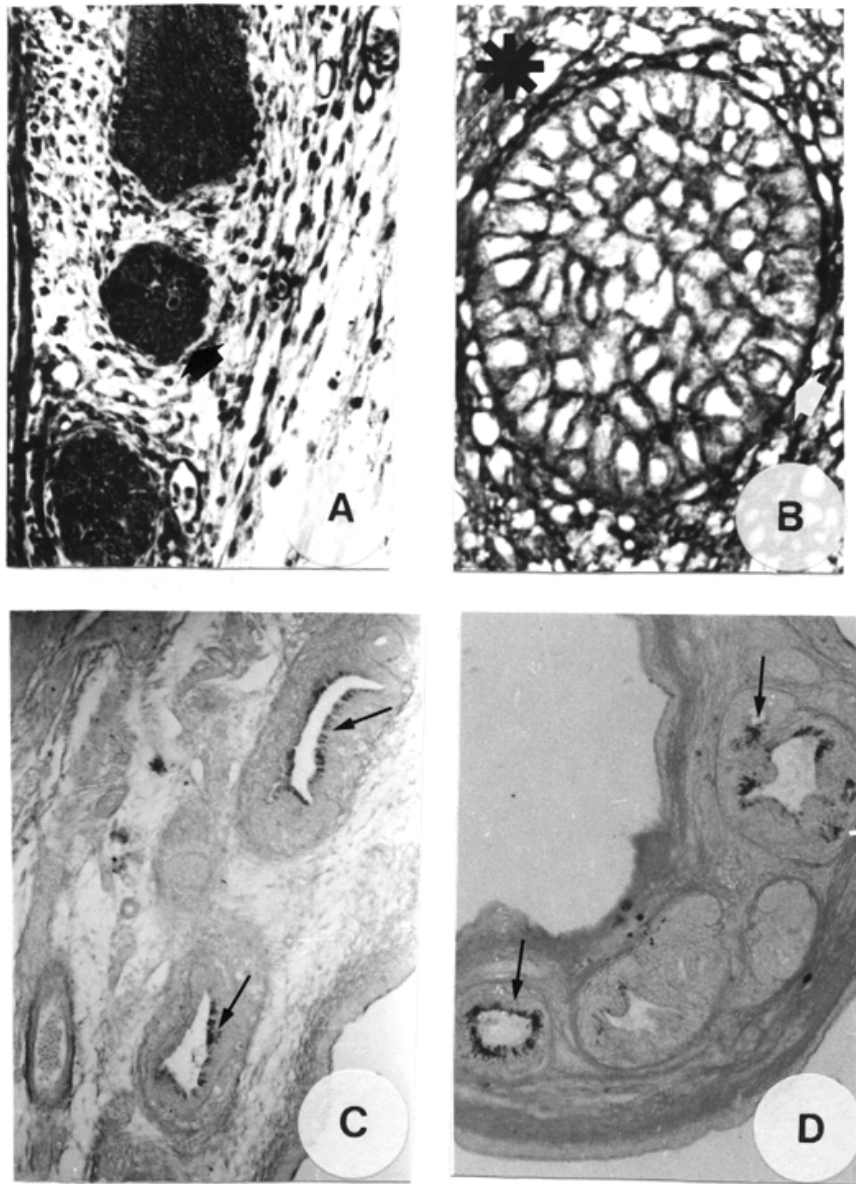


Figura 1: Glándulas linguales de embrión de pollo. A- Embrión de pollo de 9 días de desarrollo: Se señala (flecha) el inicio de la formación glandular en la región anterior de la lengua, con proliferación de brotes epiteliales en el interior del mesénquima. Coloración H/E. 200x. B- Embrión de pollo de 9 días de desarrollo: Esbozo glandular de la región posterior de la lengua con membranas basales (flecha) y mesénquima circundante (asterisco) intensamente PNA reactivos. Lectina PNA. 400x. C- Embrión de pollo de 15 días de desarrollo: Glándulas linguales anteriores en desarrollo. Se observa el inicio de secreción PAS positiva (flecha). Coloración PAS. 100x. D- Embrión de pollo de 15 días de desarrollo: esbozos de glándulas linguales posteriores. Se señala (flecha) la secreción de glucoconjugados PAS positivos al igual que lo observado en las glándulas linguales anteriores. Coloración PAS. 100x.

