



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

Identificación de células caliciformes en la conjuntiva del cerdo

Presentado por: Lorena Jiménez Hernández

Tutelado por: Yolanda Diebold Luque

Tipo de TFG: Revisión Investigación

En Valladolid a 03, de Junio de 2014

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad de Valladolid su propuesta de trabajo fin de grado para el grado en Óptica y Optometría y al coordinador de la asignatura, el Dr. Raúl Martín Herranz, encargado de asignar todos los trabajos.

Mi trabajo era de investigación y necesitaba un laboratorio y diverso material para llevarlo a cabo. Por eso agradezco al IOBA y al Grupo de Superficie Ocular que me hayan permitido realizarlo en sus laboratorios y proporcionado el material necesario.

Gracias al matadero Justino Gutiérrez S.L de Valladolid por haber donado los globos oculares de cerdo adulto, al matadero de Opciporc de El Barco de Ávila y a su veterinario, Ricardo Sánchez Sánchez, por haberme proporcionado los globos oculares de cerdo joven y ayudarme en la extracción de los mismos.

Por último, quiero agradecer a Antonio López García, técnico de laboratorio del Grupo de Superficie Ocular del IOBA, que ha realizado el procesamiento de los globos oculares y me ha enseñado cada técnica histológica realizada en este trabajo, así como todos los aspectos básicos relacionados con el trabajo en un laboratorio. Y finalmente, a la Dra. Yolanda Diebold Luque, mi tutora, que ha tenido la idea de este TFG que tanto me ha gustado y con el que he aprendido, y la persona que me ha ido guiando y corrigiendo día a día en la realización del mismo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	5
MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
TEJIDOS.....	6
TINCIONES.....	6
TINCIÓN DE PAS.....	6
TINCIÓN CON AZUL ALCIÁN.....	7
TINCIÓN COMBINADA.....	7
LECTINAS.....	8
FOTOGRAFÍA Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	8
RESULTADOS.....	9
CERDO PRE-ADULTO.....	9
TINCIÓN DE PAS.....	9
TINCIÓN CON AZUL ALCIÁN.....	9
TINCIÓN COMBINADA.....	9
LECTINAS.....	9
ANÁLISIS.....	10
CERDO 25 DÍAS.....	12
TINCIÓN DE PAS.....	12
TINCIÓN CON AZUL ALCIÁN.....	12
TINCIÓN COMBINADA.....	12
LECTINAS.....	12
ANÁLISIS.....	13
COMPARACIÓN CERDO PRE-ADULTO VS CERDO 25 DÍAS.....	15
DISCUSIÓN.....	16
CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18

RESUMEN

A pesar de la importancia de la conjuntiva y de las células caliciformes secretoras de moco presentes en ella, no se han encontrado referencias en la literatura que describan el carácter de dichas células en el cerdo.

Para determinar el carácter de la secreción de las células caliciformes en la conjuntiva del cerdo se realizaron tres tinciones convencionales (PAS, AA y PAS/AA) y dos lectinas (HPA y PNA) en cerdo pre-adulto y cerdo de 25 días.

Se determinó que el carácter de las secreciones de las células caliciformes en la conjuntiva del cerdo no es único. Durante las primeras etapas es prácticamente en su totalidad ácido, con una tinción óptima para las lectinas HPA y PNA. Cuando el cerdo es pre-adulto los mucopolisacáridos evolucionan hacia un carácter más básico, aunque seguían siendo predominantes las secreciones ácidas. Su respuesta ante la tinción con la lectina HPA aumentó y la tinción con la PNA disminuyó en la conjuntiva del cerdo pre-adulto.

PALABRAS CLAVE

Célula caliciforme, conjuntiva, ojo, cerdo, mucina, tejido mucoso, tinción, lectinas.

SUMMARY

Despite the importance of the conjunctiva and of the mucus secreting goblet cells present therein, no reports have been found in literature describing the nature of those secretions in the pig.

In order to determine the nature of goblet cells secretory products in the conjunctiva of the pig, three conventional stains have been applied (PAS, AA and PAS/AA) and two lectins (PNA and HPA) in adolescent pigs and 25 day old pigs.

It was established that the nature of the secretions of goblet cells in the conjunctiva of the pig is not unique. During the early stages it is almost completely acid with optimal staining for PNA and HPA lectins. When animals grow older (adolescent pigs), mucopolysaccharides evolved towards a more basic nature, although acid secretions still predominated in goblet cells. The HPA lectin staining increased and PNA staining decreased in the conjunctiva of the adolescent pig.

KEY WORDS

Goblet cell, conjunctiva, porcine, eye, mucin, mucosal tissue, staining, lectins.

INTRODUCCIÓN

La lágrima es el líquido que cubre la superficie ocular. Está formada por tres elementos (lipídico, acuoso y mucoso), organizados como un gel mucocacuoso con complejas y numerosas funciones [1].

Durante mucho tiempo se estudiaron los componentes de la capa acuosa por sus propiedades antibacterianas. Sin embargo, hoy en día ha cobrado protagonismo la capa mucosa ya que, además de las propiedades antibacterianas de las mucinas que la componen, juega un papel muy importante en la ruptura de la película lagrimal. Es por ello interesante el estudio de la producción, la secreción y la función de las mucinas para poder prevenir enfermedades infecciosas o inflamatorias, como el Síndrome de Ojo Seco [2].

La capa mucosa no es una capa de la lágrima como tal, pues se encuentra anclada al epitelio y está presente en numerosas superficies mucosas de mamíferos, como el sistema gastrointestinal, el tracto urogenital y el tracto respiratorio, donde juega un papel importante en la hidratación, lubricación y como barrera ante patógenos del epitelio subyacente.

En el ojo, las células caliciformes son las principales células secretoras de mucinas en el epitelio conjuntival. Durante el parpadeo sus secreciones funcionan como lubricante del epitelio superficial ocular, estabilizan la película lagrimal y actúan de barrera frente a patógenos. Las alteraciones en la secreción de las células caliciformes conducen a una película lagrimal inestable y a una superficie ocular vulnerable. La pérdida de células caliciformes se ha relacionado con varias enfermedades inflamatorias entre las que destaca el Síndrome de Sjögren [3].

