

## Enfermedad de almacenamiento lisosomal en terneros del norte de Uruguay

Rivero, R<sup>1</sup>.; Kautz S<sup>1</sup>.; Gomar, MS<sup>2</sup>.; Barros, S.S<sup>3</sup>. y Gimeno; E.J.<sup>2</sup>

### RESUMEN

El presente trabajo describe las lesiones celulares y ultraestructurales de una enfermedad neurológica observada en terneros en el Departamento de Paysandú. Los animales formaban parte de un rodeo de cruzamientos experimentales en el que se encontraban las razas Hereford, Aberdeen Angus, Salers, Zebú y Red Poll. Se observó un aumento en la tasa de mortalidad entre los terneros recién nacidos. Un ternero enfermo fue sacrificado y necropsiado. Se analizaron como control muestras de dos terneros normales. El estudio histológico permitió observar vacuolización de numerosas neuronas en todos los tejidos analizados. El estudio ultraestructural permitió observar vacuolas asociadas a membranas y ocupadas por un material finamente granular. Cortes representativos de bulbo raquídeo, cerebelo y médula espinal fueron analizados con métodos lectinohistoquímicos. El material almacenado reaccionó con las siguientes lectinas: *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Triticum vulgare* (WGA), y *Triticum vulgare succinilada* (sWGA). El patrón lectinohistoquímico observado es coincidente con una  $\alpha$ -manosidosis. La enfermedad, desconocida hasta el momento en Uruguay, debería ser caracterizada epidemiológicamente.

**Palabras Clave:** Bovinos, enfermedad de almacenamiento lisosomal, lectinohistoquímica, microscopía electrónica,  $\alpha$ -manosidosis.

### SUMMARY

This paper describes the cellular and ultrastructural lesions found on a neurological illness observed in calves in the Department of Paysandú. The animals were part of a cross experimental herd, composed by several breeds of Hereford, Aberdeen Angus, Salers, Zebu and Red Poll calves. One calf was euthanatized and necropsied. Samples of two normal calves were included as controls. Histologically, there were varying degrees of vacuolization in the cytoplasm of numerous neurons in all the studied organs. The ultrastructural study showed membrane-bound vacuoles filled with finely granulated material. Representative sections of medulla, cerebellum and spinal cord were submitted to *lectinohistochemical procedures*. The stored material reacted to the following lectins: *Concanavalia ensiformis* (Con-A), *Triticum vulgare* (WGA), and *Succinylated-Triticum vulgare* (sWGA). The pattern of staining coincides with the data reported for  $\alpha$ -mannosidosis. The disorder, unrecognized until now in Uruguay, should be better characterized epidemiologically.

**Keywords:** Bovines, lysosomal storage disease, lectinohistochemistry, electron microscopy,  $\alpha$ -mannosidosis.

### INTRODUCCIÓN

Numerosas enfermedades de almacenamiento lisosomal han sido caracterizadas en los animales domésticos, así como también en la especie humana y en animales de laboratorio. Algunas de ellas tienen importancia en medicina veterinaria, y otras revisten interés como modelos de enfermedades humanas (5,12,22,28). La mayoría de estas entidades nosológicas tiene base genética, aunque se han reconocido varias originadas por la ingestión de vegetales (8,9,10,18,25).

Dentro de estas enfermedades, las mannosidosis constituyen el grupo más común y de mayor importancia económica en los animales domésticos. La  $\alpha$ -mano-

sidosis hereditaria ha sido descripta principalmente en bovinos Aberdeen Angus, y puede llegar a presentarse en cualquier lugar en donde se críe esa raza (21). También se la identificó en las razas Murray Grey y Galloway (11,16).

En Nueva Zelanda más del 10% de los bovinos Angus tenían ese defecto en heterosigosis antes de la implementación de un programa de control (19). La  $\beta$ -mannosidosis, que se presenta en cabras (23) y en bovinos Salers (20), origina una enfermedad neonatal con lesiones similares a la  $\alpha$ -mannosidosis pero el cuadro tienen mayor severidad clínica.