Figure 1: Chick embryo lingual glands. A- 9th day of incubation. Primordia of the anterior glands appear as epithelial buds (arrow) extended into the mesenchyme. H/E stain. X200. B- 9th day of incubation. Epithelial buds of posterior lingua glands. The basement membranes (arrow) and the mesenchyme (asterisk) show strong reactivity with PNA. Lectin PNA. X400. C- 15th day of incubation. Developing anterior lingual glands. The synthesis of PAS positive secretions begins (star). PAS stain. X100. D- 15th day of incubation. Developing posterior lingual glands. Glycoconjugates PAS positives (arrow). PAS stain. X100.

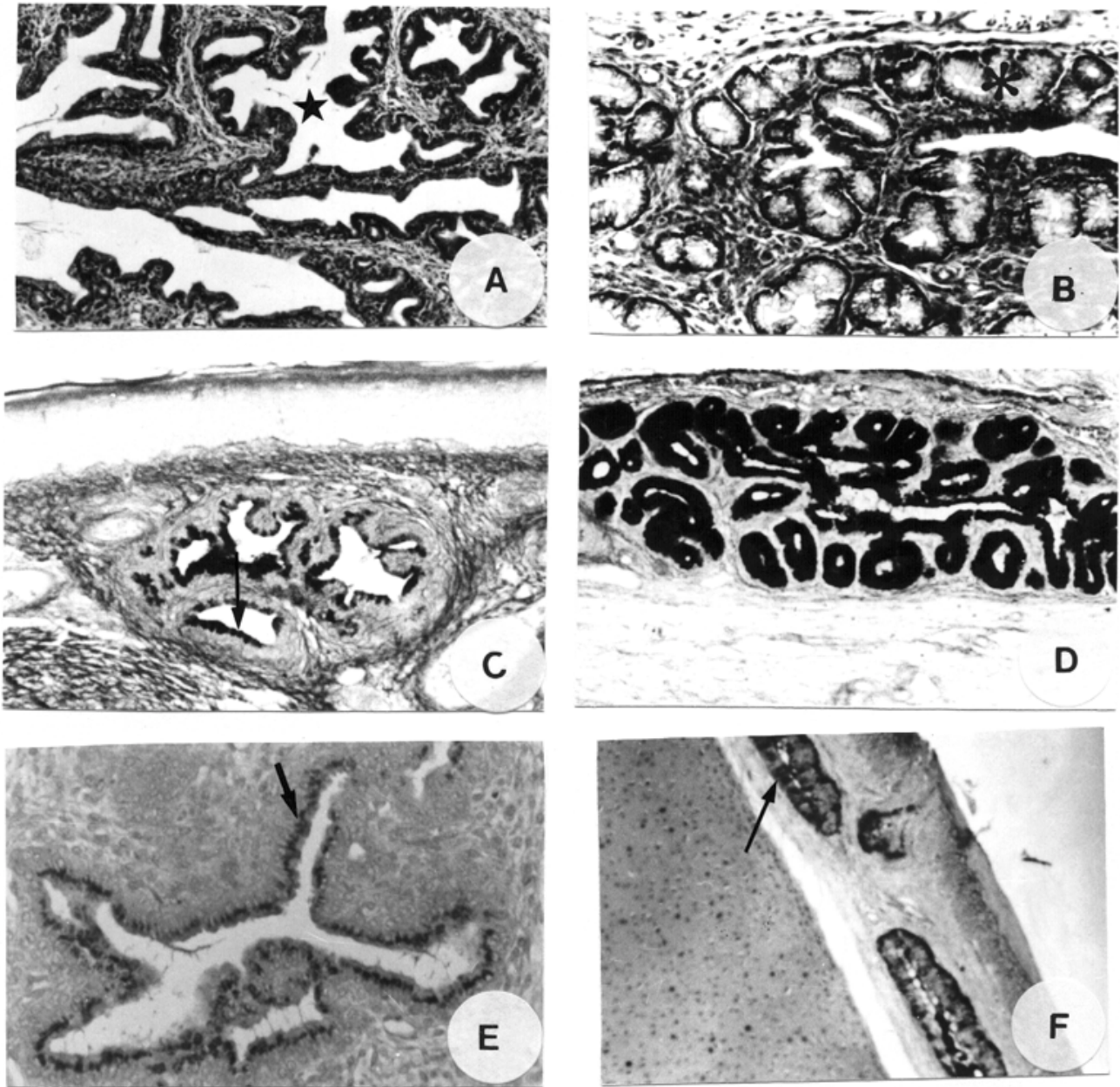


Figura 2: Glándulas linguales de pollo recién nacido A-Glándulas linguales anteriores (estrella) revestidas por células seromucosas. Coloración H/E. 200x. B- Glándulas linguales posteriores (asterisco) donde se observa el epitelio glandular formado por células mucosas. Coloración H/E. 200x. C- Glándulas linguales anteriores. Células seromucosas con glucoconjugados PAS positivos en el citoplasma apical. Coloración PAS.200x. D-Glándulas linguales posteriores. Células mucosas repletas de glucoconjugados PAS positivos. Coloración PAS. 200x. E- Glándulas linguales anteriores. Epitelio glandular fuertemente reactivo con la lectina SBA. 400x. F- Glándulas linguales posteriores. Se observan células mucosas con moderada reactividad entre células fuertemente reactivas (flecha). Lectina RCA-I. 200x.

Figure 2: Post-hatching chicken lingual glands A- Anterior lingual glands (star) coated by seromucous epithelium. H/E stain. X200. B- Posterior lingual glands (asterisk) with secretory epithelium consisting of mucous cells. H/E stain. X200. C- Anterior lingual glands. Seromucous cells showing apical PAS positivity. PAS stain. X200. D- Posterior lingual glands. PAS stained section showing intense staining of the cytoplasm of mucous cells. PAS stain. X200. E- Anterior lingual glands. The cells of glandular epithelium show strong reactivity with SBA lectin. Lectin SBA. X200. F- Posterior lingual glands. Mucous cells subpopulations showing moderate and intense reaction (arrow). Lectin RCA-I. X200.

