

UNIÓN DE LECTINAS AL BORDE EN CEPILLO DE VELLOSIDADES INTESTINALES: HERRAMIENTA PARA LA EVALUACIÓN DE LA GLICOSILACIÓN INTESTINAL

M. Sc. Gregory R. Valdés-Paneca^I, Dr.C. Luis O. Maroto-Martín^{II}, Dr.MV. Eduardo Cruz-Muñoz^{III},
M. Sc. Pedro de la Fe-Rodríguez^{II}, M. Sc. Yaima Hernández-Beltrán^I



gregory@suss.co.cu

^IFacultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Sancti Spiritus "José Martí Pérez", Cuba, ^{II}Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central de las Villas, Cuba

● Resumen

La investigación se realizó como primer paso para el análisis del proceso de glicosilación intestinal y la relación de este con la interacción hospedero-patógeno, teniendo como objetivo probar la unión de lectinas vegetales al borde en cepillo del intestino delgado. Se evaluó el efecto bloqueador de diferentes lectinas vegetales en la adhesión de *E. coli* enterotoxigénicas que expresan fimbrias F4. Se realizaron dos experimentos. Primero – las vellosidades fueron incubadas con lectinas de *Glycine max*, *Ulex europaeus*, *Lens culinaris* y *Arachis hypogaea* a diferentes concentraciones y después fueron incubadas con las cepa de *E. coli* GIS26 (F4ac). Segundo – veinte y seis lectinas vegetales biotiniladas se enfrentaron a las vellosidades bajo 3 métodos de fijación diferentes. La unión se verificó mediante la técnica de inmunofluorescencia usando estreptavidina-fluoresceína como indicador. Se probó que: para el primer caso que hubo bloqueo total de la adhesión de la *E. coli* GIS26 al borde en cepillo por parte de las lectinas; para el segundo caso se mostró que existe una adhesión moderada y fuerte a las células epiteliales intestinales en el 69,2 % (18/26) de las lectinas. Se probaron la adhesión de lectinas biotiniladas a diferentes regiones del intestino delgado y la unión de los antígenos fimbriales F4ab, F4ac y F4ad al borde en cepillo. Se encontraron variaciones en el perfil de unión de las lectinas a lo largo de las diferentes regiones del intestino delgado y no homogeneidad en la adhesión de los antígenos fimbriales.

Palabras clave: proceso de glicosilación intestinal, lectinas vegetales.

● Abstract

This research was conducted as a first step in the analysis of intestinal glycosylation process and the relationship of this with the host-pathogen interaction, aiming to test the binding of plant lectins to brush border of the small intestine. The effect of different plant lectins block the adhesion of *E. coli* expressing enterotoxigenic F4 fimbriae. Two experiments were conducted. First - the villi were incubated with lectin of *Glycine max*, *Ulex europaeus*, *Lens culinaris* and *Arachis hypogaea* at different concentrations and were then incubated with the strain of *E. coli* GIS26 (F4AC). Second - twenty-six biotinylated plant lectins faced villi in 3 different fixation methods. The binding was verified by immunofluorescence using streptavidin-fluorescein as indicator. It is proved that: for the first case there was complete blockage of the adhesion of *E. coli* GIS26 the brush border by lectins, for the second case there was moderate to strong adhesion to intestinal epithelial cells in 69,2 % (18/26) of lectins. At the same time tested the biotinylated lectin adhesion to different regions of the small intestine and the union of the fimbrial antigens F4ab, F4AC and F4ad the brush border. Differences were found in the binding profile of lectins along different regions of the small intestine and non-homogeneity in the adhesion of the fimbrial antigens.

Keywords: intestinal glycosylation process, plant lectins.

● Introducción

La colibacilosis porcina continúa siendo una de las enfermedades más importantes que afecta las producciones de cerdos en Cuba y en el mundo, por las grandes pérdidas económicas que se producen por concepto de mortalidad (10 y 20 % de los cerdos recién nacidos y al destete) (Lapuente y Rosell, 2008).

Según Thomson (2008) la diarrea enterotoxigénica (ETEC) por *Escherichia coli*, es la patología digestiva más relevante de los lechones recién nacidos, debida a la producción de fimbrias que se adhieren a la superficie del epitelio intestinal y a la producción de enterotoxinas que inducen la salida de líquido desde el epitelio al lumen intestinal.

Las cepas enterotoxigénicas de *E. coli* incluyen generalmente las fimbrias F4 (K88), F5 (K99), F6 (P987), F41 y F18 que actúan sobre la mucosa intestinal, pasando a la sangre y órganos internos para producir septicemia, diarrea aguda y deshidratación (Frydendahl, 2002).