La lectinohistoquímica en cortes de tejidos incluidos en parafina puede ser empleada para identificar azúcares específicos y por lo tanto ayuda en el diagnóstico de enfermedades con almacenamiento de glicoproteínas y glicolípidos (1,2,3,4,27). Las lectinas son proteínas, generalmente de origen vegetal con afinidad por distintos carbohidratos (13,14), y constituyen una valiosa herramienta para estudiar la distribución de residuos de monosacáridos (glucoconjugados) "in situ" (6,24).

El presente trabajo, que describe una enfermedad de almacenamiento lisosomal identificada en el norte del Uruguay, tiene los siguientes objetivos: 1) caracteri-

Recibido: 11/12/00 Aprobado: 19/03/01

<sup>1</sup>Dirección de Laboratorios Veterinarios "Miguel Rubino", Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, C.C. 57037, CP. 60.000, Paysandú, URUGUAY, <sup>2</sup>Instituto de Patología, Facultad de Ciencias Veterinarias, C.C. 296, 1900 La Plata, ARGENTINA, <sup>3</sup>Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, UFPEL, CX. 354, CEP. 96010-900, Pelotas, BRASIL.

zar las lesiones de los animales afectados a nivel celular y ultraestructural, 2) determinar la presencia y distribución de receptores para diversas lectinas los tejidos afectados y 3) aportar datos que permitan determinar el origen del problema observado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante la primavera de 1998 se presentó en el Departamento de Paysandú una enfermedad neurológica caracterizada por postración, hiperestesia y temores musculares en cabeza y cuello. El problema apareció en un rodeo experimental de cruzamientos integrado por animales de las razas Hereford, Aberdeen Angus, Sallers, Zebu y Red Poll. En el rodeo se presentó un aumento de la mortalidad neonatal con predominio de signos clínicos nerviosos.

Se sacrificó un ternero de madre cruce Aberdeen Angus y se realizó la necropsia completa. Fragmentos de distintas porciones del sistema nervioso central y bazo fueron fijados en formalina e incluidos en parafina. Los mismos tejidos fueron tomados de dos terneros normales y se los empleó como controles. Se efectuaron cortes de 5 µm de espesor que fueron coloreados con hematoxilina y eosina (HE).

Fragmentos de la corteza cerebral, colículo rostral, puente y cerebelo fijados en formalina, fueron colocados en solu-

ción glutaraldehído 2% y paraformaldehído 2% en buffer de cacodilato de sodio 0,1M a pH 7,4. Posteriormente fueron fijados en tetróxido de osmio e incluidos en Epon. Cortes semifinos fueron coloreados con azul de metileno, cortes ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron examinados en un microscopio electrónico de transmisión.

En el estudio lectinohistoquímico se utilizaron nueve lectinas marcadas con biotina<sup>®</sup> para la detección de diferentes residuos específicos (Cuadro 1)(24). Los cortes fueron procesados de la siguiente manera: desparafinados, lavados en etanol, incubados con peróxido de hidrógeno al 0,3 %, sumergidos en metanol absoluto durante 30 minutos a temperatura ambiente, hidratados y lavados en PBS pH 7.4. Con posterioridad se incubaron con las lectinas durante toda la noche en cámara húmeda a 4° C. Los cortes fueron lavados nuevamente en PBS e incubados con el complejo avidina - biotina (ABC)<sup>®</sup>. Por último, se revelaron con una solución de 3-3' diaminobenzidina (DAB) al 0,02 % y peróxido de hidrógeno al 0,05 % en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Como coloración de fondo se utilizó hematoxilina de Meyer.

Los controles de la lectinohistoquímica se realizaron omitiendo la lectina o bloqueándola mediante incubación previa

con el azúcar específico antes de su aplicación sobre los cortes (24).

## RESULTADOS

No se observaron lesiones macroscópicas, a excepción de úlceras de decúbito. Los cortes histológicos mostraron vacuolaciones de grado variable en el pericario de numerosas neuronas a distintos niveles del sistema nervioso central (Foto 1 y 3). Las células macrofágicas del bazo también mostraron vacuolas citoplásmicas.

El material almacenado en las neuronas reaccionó fuertemente con Con-A y sWGA, y en forma débil con WGA (Foto 2). La lectinohistoquímica permitió demostrar material acumulado en numerosas células que aparecían normales con HE. Los cortes equivalentes obtenidos de animales controles resultaron negativos, al igual que los cortes control de la lectinohistoquímica. Los resultados se presentan en el cuadro 2.