PAS y Alcian blue, especialmente a pH 2,5, con menor cantidad de glucoconjugados distribuidos en el citoplasma apical. En pollos adultos todas las glándulas presentaban una estructura túbulo alveolar ramificada. El epitelio secretorio de las GLA era cuboideo, con núcleos esféricos y moderadamente basófilo. Algunas células reaccionaban débilmente con el PAS y Alcian blue a los diferentes pH, mientras que otros mostraban PAS positividad y alcianofilia apicales intensas, especialmente a pH 2,5 (Fig. 3A). En las GLP predominaban las células mucosas que se coloreaban fuertemente con PAS (Fig. 3B) y Alcian blue a pH 2,5 y 1,0.

Las mucinas fueron sensibles a la sialidasa, como lo reveló la coloración de Alcian blue a pH 2,5 con y sin tratamiento enzimático previo.

Lectinohistoquímica:

Lectina PNA: Desde los 9 días de incubación tanto la superficie de las células de los esbozos de las GLA como de las GLP mostraron una débil reactividad a esta lectina, que es específica para el disacárido β D-galactosa-(1 \rightarrow 3) D-N-acetilgalactosamina. Se observó un grado de reactividad intenso en el mesénquima y las membranas basales que rodeaban a los esbozos glandulares (Fig. 1B). A los 15 días de incubación apareció una reactividad moderada en la región apical subluminal de algunas células acinares, mientras que otras eran negativas y sólo se coloreaban cuando los cortes se trataron previamente con sialidasa. Desde los 18 días de incubación y hasta los 7 días posteriores al nacimiento en las GLA los acinos eran moderadamente positivos, mientras que en las GLP algunas células y acinos eran negativos, otros presentaban una reacción positiva moderada con un glucocaliz intensamente positivo. Después de la digestión con sialidasa las estructuras negativas reaccionaron con PNA. En pollos adultos las GLA contenían células fuertemente positivas entre células negativas que se positivizaron con sialidasa (Fig. 3C). En las GLP se observó una mayor cantidad de células no reactivas, entre pocas células de positividad moderada a fuerte. El tratamiento enzimático previo con sialidasa acrecentó la afinidad de las células negativas por PNA.