El cerdo es uno de los modelos animales utilizados en investigación por su similitud con el ser humano. Existen diferentes estudios acerca de la conjuntiva del tracto digestivo y del respiratorio de este animal [4], [5] y [6]. Además, se ha llevado a cabo la reconstrucción del suelo orbitario de ratones a partir de una pequeña parte de submucosa intestinal [7] y la reconstrucción en conejos con defectos parciales limbares a partir de estroma limbar acelular porcino [8].

El globo ocular porcino ha sido objeto de diversas investigaciones, por ello están descritos los parámetros de la mayoría de sus tejidos (esclera, córnea, cristalino, etc.) [9]. Algunos autores se han preocupado por estudiar el coeficiente de permeabilidad de diversos fármacos en distintos tejidos oculares del cerdo, destacando la conjuntiva, y su comparación con otras especies [10].

Sin embargo, sorprende no encontrar en la literatura artículos que describan la conjuntiva del ojo porcino como ocurre con otras especies usadas en investigación ocular, como el cobaya, sobre el que se dispone de una detallada descripción de las células caliciformes, su recuento y su densidad [11].

JUSTIFICACIÓN

El gran valor de los tejidos humanos y las limitaciones éticas en la obtención y su uso en investigación hacen que existan diferentes modelos animales utilizados en investigación.

El cerdo es uno de los mamíferos utilizados por la ciencia debido a su parecido en muchas de sus estructuras con el ser humano.

En muchas investigaciones en las que se usa el globo ocular porcino la conjuntiva se ha retirado, lo que puede explicar que no exista una descripción detallada de dicha estructura. Hace algunos años, no se le daba demasiada importancia al tejido conjuntival, pero en la actualidad se sabe la importancia que tiene para el buen funcionamiento de la superficie ocular y la repercusión de sus alteraciones en muchas enfermedades.

Como se ha citado anteriormente, las células caliciformes de la conjuntiva son las principales productoras de mucinas y su estudio es importante en diversas patologías.

Es de gran ayuda la caracterización de las diferentes estructuras oculares para que los investigadores puedan elegir el modelo animal correcto a utilizar en cada experimento. Las células caliciformes de la conjuntiva humana tienen mucopolisacáridos de carácter básico, tienen un marcaje intenso de las lectinas HPA y PNA y se encuentran de forma individual a lo largo del epitelio. Sin embargo, en los ratones el carácter de los mucopolisacáridos es ácido y las células se encuentran agrupadas a lo largo de la conjuntiva. Por ello, el propósito de este trabajo es estudiar las características de las células caliciformes de la conjuntiva del cerdo.

HIPÓTESIS

Es posible identificar y estudiar las células caliciformes de la conjuntiva porcina mediante tinciones histológicas. Además, es previsible que sus características sean más parecidas a las de las células caliciformes humanas que a las de roedores.

OBJETIVOS

- 1) Determinar la presencia y distribución de las células caliciformes en la conjuntiva ocular de cerdo pre-adulto y de 25 días.
- 2) Identificar las células caliciformes con tres tinciones histológicas convencionales y dos tinciones con lectinas.
- 3) Comparar los resultados de las tres tinciones convencionales y de las lectinas obtenidos en cerdo pre-adulto y de 25 días.

MATERIAL Y MÉTODOS

TEJIDOS

El globo ocular (n=1) del cerdo pre-adulto (5-6 meses) fue extraído y proporcionado por el matadero Justino Gutiérrez S.L (Valladolid) y el procesamiento lo llevó a cabo el Grupo de Superficie Ocular del IOBA. Se entregó en secciones de tejido de 4µm en portaobjetos, ya preparados para comenzar las tinciones. El globo sólo conservaba la conjuntiva bulbar.

La extracción de los dos globos oculares del cerdo de 25 días se llevó a cabo en el matadero Opciporc (El Barco de Ávila) con la colaboración del veterinario responsable del centro. Se realizó un corte sobre la piel del animal siguiendo un recorrido similar al de la órbita en su parte más externa; de esta forma los párpados permanecen unidos al globo ocular y se conserva mayor cantidad de conjuntiva. Las muestras fueron introducidas en una solución fijadora de formaldehído tamponado al 10% para su posterior procesamiento.

Una vez fijados los globos oculares, se sacaron del fijador para limpiarlos, recortando la grasa orbitaria. Se realizó un corte longitudinal obteniendo cuatro partes (dos de cada ojo) que se introdujeron en cajetillas. Estos recipientes se introdujeron en el procesador automático de tejidos (LEICA ASP 300), que es capaz de cambiar el agua del tejido por parafina en 36 horas.

Finalizado el procesamiento de deshidratación del tejido, se introdujo en una cubeta en la que se añadió parafina y se dejó secar. El resultado fue cuatro cubos de parafina en los que se encuentran la mitad de cada globo ocular.

Se utilizó el microtomo tipo MINOT (MICROM HM 340F) para cortar los bloques en secciones de 4µm y se colocaron dos cortes en cada portaobjetos para llevar a cabo las tinciones correspondientes.

TINCIONES

El primer paso antes de comenzar cualquier tinción fue desparafinar, para lo cual el tejido debe permanecer un mínimo de 4h en la estufa a 60°C. A continuación, los tejidos se introdujeron en tres pasos de xileno y otros tres de alcoholes de diferentes concentraciones para terminar el proceso en agua. De esta forma el tejido quedó hidratado.

Cuando el tejido se desparafinó se realizaron las tinciones. Se llevaron a cabo 4 técnicas histoquímicas para evaluar el carácter de los mucopolisacáridos producidos por las células caliciformes.