En la ultraestructura, las neuronas, en las diferentes localizaciones mostraban numerosas vacuolas en el pericario particularmente evidente en las grandes neuronas del colículo rostral (Foto 4).

## DISCUSIÓN

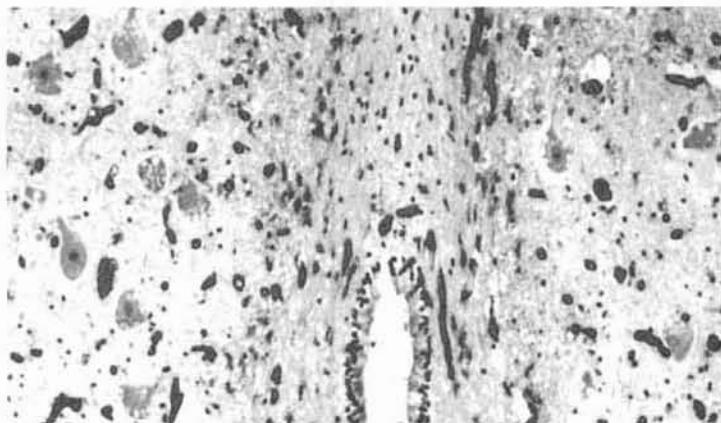
Las características clínicas, histopatológicas y ultraestructurales de la presente enfermedad coincidieron con las descripciones de la bibliografía referidas a en-

**Cuadro 1.** Lectinas empleadas, abreviaturas, concentraciones de trabajo y reactividad específica de cada una.

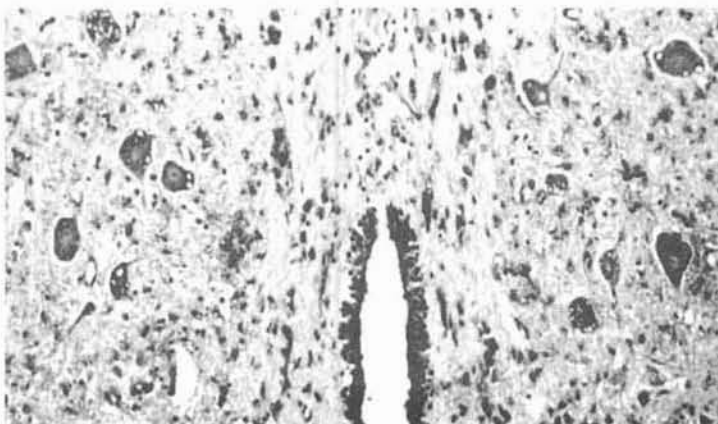
Lectina	Abreviatura	Concentraciónmg/ml	Carbohydrate specificity <sup>*,†</sup>
<i>Concanavalia ensiformis</i>	Con A	30	α-D-Man; α-D-Glc
<i>Glycine max</i>	SBA	30	α-D-GalNAc; β-D- GalNAc; α y β-Gal
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	30	α-D-GalNAc
<i>Ulex europaeus-I</i>	UEA-I	30	α-L-Fuc
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	30	β-D-GlcNAc >> NeuNAc
<i>WGA-succinilada</i>	sWGA	30	(β-(1-4)-D- GlcNAc) <sup>2</sup>
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	10	β-D- Gal(1-3) GalNAc
<i>Ricinus communis -I</i>	RCA-I	30	β-D- Gal > α-D-Gal
<i>Bandeirea simplicifolia</i>	BS-I	30	α-D-Gal

<sup>\*</sup>Goldstein y Hayes (13). <sup>†</sup>Fuc = Fucosa; Gal = Galactosa; GalNAc = N-acetil-galactosamina; Glc = Glucosa; GlcNAc = N-acetil-glucosamina; Man = Manosa; NeuNAc = ácido N-acetil-neuraminico (ácido siálico).