Lectina ConA: Las cubiertas celulares de los esbozos glandulares se colorearon de manera moderada entre los 9 y 14 días de incubación con ConA, que muestra predilección por oligosacáridos con alto contenido de azúcar α -D-manosa. En embriones de 15 días se observaron escasos gránulos subluminales que reaccionaban de manera moderada tanto en GLA como GLP. En embriones

de 19 días y hasta los 7 días posteriores a la eclosión la reactividad del citoplasma era moderada siendo más intensa en la secreción vertida en la luz de las GLA y más débil en las GLP. En pollos adultos sólo el estroma periglandular y el glicocáliz de las células secretoras eran moderadamente positivos frente a ConA, observándose una negativización de los citoplasmas y de la secreción intraluminal.

Lectina RCA I : Las membranas basales y las cubiertas de membranas de los esbozos glandulares eran intensamente positivos al igual que el mesénquima en los especímenes de 9 a 15 días de incubación. Desde los 19 días de incubación y hasta la edad adulta se observaron células secretoras con moderada reactividad mezcladas con células fuertemente reactivas tanto en GLA como en GLP (Fig. 2F y 3D).

Lectina WGA: Hasta los 15 días de incubación sólo reaccionaron moderadamente las membranas basales de las células que formaban los esbozos glandulares. A partir de esta edad se detectó una fuerte reacción apical en las células de las glándulas en desarrollo. Desde los 19 días de incubación y hasta los 7 días posteriores al nacimiento se fue incrementando la reactividad en el contenido luminal de las GLA. En GLP escasas células positivas moderadas se distribuían entre las células negativas. Los pollos adultos presentaron, en ambos grupos glandulares, células negativas y células que se colorearon con diferentes intensidades, siendo la secreción intraluminal moderadamente positiva.

Lectina DBA: Desde los 9 hasta los 14 días las membranas basales y cubiertas celulares de las glándulas en desarrollo eran débilmente positivas. Por el contrario, las células resultaron negativas. En GLA y GLP de embriones de 15 días de desarrollo, la región apical de las células contenía granulaciones que se coloreaban con una fuerte reactividad. Entre los 19 días de desarrollo embrionario y los 7 días de edad, las GLA contenían material intracelular fuertemente positivo. En las GLP, por el contrario, las células eran negativas, presentando algunas una fuerte reactividad infranuclear. Desde el mes de edad en las GLA abundantes células fuerte y moderadamente reactivas se entremezclaban con pocas células débilmente coloreadas y negativas. El patrón de coloración en las GLP era diferente ya que predominaron las células negativas o débilmente positivas sobre pocas células intensamente coloreadas. La secreción era negativa.