TINCIÓN DE PAS

La tinción de PAS (*Periodic Acid Schiff*) permite identificar mucopolisacáridos neutros. Utiliza el ácido periódico de Schiff para reaccionar con los grupos hidroxilo de los carbohidratos. Se añade ácido peryódico al tejido y éste oxida los enlaces de carbono que contienen grupos hidroxilo. Esta reacción da como resultado la formación de grupos aldehídos que reaccionan

con el reactivo de Schiff dando un color rosa intenso. Para finalizar se tiñen los núcleos con hematoxilina.

Para realizar esta técnica se siguió el protocolo correspondiente para la tinción PAS. Tras hidratar el tejido se añadió el ácido peryódico y se lavó con agua corriente. El reactivo de Schiff actuó durante 40 min, se lavó y se tiñeron los núcleos con hematoxilina.

Esta tinción será PAS+ cuando los mucopolisacáridos de las células caliciformes sean neutros y se observarán de color rosa intenso. Será PAS- si el carácter de dichos compuestos es ácido, pues el ácido peryódico no es capaz de oxidarlos. Los núcleos se observarán de color morado [12].

TINCIÓN CON AZUL ALCIÁN

El azul alcián (AA) revela la presencia de mucopolisacáridos ácidos. Se pueden obtener diferentes marcajes variando el pH:

- pH 2.5: mucopolisacáridos ácidos (sulfatados y carboxilos).
- pH 1: solo se tiñen los mucopolisacáridos ácidos sulfatados.
- pH 0.5: sólo se tiñen los mucopolisacáridos ácidos fuertemente sulfatados.

El AA (pH 2.5), compuesto de carga positiva, es atraído por estructuras negativas. Sin embargo, su volumen hace que su difusión sea muy lenta en las regiones menos permeables de los tejidos y, por lo tanto, no identifica estructuras altamente negativas como la cromatina o la sustancia de Nissel.

Siguiendo el protocolo de AA, se añadió ácido acético sobre el tejido y tras él, el AA. El AA actuó durante 30 min. Por último, tras una serie de lavados con agua corriente y destilada, se contratiñeron los núcleos con hematoxilina.

La tinción será AA+ cuando las células queden teñidas de azul turquesa y los núcleos de morado [13].

TINCIÓN COMBINADA

Esta tinción (PAS/AA) es una mezcla de las dos anteriores, por un lado actúa el reactivo de Schiff y por el otro el AA. Por lo tanto, la descripción de la técnica es la misma que la especificada anteriormente para el PAS y el AA.

Respetando el protocolo se comenzó con el ácido acético y el AA. Se lavó correctamente y se añadió el ácido peryódico seguido del reactivo de Schiff. Por último, después de una serie de lavados y antes de contrateñir con hematoxilina se impregnó con metabisulfito sódico.

Con esta tinción combinada se pueden observar células caliciformes teñidas de rosa (carácter neutro), células caliciformes marcadas en azul (mucopolisacáridos ácidos) y los núcleos de color morado.

En las tres tinciones anteriores, previamente a la observación de los resultados, se deshidrató el tejido. El proceso fue el inverso al del

desparafinado, comenzando por el agua, luego alcoholes y finalizando en xileno. El tejido se montó con permount y se dejó secar.

Los resultados de las técnicas anteriores se observaron en un microscopio óptico (OLYMPUS BH2).

LECTINAS

Las lectinas son un grupo de proteínas vegetales capaces de unirse de forma específica y reversible a carbohidratos. Estas proteínas contienen dos sitios de unión lo que hace que puedan unirse a un azúcar específico o a una molécula glicosilada [14], [15] y [16].

Se utilizaron dos lectinas, derivadas de *Helix pomatia* (HPA) y de *Arachis hypogaea* (PNA). Ambas estaban ya marcadas con una molécula fluorescente para permitir la identificación mediante microscopía de fluorescencia.

Se desenmascaró el tejido con tripsina (0,5g/ml) y tras una serie de lavados se dejó actuar cada lectina (1:500) a oscuras. Se lavaron las preparaciones con PBS y se tiñeron los núcleos con Hoesch (1:1000). En este caso, no fue necesario deshidratar el tejido, pues una vez excitadas las moléculas fluorescentes en el microscopio no se puede conservar la preparación. Por ello, las preparaciones se montaron en un medio acuoso.

El resultado se vio con un microscopio de fluorescencia invertido (LEICA DMI 6000 B). Las células caliciformes con marcaje positivo para cierta lectina serán verdes y los núcleos azules.

FOTOGRAFÍA Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Todas las tinciones se repitieron 3 veces, como mínimo.

Se tomaron fotografías de las tinciones convencionales en el microscopio óptico con diferentes aumentos: 4x, 10x, 40x, 60x. Y de las lectinas en el microscopio de fluorescencia invertido con aumentos de 10x, 20x y 40x.

Se contaron las células caliciformes totales en la porción de conjuntiva bulbar de cerdo pre-adulto. En el caso del cerdo de 25 días el conteo se realizó en el fondo de saco inferior de ambos ojos. Se realizó en esta zona porque era la parte mejor conservada del tejido; no obstante, el análisis y la toma de fotografías se llevó a cabo a lo largo de toda la conjuntiva.

Para comparar las tinciones convencionales y las lectinas se usó el término de colocalización, refiriéndose éste a las células que respondían positivamente a las tinciones convencionales y a las lectinas. Es decir, se introdujeron en el grupo de colocalización aquellas células que se tiñeron con PAS o AA y además de con HPA o PNA.

RESULTADOS

CERDO PRE-ADULTO

TINCIÓN DE PAS

En el cerdo pre-adulto, en las primeras tinciones realizadas con PAS no se encontró positividad alguna. Sin embargo, dejando más tiempo de actuación al reactivo de Schiff que el indicado por el protocolo (10 minutos más), se consiguió una tinción de baja intensidad de las células caliciformes. Los núcleos se observaron en color morado y las células caliciformes en un color rosa más pálido que el característico de esta técnica.

