

COMUNICACIÓN

VARIABILIDAD DE CÉLULAS SANGUÍNEAS MEDIANTE LECTINAS FLUORESCENTES EN LA RAZA CANINA EUSKAL ARTZAIN TXACURRA

VARIABILITY OF BLOOD CELLS BY FLUORESCENT LECTINS IN THE CANINE BREED EUSKAL ARTZAIN TXACURRA

Gómez, M.¹, E. González-Txabarri² y W.J. Ávila²

¹Servicio de Ganadería. Diputación Foral de Bizkaia. Avda. Lehendakari Agirre nº 9-2º. 48014 Bilbao. España.

²Departamento Producción Animal. Facultad de Veterinaria U.C. Madrid. Avda. Puerta de Hierro, s/n 28040. Madrid. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Lectinas. Razas caninas. Glicoproteínas.

ADDITIONAL KEYWORDS

Lectines. Canine breeds. Glycoproteins.

RESUMEN

Se han estudiado las diferencias existentes en los residuos glicoproteicos de las células de la línea roja y blanca de las dos variedades de la raza canina Euskal Artzain Txakurra, Iletsua y Gorbeiakoa, mediante el empleo de nueve lectinas fluorescentes: *Helix pomatia*, *Phaseolus vulgaris*, *Triticum vulgare*, *Glycine maxima*, *Pisum sativum*, *Phytolacca americana*, *Canavalia ensiformis*, *Arachis hypogaea*, y *Erythrina cristagalli*. No se encontraron diferencias significativas en la membrana plasmática de las células de la línea roja, mientras que para las lectinas *Glycine maxima* y *Phytolacca americana* reflejan diferencias significativas ($p < 0,01$) en la unión con los restos glucídicos de las células de la línea blanca entre las dos poblaciones analizadas.

Euskal Artzain txakurra were analyzed by nine FITC-labeled lectins: *Helix pomatia*, *Phaseolus vulgaris*, *Triticum vulgare*, *Glycine maxima*, *Pisum sativum*, *Phytolacca americana*, *Canavalia ensiformis*, *Arachis hypogaea*, and *Erythrina cristagalli*. The binding of lectins to cell membrane was estimated by observation with an epifluorescence microscope. There were no differences in the binding activity of the nine lectins with erythrocytes between the two populations, while the fluorescence level showed by lymphocytes for *Glycine maxima* and *Phytolacca americana* was significantly different ($p < 0,01$) between Iletsua and Gorbeiakoa populations.

SUMMARY

Blood cells, erythrocytes and lymphocytes, from two different groups of the canine breed

INTRODUCCIÓN

Aunque hay unas 400 razas caninas reconocidas oficialmente en el mundo, año tras año se va incrementando el estudio de agrupaciones raciales

Arch. Zootec. 47: 439-443. 1998.

locales, con el fin de evitar la desaparición de una parte de nuestro patrimonio genético para mantener la biodiversidad. En la clasificación y diferenciación de razas o subrazas se han utilizado tradicionalmente diversos métodos, básicamente estudios zoológicos y más recientemente técnicas más modernas (ADN, etc). El empleo de técnicas de aplicación frecuente en otros campos puede ayudarnos en el estudio y diferenciación de las razas caninas. Por ejemplo, cada día se está concediendo mayor importancia a los residuos glicoproteicos y glicoproteínas constituyentes de la membrana plasmática de los organismos vivos (Drikamer y Carver, 1992), pudiendo detectarse la presencia de un glúcido determinado en la membrana plasmática de la célula mediante la especificidad de unión de las lectinas con ellos (Slifkin y Doyle, 1990).

Así, las subpoblaciones de leucocitos humanos pueden diferenciarse mediante el empleo de lectinas fluorescentes (Lee *et al.*, 1987) y lectinas marcadas con oro coloidal (Eguchi *et al.*, 1989; Nakajima *et al.*, 1988). También se han empleado para tipificar eritrocitos (Issitt, 1985; Bird, 1977). Se han utilizado lectinas para el estudio de las diferentes células sanguíneas, por ejemplo, en la caracterización de linfocitos sanguíneos en la especie canina (Shifrine *et al.*, 1980; Krakowka y Ringler, 1986) y también en la bovina (Johansson y Morein, 1981).

El Euskal Artzain Txakurra o perro de pastor vasco, con sus dos variedades Iletsua y Gorbeiakoa ha sido recientemente reconocido como raza por la Real Sociedad Canina (Enero, 1996).

En este trabajo se ha pretendido comprobar si se pueden diferenciar las variedades existentes del EAT, Iletsua y Gorbeiakoa mediante el empleo de lectinas fluorescentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de una población censada de 526 perros de raza EAT en la Comunidad Autónoma Vasca (CAV), todos con edad superior a 15 meses, se muestrearon 110 animales, 55 de la variedad Iletsua y 55 de la variedad Gorbeiakoa. Se obtuvieron muestras de sangre de cada individuo, que se conservaron en tubos con EDTA (ácido etileno-diaminotetracético) y congelados a -30°C hasta su procesamiento.