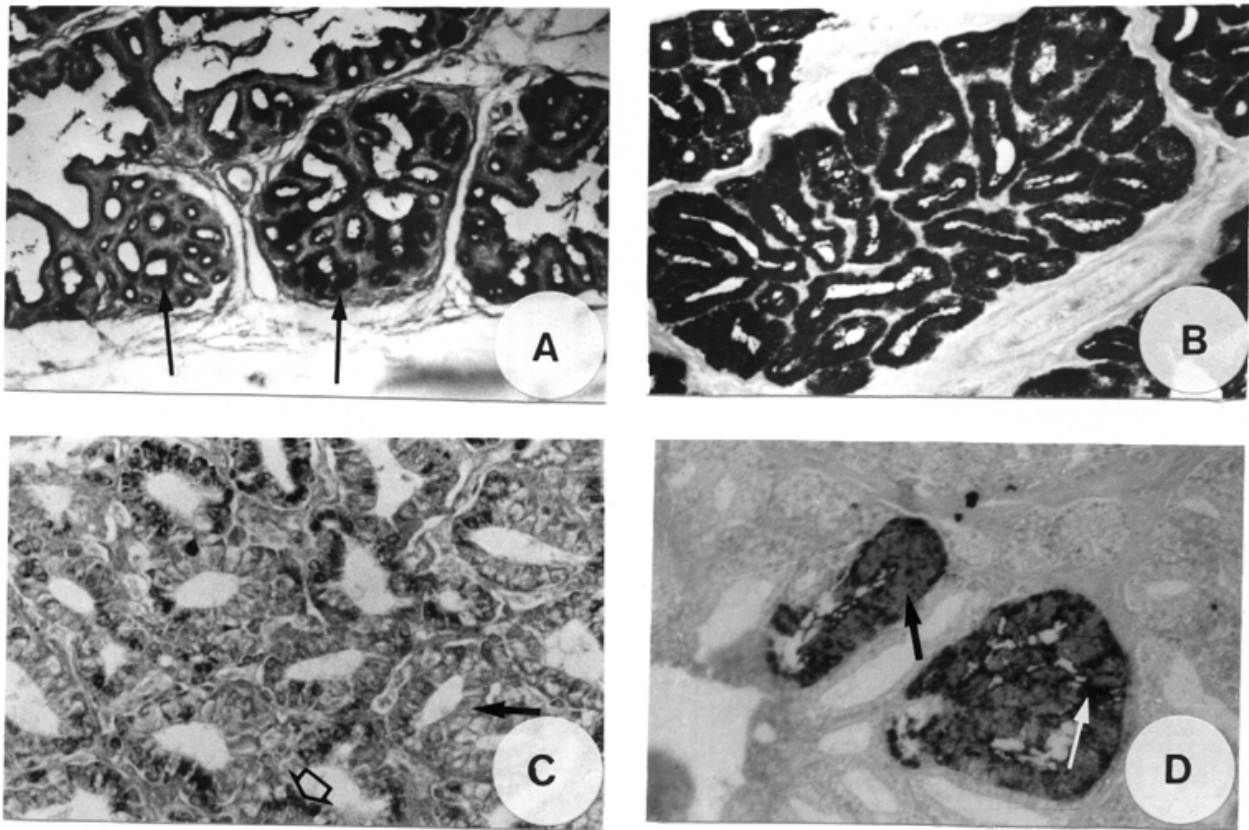


Figura 3: Glándulas linguales de pollo adulto. A- Glándulas linguales anteriores. Células seromucosas con citoplasma heterogéneamente PAS reactivo (flecha). Coloración PAS y contraste con tricrómico de Van Gieson. 200x. B- Glándulas linguales posteriores. Células mucosas que se colorean fuertemente con PAS. Coloración PAS. 200x. C- Glándulas linguales anteriores. Células seromucosas fuertemente positivas (flecha blanca) dispuestas entre células no reactivas (flecha negra). Lectina PNA. 400x. D- Glándulas linguales posteriores. Células mucosas con reactividad moderada (flecha fina) y fuerte (flecha gruesa). Lectina RCA-I. 400x.

Figure 3: Adult chicken lingual glands A- Anterior lingual glands. Seromucous cells that stained different with PAS (arrow). PAS/Van Gieson. X200. B- Posterior lingual glands. Mucous cells. PAS positivity was intense in cytoplasm. PAS stain. X200. C- Anterior lingual glands. Seromucous cells. PNA lectin reactivity is either strongly present (white arrow) or completely absent (black arrow). X400. D- Posterior lingual glands. Mucous cells. Moderately positive (thin arrow) and strongly positive (thick arrow) cells. Lectin RCA-I. X400.

Lectina SBA: Entre los 9 y 15 días la reacción observada era similar a lo descrito para DBA. En embriones de 19 días y pollos hasta los 7 días de edad las GLA y GLP reaccionaron de manera semejante, con citoplasmas intensamente coloreados y secreción con positividad moderada (Fig. 2E). Las diferencias se observaron en pollos adultos, donde las GLP presentaban mayor cantidad de células negativas cuando se las comparó con las GLA.

Lectina UEA 1: La reacción fue negativa en todos los grupos etáreos pre y posnatales en GLA y GLP.

Los resultados se resumen en la Tabla 2.

DISCUSIÓN

En el presente estudio las glándulas linguales del pollo fueron estudiadas con métodos histoquímicos durante su desarrollo y maduración.

Con las técnicas histoquímicas convencionales (Alcian blue y PAS) comprobamos que la secreción de glucoconjugados comienza en GLA y GLP a los 15 días del desarrollo *in ovo*, edad que coincide con la secreción de mucosustancias en las glándulas palatinas y en el proventrículo (estómago glandular) de esta especie (18-19). Posiblemente, en este período, en el que aumenta la secreción de ácido clorhídrico (20), la producción de mucinas por diferentes glándulas del aparato digestivo sea necesaria no sólo para la protección

TABLA 2: Glándulas linguales de pollo. Intensidad de reacción frente a las lectinas en los diferentes grupos etarios.