TINCIÓN CON AZUL ALCIÁN

La tinción con AA mostró gran positividad en todas las pruebas realizadas. Se observaron células caliciformes teñidas de azul turquesa y los núcleos de color morado.

TINCIÓN COMBINADA

En la combinación de las técnicas anteriores el número de células teñidas de azul fue bastante superior al teñido de rosa. El azul fue más oscuro que en la técnica AA, el rosa continuó siendo pálido y los núcleos de color morado.

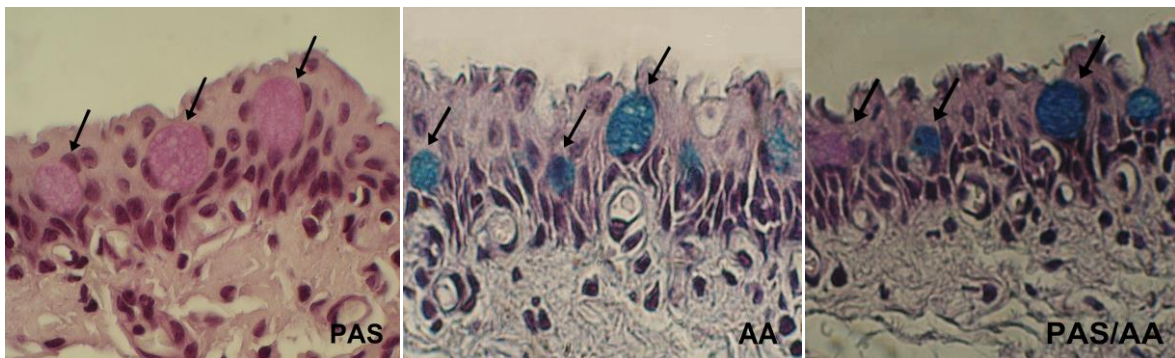


Figura 1: PAS. Células caliciformes (flechas negras) en color rosa, núcleos color morado. Aumentos: 40X.

Figura 2: AA. Células caliciformes (flechas negras) en color azul turquesa, núcleos color morado. Aumentos: 40X.

Figura 3: PAS/AA. Células caliciformes (flechas negras) en color azul oscuro y rosa pálido. Núcleos color morado. Aumentos: 40X.

Con las tres tinciones se identificaron células caliciformes individuales, no agrupadas.

LECTINAS

Con la lectina HPA los resultados fueron variados. La intensidad del verde varió de unas células a otras y no siguió patrón alguno. Se observaron células marcadas casi completamente, células que solo expresaban positividad en su contorno y otras que apenas tenían color verde. Toda la superficie del epitelio tenía una lámina incompleta que se teñía intensamente. Los núcleos se observaron en azul.

Las células caliciformes no se marcaron con la lectina PNA. Sin embargo, si había un verde residual a lo largo de todo el epitelio y los núcleos se observaron azules.

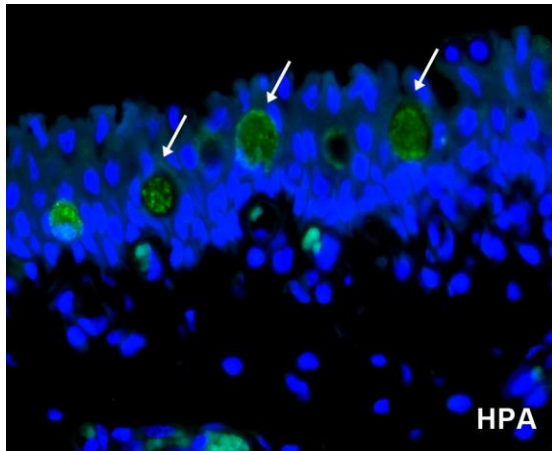


Figura 4: Lectina HPA. Células caliciformes (flechas blancas) en verde, núcleos en azul. Aumentos: 20X.

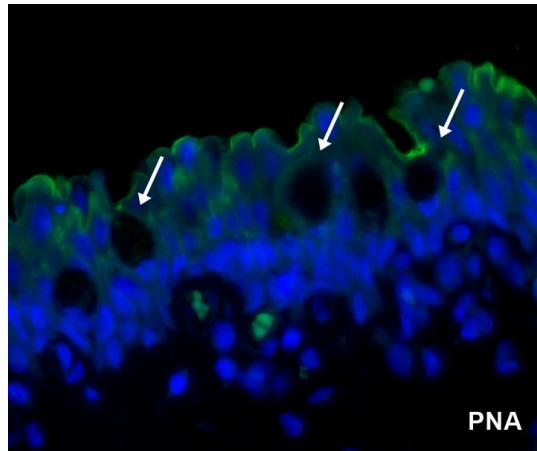


Figura 5: Lectina PNA. Células caliciformes (flechas blancas) en negro, núcleos en azul. Aumentos: 20X.

ANÁLISIS

Como los cortes de tejido eran seriados, se contaron las células caliciformes que se identificaban en cada tinción y las que resultan positivas para cada tinción convencional y para la lectina HPA. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 1: resumen del conteo de células caliciformes del cerdo adulto, marcadas en cada tinción y la colocalización.

Pre-adulto (PAS/AA)		Pre-adulto (Lectina)		Pre-adulto (colocalización)	
PAS+	3	HPA	13	PAS+/HPA	1
AA+	14	PNA	0	AA+/HPA	6
TOTAL	17		13		7
TOTAL CÉL. CALICIFORMES					23

PAS: tinción con PAS.

AA: tinción con Azul Alcán.

HPA: Lectina *Helix pomatia agglutinin*.

PNA: Lectina *Peanut agglutinin*.

En la tabla se muestra el número total de células caliciformes halladas en la conjuntiva bulbar del cerdo pre-adulto. Además, se puede observar un conteo por cada técnica PAS/AA, lectina HPA y lectina PNA. Se compararon las células que mostraron positividad en la tinción PAS/AA con las de la lectina HPA. No se incluyó la colocación de PAS/AA con la lectina PNA por la falta de positividad de esta última tinción.