Se dispuso de una batería de 9 lectinas marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Ingelheim Diagnostica y Tecnología, S.A. Barcelona, 1993), cuya especificidad se relaciona en la **tabla I**. Todas ellas se emplearon a una concentración de 100 µg/ml. Cada muestra de sangre se diluyó al 70 p.100 en suero fisiológico, y se prepararon 9 alícuotas de 90 µl de cada muestra de sangre para combinarlas con 10 µl de cada una de las lectinas. Una vez selladas, las preparaciones se incubaron en cámara oscura a temperatura ambiente durante 30 minutos y se observaron en un fotomicroscopio Zeiss 11 con filtro FITC (filtro 48770 para 450-490 nm) para detectar la presencia de fluorescencia en los receptores glucídicos de la membrana tanto de eritrocitos como de linfocitos. Los resultados se trataron mediante una χ^2 con el paquete estadístico Statistical Graphic System (STSC, 1986).

VARIABILIDAD EN LA RAZA CANINA EUSKAL ARTZAIN TXACURRA

Tabla I. Datos referentes a las lectinas utilizadas. (Data concerning lectins used).

Lectinas	Abreviatura	Especificidad
<i>Felix pomatia</i>	HPA	Gal n Ac, Glc N Ac, Gal
<i>Phaseolus vulgare</i>	PHA	Complex
<i>Triticum vulgare</i>	WGA	Glc N Ac
<i>Glycine maxima</i>	SBA	Gal N Ac, Gal
<i>Pisum sativum</i>	PEA	Man
<i>Phytolacca americana</i>	PWN	Glc N Ac
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	Man, Glc
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Gal, Gal NH
<i>Erythrina cristagalli</i>	ECA	Gal, Gal N Ac

Las especificidades no reflejan la contribución de los penúltimos residuos o péptidos (Slifkin y Doyle, 1990). Gal= Galactosa-, Glc= Glucosa-, Man=Manosa-. Gal N Ac=N-acetilgalactosamina; Glc N Ac= N-acetilglucosamina

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para las células de la serie roja reflejan una relativa homogeneidad entre ambas

poblaciones analizadas respecto a los receptores glucídicos afines a las lectinas estudiadas (**tabla II**). La ausencia de fluorescencia en los eritrocitos cuando se añadían las lectinas de *Canavalia ensiformis* (Con A), *Arachis hypogaea* (PNA) y *Erythrina cristagalli* (ECA) refleja en principio que estas células carecen de restos glucídicos correspondientes a ellas.

La mayoría de las muestras analizadas en ambas variedades presentaron fluorescencia frente a las lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Pisum sativum* (PEA), *Phytolacca americana* (PWN), y en menor grado, frente a *Triticum vulgare* (WGA), sin que se encontrasen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), mientras que se unieron en un bajo porcentaje a *Glycine maxima* (SBA) y *Helix pomatia* (WA). Sin embargo, el número de células que presentaron fluorescencia no fue igual para todas las lectinas, sino que oscilaron desde el 100 p.100 de las mismas (PHA) hasta el 23,6

Tabla II. Respuesta de células de la serie roja y blanca de EAT a las lectinas, expresado en porcentaje. (Response of EA T erythrocytes and while blood cells to FITC-labeled lectins).

	Eritrocitos <i>lletsua</i>	Eritrocitos <i>Gorbeiakoa</i>	significación	S. blanca <i>lletsua</i>	S. blanca <i>Gorbeiakoa</i>	significación
HPA	34,5	29,1	n.s.	65,5	70,9	n.s.
PHA	100	100	n.s.	0	0	n.s.
WGA	67,3	69,1	n.s.	16,4	12,7	n.s.
SBA	23,6	32,7	n.s.	34,5	12,7	**
PEA	83,6	83,6	n.s.	16,4	0	-
PWN	72,7	85,5	n.s.	27,3	0	**
Con A	0	0	-	63,6	52,7	n.s.
PNA	0	0	-	18,2	21,8	n.s.
ECA	0	0	-	0	0	-

n.s.: no significativo, ** $p < 0,01$.

p.100 (SBA). Las diferentes respuestas de los eritrocitos frente a algunas lectinas podrían atribuirse en principio a la existencia de distintos grupos sanguíneos, pero en el caso de la especie canina no se ha encontrado correspondencia entre los grupos sanguíneos caninos y la respuesta a la lectinas (Andrews *et al.*, 1992 a y b). En definitiva, ninguna de ellas nos permite detectar de forma concluyente diferencias en la membrana plasmática de las células de la serie roja entre las dos variedades del EAT.