En la infección, la adhesión a receptores específicos, presentes sólo en ciertas células de mamíferos, conduce a la bacteria patógena a un tropismo de órgano. La adhesión se basa en la interacción específica entre las proteínas de reconocimiento bacterianas unidas a su superficie (adhesinas) y los restos de carbohidratos de las glicoproteínas o glicolípidos presentes en las células de mamíferos (Van den Broeck *et al.*, 1999).

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas naturales de origen no inmune que pueden aglutinar células, y son capaces de un reconocimiento específico para un determinado carbohidrato (Wu *et al.*, 2008). Por su propiedad de unirse selectivamente a determinados radicales glucocídicos, son una herramienta útil para detectar compuestos glicoconjugados (Sharon, 2007).

Esquema para determinar la adherencia

Adherencia bacteriana en 250 μm	Clasificación
< 5	Negativa
5-30	Medianamente positiva
>30	Altamente positiva

Tomando como base lo planteado, nos propusimos como **objetivo general**, evaluar el efecto inhibitorio de lectinas vegetales sobre la unión de antígenos fimbriales de *Escherichia coli* al borde en cepillo del intestino delgado de cerditos y los cambios en la glicosilación intestinal.

Por tal motivo, se hace necesario seguir trabajando en el conocimiento de la glicosilación de los enterocitos y su influencia en la expresión de receptores para diferentes patógenos, lo que sería de aplicación futura en el empleo de terapias de bloqueo, mediante probióticos y proteínas afines a los azúcares.

Materiales y métodos

La presente investigación se realizó como primer paso para el análisis del proceso de glicosilación intestinal y la relación de este con la interacción hospedero-patógeno, teniendo como objetivo probar la unión de lectinas vegetales al borde en cepillo del intestino delgado. Se evaluó el efecto bloqueador de diferentes lectinas vegetales en la adhesión de *E. coli* enterotoxigénicas que expresan fimbrias F4.

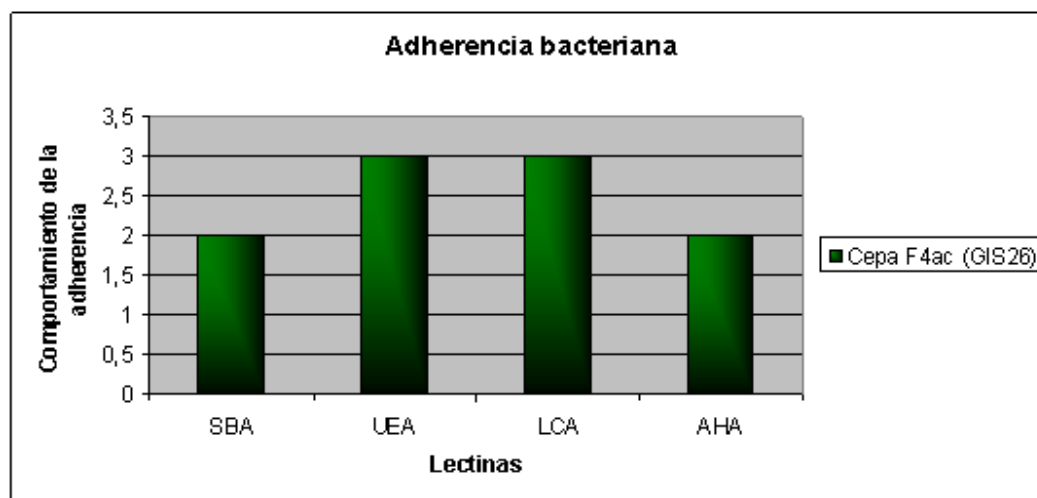
Se realizaron dos experimentos: Primero – las vellosidades fueron incubadas con lectinas de *Glycine max*, *Ulex europaeus*, *Lens culinaris* y *Arachis hypogaea* a diferentes concentraciones, y después fueron incubadas con la cepa de *E. coli* GIS26 (F4ac) utilizando el intestino delgado de un cerdo de 33 días de nacido. Segundo – 26 lectinas vegetales biotiniladas se enfrentaron a las vellosidades bajo tres métodos de fijación diferentes.

La unión se verificó mediante la técnica de inmunofluorescencia, usando estreptavidina-fluoresceína como indicador, en el mismo se trabajó con 2 cerdos de 5 y 8 semanas, respectivamente de la raza Yorkshire. Al mismo tiempo, se probaron la adhesión de lectinas biotiniladas a diferentes regiones del intestino delgado y la unión de los antígenos fimbriales F4ab, F4ac y F4ad al borde en cepillo.