A continuación, el gráfico presenta los porcentajes, del carácter de las células caliciformes estudiadas, calculados sobre el número de células total:

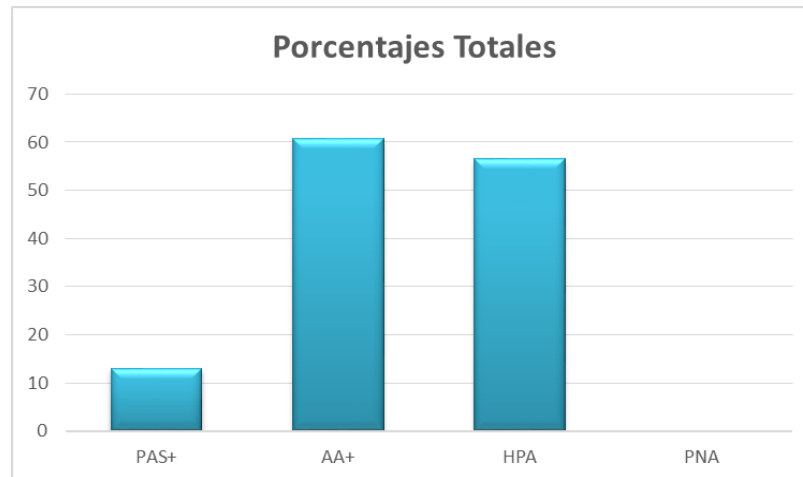


Figura 6: Gráfica de porcentajes totales del conteo de células caliciformes de cerdo adulto en las diferentes técnicas realizadas.

Entorno a un 13% de las células totales de la conjuntiva bulbar resultaron PAS+, un 60% con AA+, el 56% quedaron marcadas con lectina HPA y no se encontró positividad para el caso de la lectina PNA.

Por último, se representa el porcentaje de colocación PAS/AA con la lectina HPA.

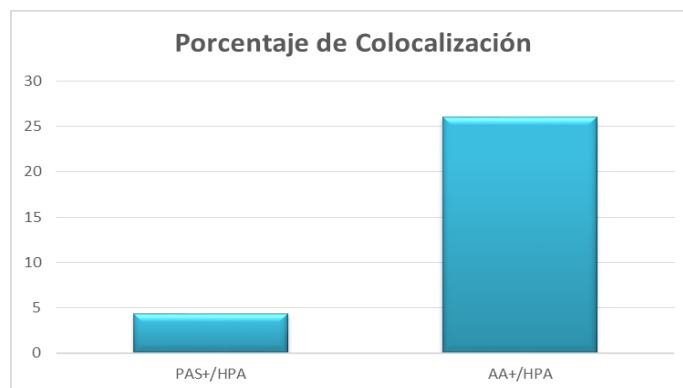


Figura 7: Gráfica de porcentaje total de colocación entre PAS/AA y lectina HPA.

El 4% de las células PAS+ se marcaron con la lectina HPA, mientras que un 26% de las AA+ presentaron positividad para la lectina HPA.

CERDO 25 DÍAS

TINCIÓN DE PAS

Con la tinción de PAS las células caliciformes del cerdo de 25 días apenas mostraron positividad. No apareció el color rosa característico de esta tinción en ninguna de las pruebas. Si se analiza con mucho detalle podría haber restos de un rosa muy pálido. Los núcleos se tiñeron de morado.

TINCIÓN CON AZUL ALCIÁN

En este caso, las células caliciformes mostraron bastante positividad, apareciendo teñidas en azul turquesa y los núcleos en morado. Además, reveló un azul residual a lo largo de la superficie de toda la conjuntiva.

TINCIÓN COMBINADA

En esta tinción, la mayor parte de las células se tiñeron de azul, siendo un azul muy parecido al obtenido en AA. Fue difícil apreciar alguna célula marcada con PAS y en este caso el rosa era muy tenue, apenas se diferenciaba del resto del epitelio. Los núcleos se tiñeron de morado.

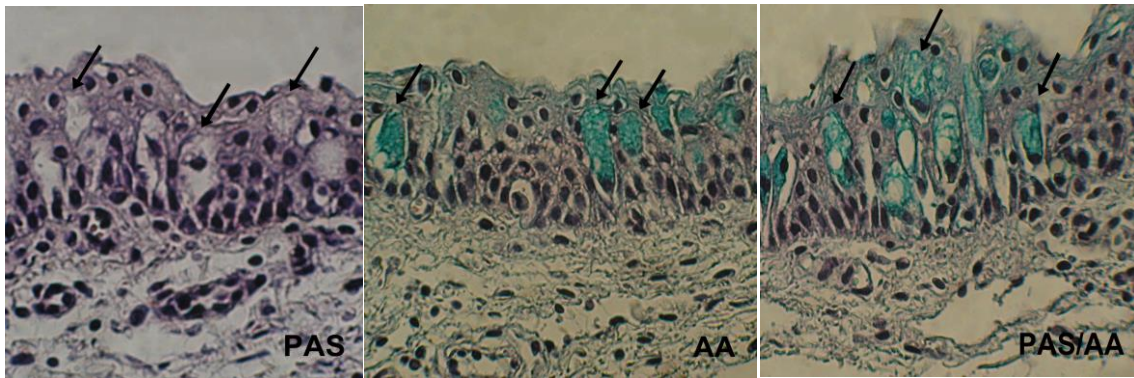


Figura 8: PAS. Células caliciformes (flechas negras) apenas teñidas. Núcleos en morado. Aumentos: 40X.

Figura 9: AA. Células caliciformes (flechas negras) azul turquesa. Núcleos en morado. Aumentos: 40X.

Figura 10: PAS/AA. Células caliciformes (flechas negras) azul turquesa. Núcleos en morado. Aumentos: 40X.

Como en el tejido del animal pre-adulto, se identificaron células caliciformes individuales, no agrupadas, con las tres tinciones, si bien estaban muy próximas entre sí.