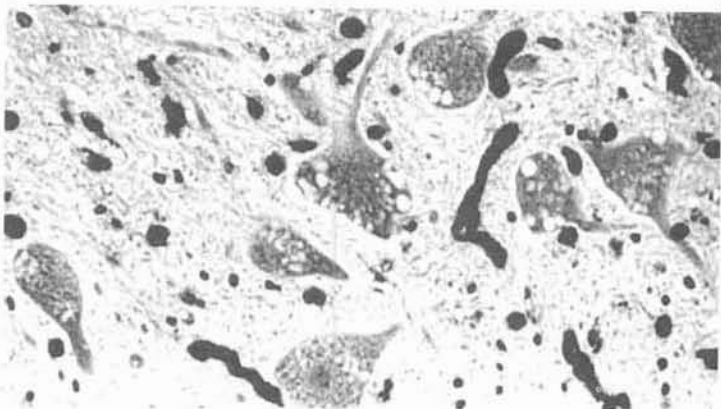
<sup>2</sup>Vector Laboratories Inc., Burlingame, Ca, USA



**Foto 1.** Médula espinal. No se observa marcación citoplásmica. Corte incubado con *Bandeirea simplicifolia* (BS-I) y contrastada con hematoxilina de Mayer. , 200 X.



**Foto 2.** Corte de médula espinal incubado con *Triticum vulgare* succinilada (sWGA) y contrastada con hematoxilina de Mayer. El pericarion de las neuronas presenta una marcación intensa lo que indica reacción con  $\beta$ -(1-4)-D-N-acetil-glucosamina, 200 X.



**Foto 3.** Bulbo raquídeo. No se observa marcación citoplásmica; la vacuolización del pericarion es muy evidente. Corte incubado con *Bandeirea simplicifolia* (BS-I) y contrastada con hematoxilina de Mayer, 400 X.

fermedades de sobrecarga lisosomal (10,26,28). La reactividad del material almacenado frente a sWGA y WGA indica la presencia de  $\beta$ -D-N-acetil-glucosamina y ácido acetil-neuramínico. La afinidad por la Con-A indica que el material posee también residuos de  $\alpha$ -D-manosa y de  $\alpha$ -D-glucosa (6,14). El patrón lectinohistoquímico observado coincide con lo que ha sido descrito para las manosidosis hereditarias o adquiridas en diversas especies (3,5,10).

El mecanismo involucrado en la  $\alpha$ -manosidosis es una deficiencia de  $\alpha$ -manosidasa lisosomal, una enzima que cataboliza varios residuos de glicoproteínas. Esa carencia está determinada genéticamente, siendo autosomal recesiva. A consecuencia de ese defecto se acumulan en los lisosomas diversos oligosacáridos con alto contenido de manosa (7,19,21).

Con respecto a la  $\beta$ -manosidosis, la deficiencia congénita de  $\beta$ -manosidasa resulta en el acumulo de disacáridos y trisacáridos con residuos terminales de  $\beta$ -manosa unidos a N-acetil-glucosamina (20,23).

Como ya fue mencionado, la  $\alpha$ -manosidosis hereditaria ha sido descrita en bovinos Aberdeen Angus, y puede llegar a presentarse en cualquier lugar en donde se críe esa raza (21); por técnicas de genética molecular se ha comprobado una alta incidencia de ese defecto en heterocigosis (22). En consecuencia, es probable que se trate de una  $\alpha$ -manosidosis, la forma de más frecuente presentación en bovinos. Debemos remarcar la existencia de animales Salers en el rodeo de cruzamientos y, como ya fue mencionado, la  $\beta$ -manosidosis ha sido identificada en esa raza (20). No obstante, nuestros resultados coinciden con el patrón lectinohistoquímico observado por Alroy y col. en la  $\alpha$ -manosidosis de diversas especies, incluyendo al bovino (1).