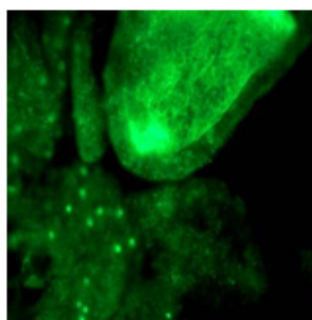
● Resultados y discusión

Se probó que: para el primer caso que hubo bloqueo total de la adhesión de la *E. coli* GIS26 al borde en cepillo por parte de las lectinas; para el segundo caso se mostró que existe una adhesión moderada y fuerte a las células epiteliales intestinales en el 69,2 % (18/26) de las lectinas.

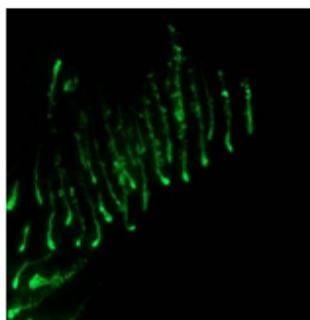
Este estudio preliminar dio pautas en pos de dilucidar el organotropismo de los agentes etiológicos, pudiéndose comprobar por medio de las lectinas UEA – aglutinina de *Ulex europaeus* y LTL - *Lotus tetragonolobus*, que la fucosilación intestinal decrece a partir del duodeno. De igual forma, se encontraron variaciones en el perfil de unión de las lectinas a lo largo de las diferentes regiones del intestino delgado y no homogeneidad en la adhesión de los antígenos fimbriales.



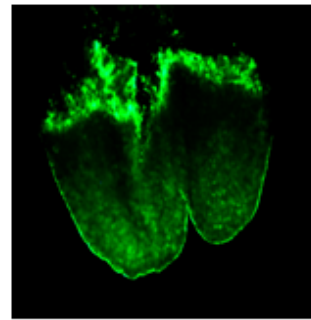
Comportamiento en la adherencia de la cepa F4ac (GIS26) al ser enfrentada con las lectinas vegetales SBA- *Glicine max*, UEA – aglutinina de *Ulex europaeus*, LCA- *Lens culinaris*, AHA- *Arachis hypogaea* previamente incubadas con el borde en cepillo.



PSL



WGA



LEA

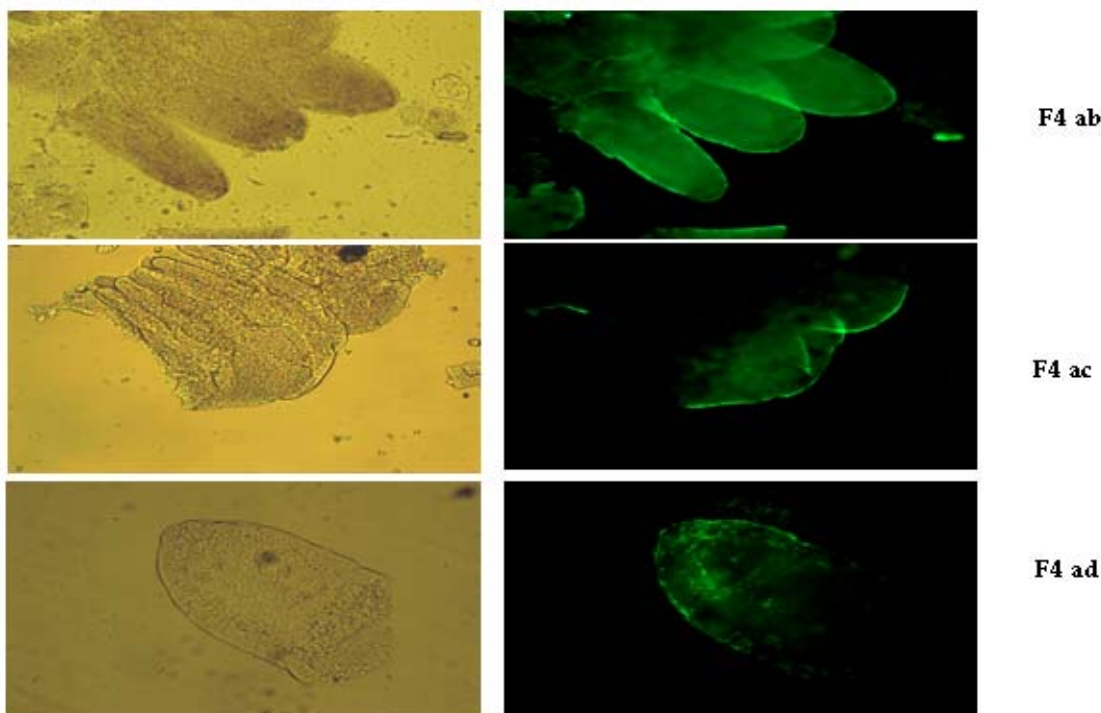
Observaciones al microscopio de los resultados del enfrentamiento de lectinas [específicas a: manosa/glucosa, Man/Glc; N-acetil-glucosamina y ácido N-acetil-neuramínico, GlcNAc y Neu5Ac; ramificaciones de N-acetil-glucosamina, (GlcNAc)_{2,4}], al borde en cepillo del intestino (brush border). PSL – lectina de *Pisum sativum*, WGA – aglutinina de *Triticum aestivum*, y LEA – aglutinina de *Lycopersicon esculentum*