LECTINAS

Aunque el marcaje con lectina HPA era bastante superior al de PNA, en ambos casos se pudieron observar las células caliciformes en verde y los núcleos en azul. En el caso de la HPA, se obtuvo un mayor número de células teñidas y con mayor intensidad que con la PNA.

Con las dos lectinas la intensidad y la distribución de la positividad fueron similares a lo largo de toda la conjuntiva. Se pudieron apreciar algunas células positivas situadas en la parte más basal del epitelio.

En ambos casos, el epitelio tenía una lámina incompleta por encima que se teñía intensamente de verde y podría ser restos de mucina secretada.

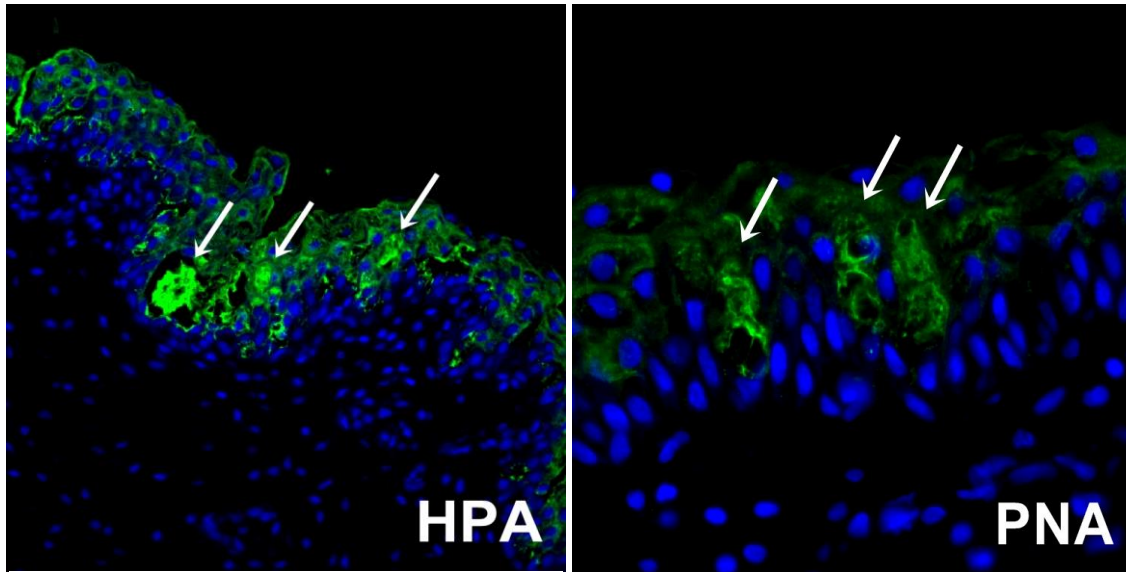


Figura 11: Lectina HPA. Células caliciformes (flechas blancas) en verde, núcleos en azul. Aumentos: 40X.

Figura 12: Lectina PNA. Células caliciformes (flechas blancas) en verde, núcleos en azul. Aumentos: 40X.

ANÁLISIS

El análisis en el cerdo de 25 días se realizó en el fondo de saco inferior de ambos ojos. Aunque el tejido conservaba la conjuntiva palpebral, tanto inferior como superior, y parte de la conjuntiva bulbar, el conteo de las células se llevó a cabo sobre la zona mencionada ya que era la zona mejor conservada.

A continuación se presentan las tablas que recogen el conteo de células caliciformes en el fondo de saco inferior del ojo derecho (OD) y del ojo izquierdo (OI).

Tabla 2: resumen del conteo de células caliciformes en la conjuntiva del fondo de saco del OD en el cerdo de 25 días, en cada tinción y la colocalización.

OD (PAS/AA)		OD (lectina)		OD HPA (colocalización)		OD PNA (colocalización)	
PAS+	1	HPA	14	PAS+/HPA	1	PAS+/PNA	0
AA+	16	PNA	7	AA+/HPA	5	AA+/PNA	3
TOTAL	17		21		6		3
TOTAL CÉL. CALICIFORMES							29

PAS: tinción con PAS.

AA: tinción con Azul Alcían.

HPA: Lectina *Helix pomatia agglutinin*.

PNA: Lectina *Peanut agglutinin*.

Tabla 3: resumen del conteaje de células caliciformes en la conjuntiva del fondo de saco del OI en el cerdo de 25 días, en cada tinción y la colocalización.

OI (PAS/AA)		OI (lectina)		OI HPA (colocalización)		OI PNA (colocalización)	
PAS+	1	HPA	10	PAS+/HPA	1	PAS+/PNA	0
AA+	10	PNA	5	AA+/HPA	3	AA+/PNA	2
TOTAL	11		15		4		2
TOTAL CÉL. CALICIFORMES							20

PAS: tinción con PAS.

AA: tinción con Azul Alcían.

HPA: Lectina *Helix pomatia agglutinin*.

PNA: Lectina *Peanut agglutinin*.

Las tablas recogen el conteaje de células caliciformes en las técnicas histológicas realizadas, PAS/AA, lectinas HPA y PNA, así como la colocalización entre PAS/AA y cada una de las lectinas.

Se representan dos gráficos con los porcentajes correspondientes al conteaje total anterior.

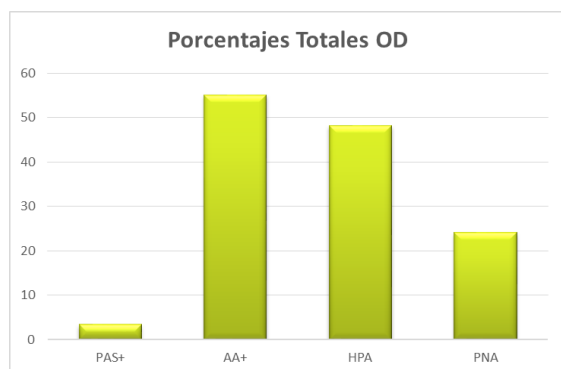


Figura 13: Gráfica de porcentajes totales del conteaje de células caliciformes en el cerdo de 25 días OD en las diferentes técnicas realizadas.