Table 2: Chicken salivary lingual glands. Staining intensities for lectin binding of different groups.

LECTINA	GLANDULAS LINGUALES ANTERIORES				GLANDULAS LINGUALES POSTERIORES			
	Embriones 9-14 días	Embriones 15-19 días	Recién nacidos a 7 días	Adultos	Embriones 9-14 días	Embriones 15-19 días	Recién nacidos a 7 días	Adultos
ConA	-	++	++	-	-	++	++	-
UEA-1	-	-	-	-	-	-	-	-
RCA-1	-	*++/+++	*++/+++ +	*++/+++	-	*++/+++	*++/+++	*++/+++
WGA	-	+++	+++	*- /+/+/+++	-	+++	*-/++	*- /+/+/+++
DBA	-	+++	+++	*+++/+/+ /-	-	+++	*-/+++	*-/+/+++
SBA	-	+++	+++	*+/-	-	+++	+++	*-/++
PNA	-	*+/-	++	*+/-	-	*+/-	*-/++	*-/+/+++

Los resultados están dados en las siguientes unidades: - (reacción negativa), + (positivo débil), ++ (positivo moderado), +++ (positivo intenso). El asterisco indica la reacción predominante.

de la mucosa, sino también para el inicio de otras funciones asociadas con la absorción.

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 o no específica de la cavidad oral formando una cubierta mucosa lubricante y demulcente y una barrera semipermeable contra la desecación y agresiones externas (21). 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. También es probable que la elevada acidez de los grupos sulfato, demostrados con Alcian blue, comience a preparar a la cavidad oral en etapas embrionarias contra la proliferación de gérmenes patógenos (22). Se ha sugerido que en fetos humanos las glándulas salivales menores secretan mucosustancias que actuarían a través del líquido amniótico contra sustancias producidas por los sistemas urinario y digestivo en desarrollo (13).

En embriones de 9 a 12 días la positividad con lectinas RCA 1, PNA, ConA, WGA por la presencia de residuos de azúcares tales como β -D-galactosa (1 \rightarrow 3) D-N-acetilgalactosamina; α -D-N-acetil D-glucosamina, α -D-manosa en la superficie celular de los primordios glandulares sugiere un rol desempeñado por estos azúcares en la inducción y regulación de la diferenciación celular

como se describió en sistemas de diferenciación, tales como epidermis, mesonefros, corazón y sistema nervioso en el embrión de pollo. Las lectinas PNA y WGA marcan azúcares en el mesénquima y las membranas basales que juegan un rol importante en la regulación de los intercambios epitelio/mesénquima durante las primeras etapas del desarrollo glandular. Debido a su breve permanencia en estos sitios se consideran oligosacáridos transitorios (17).

La identificación de escasos sitios ConA positivos en las glándulas linguales de embriones de pollo y en la etapa posnatal temprana indica la escasa presencia de residuos manosa y glucosa como ya fuera descrito en glándulas salivales de *Coturnix coturnix japonica* (23). En pollos adultos nosotros hemos observado que junto a la maduración glandular desaparece la marcación para manosa, corroborado por el bloqueo de la lectina por su azúcar respectivo. Este hallazgo coincide con nuestros resultados en glándulas palatinas de la misma especie (6) y es indicativo de la ausencia de glucoproteínas con uniones N-glucosídicas en las secreciones de las glándulas linguales de esta especie. No ocurre así en otras especies que incluyen al hombre, donde se ha observado que la manosa junto a ácido siálico son los principales constituyentes de las glucoproteínas secretadas por las glándulas salivales (24).

La marcación de estas glándulas evidencia el predominio de glucoproteínas con uniones O-

glucosídicas, que presentan α -D-N-acetilgalactosamina. Por el contrario, Suprasert et al. (22) encontraron con la lectina ConA importantes cantidades de residuos manosa y glucosa en glándulas mandibulares de pollo, resultado de la posible existencia de subpoblaciones celulares funcionalmente diferentes cuando se comparan las distintas glándulas salivales de esta especie.