Detección de la adherencia de diferentes antígenos F4 purificados al borde en cepillo

Monserratt (2008) plantea que hay dos variantes antigénicas que se aíslan comúnmente y que se han identificado como F4ab y F4ac, y una tercera variante F4ad que aparece sólo esporádicamente; con lo cual estamos de acuerdo, pues como se ve en figura 11, se observa que todos los antígenos F4 expuestos presentaron adherencia, pudiéndonos percatar de la no homogeneidad en la adherencia por parte de la F4ad. Sin embargo, estudios realizados por Geenen

(2004) han mostrado la resistencia de algunas líneas y progenies porcinas, debido a la ausencia de receptores en las células intestinales.

Estos resultados contribuirán a seguir profundizando en el desarrollo de la inmunidad mucosal, mediante la inmunización oral en cerdos, según lo planteado por Snoeck *et al.* (2008), ya que los mismos autores plantean como requisito previo para inducir una inmunidad mucosal protectora mediante la inmunización con cepas de *E.coli* F4, la presencia de receptores específicos en las vellosidades de los enterocitos.



Conclusiones

Las lectinas vegetales Glycine max, Ulex europaeus, Lens culinaris y Arachis hypogaea inhiben la adhesión al borde en cepillo de la cepa E.Coli F4ac (GLS26).

Los métodos de fijación a utilizar y las características de almacenamiento provocan cambios en la glicosilación intestinal entre lectinas vegetales y el borde en cepillo.

No siempre concuerda el perfil obligatorio de las lectinas utilizadas y el reconocimiento de sacáridos localizados en el borde en cepillo de la mucosa intestinal.

Algunos azúcares específicos de las lectinas como glucosa, lactosa, fucosa, manosa, varían su expresión en dependencia de la región intestinal y la edad de los animales.

Existe una homogeneidad en la adherencia al borde en cepillo por parte de los antígenos fimbriales F4ab, F4ac, no siendo así en la F4ad.



Bibliografía

- CODDENS, A., *et al.* "Recognition of Blood Group ABH Type 1 Determinants by the FedF Adhesin of F18-Fimbriated *Escherichia coli*." *The Journal of biological chemistry*. 284(15): 9713-9726, 2009.
- FRYDENDAHL, K: "Prevalence of Serogroups and Virulence Genes in *Escherichia coli* Associated with Postweaning Diarrhoea and Edema Disease in Pigs and a Comparison of Diagnostic Approaches." *Veterinary Microbiology*. 85: 169–182, 2002.
- HIRABAYASHI, J. "Concept, Strategy and Realization of Lectin-based Glycan Profiling". *J. Biochem*. 144: 139–147, 2008.
- LAPUENTE, Susana y C. ROSELL. Problemática actual de la patología digestiva en lechones. Departamento Técnico, Elanco Valquímica, S.A, 2008. [Consultado el día 21 de marzo del 2009]. Disponible en: <http://www.agroparlamento.com.ar>
- PILOBELLO, K.T., K.L. MAHAL, "Lectin Microarrays for Glycoprotein Analysis." Department of Chemistry and Biochemistry. Institute for Cellular and Molecular Biology. University Texas, 2007.
- SHARON, N: "Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules." *J Biol Chem*. 282(5): 2753-2764, 2007.
- THOMSON, J. Etiología y control de las enfermedades entéricas en porcino. Veterinaria Especialista en Patología Porcina. SAC. Vt. Services. Escocia - U.K, 2008. [Consultado el 28 de mayo del 2008]. Disponible en: <http://www.avancesentecnologiaporcina.com/contenidos/etiolog.htm>
- VAN DEN BROECK, W., E. COX, BM. GODDERIS. "Receptor-Dependent Immune Responses in Pigs After Oral Immunization with F4 Fimbriae." *Infect Immun*. 67(2): 520-526, 1999.
- WU, A.M., J.H. Wu, Z. YANG, T. SINGHT, I.J. GOLDSTEIN, N. SHARON. "Differential Contributions of Recognition Factors of two Plant Lectins - *Amaranthus Caudatus* Lectin and *Arachis Hypogea* Agglutinin, Reacting with Thomsen-Friedenreich Disaccharide (Galbeta1-3GalNAcalpha1-Ser/Thr)." *Biochimie*. 90 (12): 1769-1780, 2008.