La  $\alpha$ -manosidosis ha sido considerada una enfermedad de importancia económica en bovinos, a tal punto que en Nueva Zelanda y en Australia se desarrollaron programas de control basados en la identificación de animales Angus y Murray Grey heterocigotas mediante la detección de  $\alpha$ -manosidasa plasmática (15,19). Con respecto a la  $\beta$ -manosidosis, su control ha sido implementa-

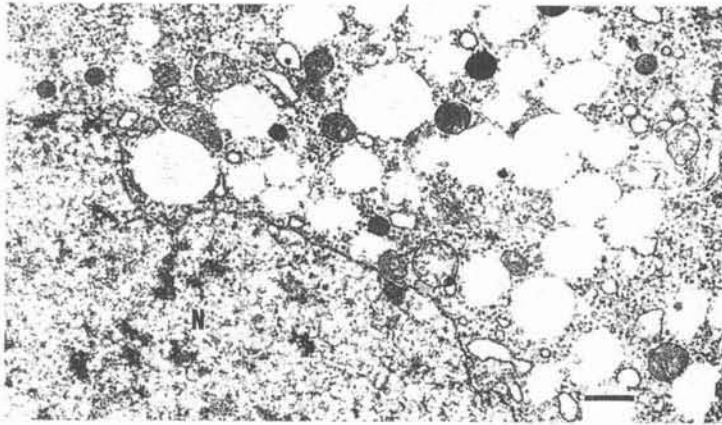


Foto 4. Neurona del colículo rostral con numerosas vacuolas en el pericarion. Núcleo (N). Barra = 1 μm

Cuadro 2. Intensidad de marcación del material intralisosomal con cada lectina en terneros afectados y en terneros normales\*

	LECTINA								
	sWGA	WGA	UEA-I	PNA	RCA-I	SBA	DBA	Con A	BS-I
Neuronas	3 (0) <sup>†</sup>	3 (1)	0-2 (0)	0 (0)	0-1 (0)	0-2 (0)	0-1 (0)	3 (1)	0 (0)

\*Los resultados de los cortes de terneros normales, empleados como control, se consiguan entre paréntesis. <sup>†</sup>Los números indican la intensidad de coloración en una escala subjetiva, 0: negativa, 1: débil, 2: marcada, 3: muy intensa.

### Referencias Bibliográficas

- Alroy, J.; Orgad, U.; Ucci, A.A.; Pereira, M.E.A. (1984). Identification of glycoprotein storage diseases by lectins: a new diagnostic method. *J. Histochem. Cytochem.* 32:1280-1284.
- Alroy, J.; Ucci, A.A.; Warren, C.D. (1985a). Human and canine fucosidosis: a comparative lectin histochemistry study. *Acta Neuropathol. (Berlin)* 67:265-271.
- Alroy, J.; Orgad, U.; Ucci, A.A.; Gavris, V.E. (1985b). Swainsonine toxicosis mimics lectin histochemistry of mannosidosis. *Vet. Pathol.* 22:311-315.
- Alroy, J.; Ucci, A.A.; Goyal, V.G.; Woods, W. (1986). Lectin histochemistry of glycolipids storage diseases on frozen and paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem* 34:501-505.
- Castagnaro, M. (1990). Lectin histochemistry of the central nervous system in a case of feline  $\alpha$ -mannosidosis. *Res. Vet. Sc.* 49:37-377.
- Damjanov, I. (1987). Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. Invest.* 57:5-20.
- Daniel, P.F.; Warren, C.D.; James, L.F.; Jolly, R.D. (1989). A comparison of swainsonine-induced and genetic  $\alpha$ -mannosidosis in Aberdeen Angus cattle. In: Swainsonine and Related Glycosidase Inhibitors, ed. James LF, Elbein AD, Molyneux RJ, and Warren WG. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 331-343.
- de Balogh, K.K.; Dimande, A.P.; van der Lugt, J.J.; Molyneux, R.J.; Naude, T.W.; Welman, W.G. (1999). A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:266-273.
- Dorling, P.R.; Huxtable, C.R.; Vogel, P. (1978). Lysosomal storage in *Swainsona* spp. toxicosis: an induced mannosidosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 4:285-291.
- Driemeier, D.; Colodel, E.M.; Gimeno, E.J.; Barros, S.S. (2000). Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Vet. Pathol.* 37:153-159.
- Embury, D.H.; Jarrett, I.V. (1985). Mannosidosis in Galloway calves. *Vet. Pathol.* 22: 548-551.

do en Australia, Nueva Zelanda y América del Norte (17).