Por otro lado, la lectina PNA reconoce fundamentalmente la secuencia β -D-galactosa (1 \rightarrow 3) D-N-acetilgalactosamina, presente en muchas membranas glucoproteicas y secreciones celulares. Normalmente, la positividad se encuentra enmascarada por residuos de ácido siálico en células diferenciadas (12). Los sitios β D-galactosa (1 \rightarrow 3) D-N-acetilgalactosamina sólo pueden ser expuestos después de la remoción de los residuos sialil terminales por acción de la sialidasa (16).

Nosotros observamos que las GLA de pollos adultos presentan mayor cantidad de acinos reactivos frente a PNA que las GLP. En consecuencia, se deduce que las GLP contienen una importante cantidad de células maduras ricas en ácido siálico, lo que se corrobora con la digestión enzimática con sialidasa. Los resultados observados por nosotros con UEA I y PNA difieren de los de Menghi et al. (25) ya que estos autores describen en las GLA de pollo la presencia de ácido siálico y fucosa, asociados con funciones lubricantes y de defensa celular.

El ácido siálico cumple una diversidad de funciones biológicas. Entre estas funciones merece destacarse la importancia de su presencia para prevenir la difusión de las bacterias en tejidos infectados. Además, contribuye a la viscosidad de la saliva y junto a los grupos sulfato (mencionados anteriormente) cumpliría un papel fundamental en la lubricación y la protección de los tractos digestivo y respiratorio (25, 26).

Con DBA y SBA comprobamos que con el proceso de maduración de las GLP se produce una disminución de células que reaccionan de manera positiva, lo que sugiere que disminuyen los residuos de α -N-acetilgalactosamina.

Suprasert y Fujioka (25) estudiaron las glándulas del esófago de pollos adultos con distintas lectinas. Las células mucosas de esas glándulas mostraron una marcación semejante a lo observado por nosotros en las glándulas linguales de pollos adultos, a excepción de ConA. Esta lectina dio una marcación de moderada a fuerte en las glándulas esofágicas lo que indica diferencias fun-

cionales topográficas entre las células mucosas de las glándulas del sistema digestivo.

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que las lectinas se unen a los azúcares de las células secretoras glandulares tanto en GLA como GLP a partir de los 15 días del desarrollo embrionario, exhibiendo diferentes grados de coloración, en una escala cualitativa de débil a fuerte, dependiendo de la edad del espécimen, del tipo de lectina y de la región glandular, lo cual podría ser el resultado de:

La síntesis de diferentes glucosustancias por diferentes células acinares en diferentes momentos por medio de glucosiltransferasas genéticamente determinadas. Por consiguiente, se pueden identificar poblaciones celulares heterogéneas, las que se colorean homogéneamente con la histoquímica convencional prelectina (PAS, Alcian blue).

Las modificaciones en el ciclo secretor donde todas las células de una glándula y aún todas las células de un mismo adenómero no se encuentran secretando simultáneamente, también produciría la heterogeneidad en la marcación lectinohistoquímica. Esto ya fue descrito por Adi et al. (13) en glándulas salivales menores fetales humanas.

Finalmente, las variaciones observadas durante el desarrollo y maduración glandular demuestran que la secreción comienza en edades tempranas del desarrollo embrionario y está formada por diferentes azúcares que cumplirían un importante rol en los periodos pre y posnatales.

AGRADECIMIENTO

Grant SECYT bianual Resolución 194/00 y 104/02 (Universidad Nacional de Córdoba).

BIBLIOGRAFÍA

1. Damjanov I. Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab Invest 1987; 57: 5-20
2. Garret J, Proctor G, Zhang X, Shori D, Schulte BA. 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
3. Samar ME, Avila RE, Grunberg K, Fabro S, Ferraris ME. Glándulas bucales del pollo (*Gallus domesticus*): Aspectos morfohistoquímicos. Rev Bras Biol 1993; 53 (1): 55 - 62
4. Samar ME, Avila RE, Fabro S. Histofisiología de las glándulas salivales de aves con distintos regímenes alimentarios. Rev Fac Cienc Méd Univ Nac Córdoba 1993; 51: 35 - 40