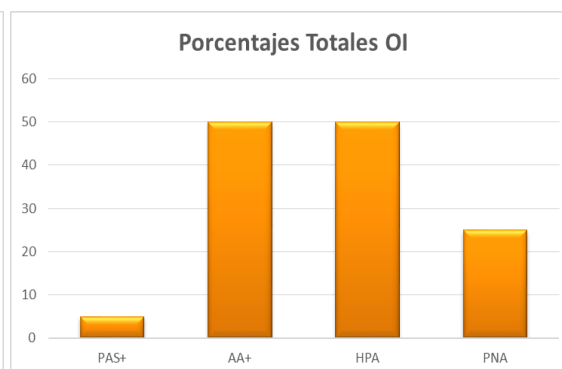


Figura 14: Gráfica de porcentajes totales del conteaje de células caliciformes en el cerdo de 25 días OI en las diferentes técnicas realizadas.

Observando las gráficas se puede apreciar que la distribución de los porcentajes es similar en ambos ojos.

En el ojo derecho un 55% de las células eran AA+ mientras que tan solo un 3.5% presentaron positividad para el PAS. En el caso de las lectinas un 48% fueron marcadas con HPA y un 24% con PNA.

El ojo izquierdo presentó un 50% de células positivas para el AA y un 5% para el PAS. En las lectinas, un 50% para HPA y un 25% para la PNA.

Se realizó el análisis de la colocalización comparando los porcentajes que muestran las siguientes gráficas:

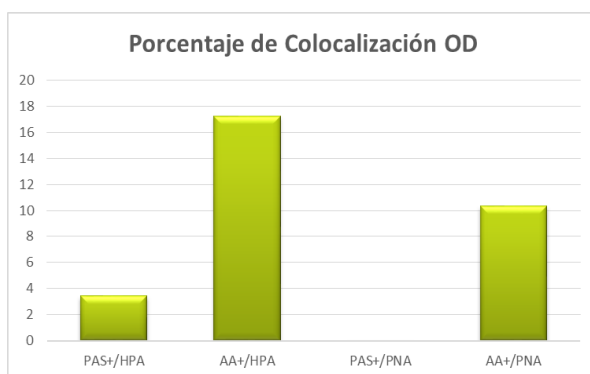


Figura 15: Gráfica de porcentaje total de colocalización OD entre PAS/AA y lectina HPA, y PAS/AA con lectina PNA.

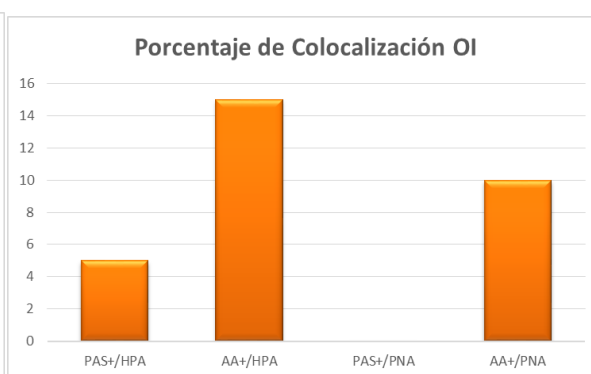


Figura 16: Gráfica de porcentaje total de colocalización OI entre PAS/AA y lectina HPA, y PAS/AA con lectina PNA.

Al igual que en el caso de los porcentajes totales, los porcentajes de colocalización tuvieron una distribución similar en ambos fondos de saco. La mayor colocalización se produjo entre el AA y la lectina HPA, siendo de un 17% en el OD y un 15% en el OI. Estos valores se reducen entorno a un 10% en ambos casos al comparar el AA con la lectina PNA. La colocalización entre las lectinas y el PAS fue mucho menor, siendo nula para la lectina PNA en ambos ojos.

COMPARACIÓN CERDO PRE-ADULTO VS CERDO 25 DÍAS

A pesar de las limitaciones del estudio, se realizó una comparación entre el cerdo pre-adulto y el cerdo de 25 días.

Parece que el carácter de las células caliciformes de la conjuntiva en ambos casos fue mayoritariamente ácido, al ser teñidas por AA. Sin embargo, existió diferencia en el PAS, que aunque en ambos era muy tenue, en el pre-adulto la tinción fue un poco más intensa. Esto se verificó en la combinación de ambas PAS/AA donde en el cerdo pre-adulto el azul era un poco más oscuro, mientras que en el cerdo de 25 días era prácticamente el mismo color obtenido en la tinción AA.

En cuanto a las lectinas, en ambas edades el marcaje de la lectina HPA fue superior al de la PNA, pero ofreció un marcaje casi totalmente negativo en el cerdo pre-adulto y en el cerdo de 25 días alcanzó valores entorno al 25%.

Por último, la colocalización de las tinciones de PAS y la lectina HPA es similar en ambas edades, siendo entre AA y HPA ligeramente superior en el cerdo pre-adulto. La colocalización con la lectina PNA solo existe en el cerdo de 25 días, pues en el adulto el marcaje con esta lectina está casi ausente.

DISCUSIÓN

En la hipótesis se planteaba la idea de encontrar células caliciformes en la conjuntiva porcina individuales, no agrupadas como en los roedores y con secreciones de carácter básico. Tras el estudio, se ha determinado que las células caliciformes aparecen individuales, pero sus secreciones son mayoritariamente de carácter ácido.

En el cerdo de menor edad (25 días) la mayoría de las células estaban marcadas con AA, por lo que su carácter es ácido. Parece que con el paso del tiempo las células modifican ligeramente la composición de su producto de secreción, cambiando hacia un carácter más básico, pues en la tinción de PAS se aprecia un rosa pálido. Además, este cambio se manifiesta muy bien en la combinación de PAS/AA, donde en el cerdo de 25 días el color azul de la tinción se mantiene del mismo tono turquesa que en la tinción con AA, mientras que para el cerdo pre-adulto se observa un cambio hacia un azul más oscuro en el PAS/AA. Esto se explicaría por una posible mezcla en las células del rosa del PAS con el azul del AA, o lo que es lo mismo, una mezcla de mucopolisacáridos básicos y ácidos.