La identificación de esta afección en vacunos del Uruguay implica la existencia del defecto genético y la posibilidad concreta que ese fenotipo se manifieste ocasionalmente. Este trabajo debería alertar a colegas y autoridades para la identificación de nuevos casos y, eventualmente, iniciar estudios que permitan establecer su importancia para la ganadería nacional.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Sra. Rosa Villegas de Guidi y a la Srta. Laura Paoli por su colaboración técnica. María Soledad Gomar es Becaria de la Universidad Nacional de La Plata, Severo Sales de Barros es Becario de la "Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)", Brasil, Eduardo Juan Gimeno es Miembro de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

12. **Glew, R.H.; Basu, A.; Prence, E.M.; Remaley, A.T.** (1985). Lysosomal storage diseases. *Lab. Invest.* 53:250-269.
13. **Goldstein, I.J.; Hayes, C.E.** (1978). The lectins: carbohydrate binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35:127-340.
14. **Goldstein, I.J.; Hayes, R.C.; Monsigny, M.; Osawa, T.; Sharon, N.** (1980). What should be called a lectin?. *Nature* 285:66.
15. **Healy, P.J.; Babidge, P.J.; Embury, D.H.; Harrison, M.A.; Judson, G.J.; Mason, R.W.; Person, D.S.; Sinclair, A.J.** (1983). Control of  $\alpha$ -mannosidosis in Angus cattle. *Austr. Vet. J.* 60:135-137.
16. **Healy, P.J.; Cole, A.E.** (1976). Heterozygotes for mannosidosis in Angus and Murray Gray cattle. *Austr. Vet. J.* 52:385-386.
17. **Healy, P.J.; Kidd, G.N.; Reuter, R.E.; Bunce, C.; Hosie, I.; Stapleton, T.** (1991).  $\beta$ -mannosidosis in a Salers calves in Australia. *Austr. Vet. J.* 69:145.
18. **James, L.F.; van Kempen, K.R.; Harley, W.J.** (1970). Comparative pathology of *Astragalus* (locoweed) and *Swainsona* poisoning in sheep. *Vet. Pathol.* 7:116-125.
19. **Jolly, R.D.** (1978). Mannosidosis and its control in Angus and Murray Grey cattle. *New Zeal. Vet. J.* 26:194-198.
20. **Jolly, R.D.; Thompson, K.G.; Bayliss, S.L.; Vidler, B.R.; Orr, M.B.; Healy, P.J.** (1990).  $\beta$ -mannosidosis in a Salers calf: a new storage disease of cattle. *New Zeal. Vet. J.* 38:102-105.
21. **Jolly, R.D.** (1993). Lysosomal storage diseases in livestock. *Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Pract.* 9:41-53.
22. **Jolly, R.D.; Walkley, S.U.** (1997). Lysosomal storage diseases of animals: an essay in comparative pathology. *Vet. Pathol.* 34:527-548.
23. **Jones, M.Z.; Dawson, G.** (1981). Caprine  $\beta$ -mannosidosis. *J. Biol. Chem.* 266:5185-5188.
24. **Leathem, A.J.C.** (1986). Lectin Histochemistry. *In: Immunocytochemistry. Modern Methods and Applications*, ed. Polak JM, Van Nordem. S. 2nd Ed. Wright and Sons, Bristol, pp. 167-187.
25. **Molyneux, R.J.; James, L.F.** (1982). Loco intoxication: indolizidine alkaloid of spotted locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Science* 216:190-191.
26. **Monús, Z.; Konyár, E.; Szabo, L.** (1977). Histomorphological and histochemical investigations in mannosidosis. A light and electron microscopic study. *Virchow Arch. B Cell. Pathol.* 26:159-164.
27. **Murnane, R.D.; Ahern-Rindell, A.J.; Prieur, D.J.** (1989). Lectin histochemistry of an ovine lysosomal storage disease with deficiencies of  $\beta$ -galactosidase and  $\alpha$ -neuraminidase. *Am. J. Pathol.* 135:623-630.
28. **Summer, B.A.; Cummings, J.F.; Lahunta, A.** (1995). Degenerative Diseases of the Nervous System: Lysosomal Storage Diseases. *In: Veterinary Neuropathology*, Ed. Mosby, St Louis, MO, pp. 214-236.