5. Samar ME, Avila RE, Fabro S, Centurión C. Structural and cytochemical study of salivary glands in the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) and the kelp gull (*Larus dominicanus*). Marine Ornithol 1995; 23: 2-6
6. Samar ME, Avila RE, Fonseca MI, Porfirio V, Rabino M. Lectin histochemistry of glycoconjugates in chicken palatine glands. Com Biol 1996; 14: 78
7. Samar ME, Avila RE, Portal H, Porfirio V, Fonseca MI. Glándulas salivales de chimango (*Milvago chimango*) y halconcito común (*Falco sparverius*). (Aves: *Falconidae*): Aspectos morfohistoquímicos. Rev Asoc Cienc Nat Litoral 1996; 27 (2): 127 - 135
8. Samar ME., Avila RE, Fabro S, Fonseca Pérez MI. Estudio estructural y morfométrico de las glándulas salivales de gorrión (*Passer domesticus*) durante invierno y verano. Rev Fac Odont Córdoba 1997; 23/25: 79 - 90
9. Samar ME., Avila RE, Porfirio V, Rabino M. Histofisiología de las glándulas salivales de *Netta peposaca* (Aves: *Anatidae*). Natura Neotropicalis 1997; 28 (2): 11-17.
10. Samar ME, Avila RE, Fabro S, Porfirio V, Esteban F, Pedrosa JA, Peinado MA. Histochemical study of Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) minor salivary glands during postnatal growth. Anat Rec 1999; 254 (1): 298-306.
11. Samar ME, Avila RE, Olmedo L, Dettin L. Ultrastructural analysis of minor salivary glands in *Milvago chimango* (Vieillot, 1816). Acta Microscop 1999; 8, suppl. 8 :188-189.
12. Samar ME, Avila RE, Esteban F, Olmedo L, Dettin L, Massone A, Pedrosa JA, Peinado MA. Histochemical and ultrastructural study of the chicken salivary palatine glands. Acta Histochem. 2002; 104:199-207.
13. Adi MM, Chisholm DM, Waterhouse JP. Histochemical study of lectin binding in the human fetal minor salivary glands. J Oral Pathol Med 1995; 24: 130-135.
14. Samar ME, Ferraris ME, Avila RE, Ferraris R, Fabro S. Morphogenesis of human lingual glands: A structural and histochemical study. Acta Odont Latinoamer 1986; 13 (3-4): 81-88.
15. Samar ME, Avila RE, Ferraris ME, Ferraris R, Fabro S. Embryogeny of human labial glands: A structural, ultrastructural and histochemical study. Acta Odont Latinoamer 1993; 7 (2): 23-32.
16. Samar ME, Avila RE, Esteban Ruiz F. Técnicas histológicas. Fundamentos y aplicaciones. 2da. Edición. SeisC ed. Córdoba (Argentina). 2000; p.109-117.
17. Gheri Bryk S, Gheri G, Sgambati E, Orlandini GE. Histochemical detection of sugar residues in chick embryo developing lingual glands with horseradish-peroxidase conjugated lectins. Acta Histochem 1992; 92: 127-137.
18. Samar ME, Avila RE, Portal H, Porfirio V, Rabino M. Development and differentiation of the salivary palatine glands in the chick embryo. Com Biol 1996; 14: 196.
19. Altamirano F, Avila RE, Samar ME, Fabro S. Cytochemical characterization of mucosubstances in the chick glandular stomach (proventriculus) during embryonary and posnatal development. Folia Histochem Cytobiol 1984; 22: 173-180
20. Toner PG. Development of the acid secretory potential in the chick embryo proventriculus. J Anat 1965; 99: 389-398.
21. Amerongen AV, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary mucins: Protective functions in relation to their diversity. Glycobiology 1995; 5: 733-740.
22. Suprasert A, Fujioka T, Yamada K. Glycoconjugates in the secretory epithelium of the chicken mandibular glands. Histochem J 1986; 18: 115 - 121
23. Menghi G, Scocco P, Ceccarelli P. Basic and lectin histochemistry for studying glycoconjugates in the lingual salivary glands of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Archs Oral Biol 1993; 38 (7): 649 - 655.
24. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. J Oral Pathol Med 1982; 11:1-17.
25. Menghi G, Ceccarelli P, Scocco P, Pedini V. The chicken anterior lingual glands: structural study of carbohydrates chains by lectins and glycosidases. Archs Oral Biol 1992; 37 (6): 463-469.
26. Suprasert A, Fujioka T. Lectin histochemistry of glycoconjugates in esophageal mucous glands of the chicken. Jpn J Vet Sci 1987; 49 (3): 555-557.