En cuanto a la tinción con las lectinas, el cerdo joven presentó positividad tanto a la HPA como a la PNA; sin embargo, el cerdo pre-adulto aumenta su positividad con la HPA y disminuye el marcaje con PNA. Con la tinción con la lectina HPA en el cerdo de 25 días, se observó que las células teñidas estaban en la parte más basal de epitelio. Esto podría ser debido a una maduración tardía de estas células que aún no se hayan trasladado a la parte más superficial. Todo esto apoyaría la idea de que existe un cambio a lo largo de la vida del cerdo en el carácter de las células caliciformes de su conjuntiva ocular. Para confirmar esta hipótesis habría que hacer otros estudios mucho más completos.

Se pudo analizar la morfología y distribución de las células caliciformes en la conjuntiva del cerdo de 25 días porque se contó con casi la totalidad de la conjuntiva. Parece que no hay gran diferencia en la localización y distribución de las células caliciformes a lo largo de la conjuntiva bulbar frente a la conjuntiva palpebral, así como en la intensidad de las tinciones.

Para terminar, las limitaciones de este estudio hacen imposible una comparación adecuada entre las células caliciformes del cerdo de 25 días y el pre-adulto. Primero, porque sólo se disponía de conjuntiva bulbar en el ojo del animal pre-adulto. Además, sólo se disponía de tejido de un único animal de cada edad, aunque del animal de 25 días se usaron los dos ojos. También, se compararon distintas zonas de la conjuntiva, lo que no es del todo correcto. No obstante, estos resultados indicarían que el carácter de las secreciones de las células caliciformes en la conjuntiva del cerdo no es único y parece evolucionar entre los 25 días y los 6 meses de edad. Este trabajo preliminar abre la puerta a futuros estudios más completos sin las limitaciones indicadas.

CONCLUSIONES

La conjuntiva del cerdo tiene células caliciformes que se presentan de forma individual, no agrupadas, como en el ser humano, y producen mucopolisacáridos de carácter ácido que parecen cambiar a un carácter más básico entre los 25 días de edad y los 5-6 meses.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Teresa Mayorga M. Película lagrimal: estructura y funciones. Ciencia y Tecnología para la Salud Visual y Ocular. 2008;11:121-131.
- [2] Merindano M^a D, Lluch S, Julio G. Mucinas lagrimales (I) Estructura, clasificación, secreción y funciones. Ver y Oír. 2008;25:224-237.
- [3] Contreras-Ruiz L, Ghosh-Mitra A, Shatos MA, Dartt DA, Masli S. Modulation of Conjunctival Goblet Cell Function by Inflammatory Cytokines. Hindawi Publishing Corporation. Mediators of Inflammation.2013;2013:11.
- [4] Brown PJ, Miller BG, Stokes CR, Blazquez NB, Bourne FJ. Histochemistry of Mucins of Pig Intestinal Secretory Epithelial Cells Before and After Weaning. Journal of Comparative Pathology.1988;98
- [5] Paz Quintana Hayashi M, Evaluación inmunohistoquímica de tejidos de cerdos inoculados experimentalmente con el virus PRRS y de cerdos contacto. Universidad de Concepción Facultad de medicina veterinaria. 2007.
- [6] Riopérez J, Sánchez CP, Castaño M. Estudio Histopatológico de Ileón de lechones precozmente destetados dependiente del cereal utilizado en su alimentación. Archivo Zootec. 1991;40:261-271.
- [7] Peter ES, Howard MK, Douglas DL, David MB, Brian O'H, Jurij RB, Edmund AP. Orbital floor reconstruction using porcine small intestinal submucosa. Med Sci Monit. 2008;14
- [8] Minghai H, Naiyang L, Zheng L, Pengxia W, Xuanwei L, Wei Z, Xiaoran W, Chaoyang L, Jianhui X, Qiang Z, Zhao L, Zhichong W. Usin acellular porcine limbal stroma for rabbit limbal stem cell microenvironment reconstruction. European Journal of Pharmaceutical Science. 2011;32:7812-7821
- [9] Sánchez I, Martín R, Ussa F, Fernández-Bueno I. The Paramets of porcine eyeball. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2011;249:475-482
- [10] Loch C, Zakelij S, Kristl A, Nagel S, Guthoff R, Weitschies W, Seidlitz A. Determination of permeability coefficients of ophthalmics drugs through different layers of porcine, rabbit and bovine eyes. European Journal of Pharmaceutical Science. 2012;47:131-138
- [11] Gasser K, Fuchs-Baumgartinger A, Tichy A, Nell B. Investigations on the conjunctival goblet cells and on the characteristics of glands associated with the eye in the guinea pig. Veterinary Ophthalmology. 2011;14:26-40
- [12] Alors Correderas R. Técnicas en el laboratorio de Histología. Innovación y experiencias educativas. 2008;5
- [13] centrodeartigos.com/articulos-para-saber-mas/article_41640.html (02 de mayo de 2014)
- [14] Hernández Cruz P, Pérez Campos E, Martínez Martínez L, Ortiz B, Martínez G. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. REB. 2005;24:21-27
- [15] Hernández Díaz P, Martín González O, Rodríguez de Pablos Vélez, Ganem Báez CFA. Aplicaciones de las Lectinas. Rev Cubana de Hematol Inmunol Hemoter. 1999;15
- [16] Aspectos Bioquímicos de la Fitohemaglutinina. Aplicaciones en terapéutica médica. www.monografias.com/trabajos20/fitohemaglutinina/fitohemaglutinina.shtml#bases (5 de mayo de 2014)

Jiménez L. Identificación de células caliciformes en la conjuntiva del cerdo.