En el caso de las células de la línea blanca, los resultados son más alentadores, ya que hemos encontrado dos lectinas, *Glycine maxima* (SBA) y *Phytolacca americana* (PWN), que presentan unos niveles de fluorescencia significativamente ($p < 0,01$) diferentes entre las dos poblaciones caninas sometidas a estudio. Así, SBA se une al 35 p.100 de los linfocitos en la agrupación *Lanas*, frente al 13 p.100 de la variedad *Gorbeiakoa*. Para la lectina PWN ninguna de las células de la serie blanca de la primera agrupación presentó fluorescencia frente a esta lectina, mientras que el 27 p.100 de las células de *Iletsua* se unieron a ella.

Este hecho parece sugerir que existen diferentes frecuencias en los restos glucídicos de la membrana plasmática de los linfocitos entre estas dos poblaciones. Según estos resultados, la variedad *Gorbeiakoa*, al no unirse a la lectina PWN, carecería de residuos de N-acetil-Glucosamina en las cadenas glicoproteicas o glicolípicas de las membranas de los linfocitos, mientras que sí estarían presentes en la agrupación *Iletsua*. En lo referente a la

lectina SBA, lo que diferenciaría a estas poblaciones es la frecuencia de presentación de los residuos N-acetilgalactosamina y/o galactosa, que es mayor en el *Iletsua*. Sin embargo, los bajos porcentajes de fluorescencia detectados en ambas poblaciones para estas dos lectinas recomiendan repetir los análisis sobre una muestra de mayor tamaño.

Ninguna de las dos variedades reacciona con las lectinas *Erythrina cristagalli* (ECA) y *Phaseolus vulgaris* (PHA). El resto de las lectinas *Helix pomatia* (UPA), *Triticum vulgare* (WGA), *Canavalia ensiformis* (Con A) y *Arachis hypogaea* (PNA), se unieron a receptores glucídicos de las membranas plasmáticas de las células de la serie blanca, pero sin presentar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre ambas poblaciones. La unión de la lectina Con A a los linfocitos T caninos ya ha sido reflejada por otros autores (Krakowka y Ringler, 1986).

Aunque las diferencias detectadas entre ambas poblaciones caninas no sean totalmente concluyentes, sí parecen existir pequeñas diferencias en la constitución de la membrana plasmática de los linfocitos, y que es posible que sea extensible a otros tipos celulares. Aunque la variabilidad morfológica del perro doméstico *Canis familiaris* es muy elevada, se puede considerar genéticamente muy homogéneo (Wayne, 1986), y de hecho se han analizado razas caninas españolas sin encontrar correlación significativa entre las distancias morfológicas y las enzimáticas (Jordana *et al.*, 1992). Sin embargo, pueden existir diferencias entre frecuencias fenotípicas referen-

VARIABILIDAD EN LA RAZA CANINA EUSKAL ARTZAIN TXACURRA

tes a los carbohidratos de la superficie de las células sanguíneas entre dos

poblaciones como parecen indicar los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, G.A., P.S. Chavey and J.E. Smith. 1992 a. Reactivity of seed lectins with blood typed canine erythrocytes. *Comparative Haematology Int.*, 2: 68-74.
- Andrews, G.A., P.S. Chavey and J.E. Smith. 1992 b. Reactivity of lichen with blood typed canine erythrocytes. *Res. Vet. Sci.*, 53: 315-319.
- Bird, G.W. 1977. Lectins. In: D. Seligson (ed.) RCR Handbook series in clinical laboratory science, sect. D. Pp. 459-473. CRC Press Inc. Cleveland.
- Drikamer K. and J. Carver. 1992. Carbohydrates and glycoconjugates: upwardly mobile sugars gain status as information-bearing molecules. *Current Opinion in Structural Biol.*, 5: 653-654.
- Eguchi, M., T. Ozawa, J. Suda, K. Sugita and T. Furukawa. 1989. Lectins for electron microscopic distinction of eosinophils from other blood cells. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 743-749.
- Gómez, M. 1995. El Euskal Artzain Txakurra (Perro de Pastor Vasco): Descripción y tipificación racial. Tesis doctoral no 24. Departamento de Industria, Agricultura y Pesca. Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz.
- Issit, P.D. 1985. Applied blood group serology. 3rd ed. Montgomery Scientific Publ. Miami.
- Johansson, C. and B. Morein. 1981. Characterization of bovine B and T lymphocytes with the aid of lectins and the occurrence of Fe receptors in various cell populations. *Svensk Veterinartidning*, 33: 254.
- Jordana, J., J. Piedrafita and A. Sánchez. 1992. Genetic relationship in spanish dog breeds. 1. The analysis of morphological characters. *Genet. Sel. Evol.*, 24: 225-244.
- Krakovka, S. and S.S. Ringler. 1986. Activation specificity of commonly employed mitogens for canine B and T lymphocytes. *Vet. Immunol. and Immunopathol.*, 11: 281-289.
- Lee, M.C., D. Tuccinov and Y. Damjanov. 1987. Lectins as markers for eosinophilic leukocytes. *Histochem.*, 86: 269.
- Nakajima, M., N. Ito, K. Nishi, Y. Okamura and T. Hirota. 1988. Cytochemical localization of blood group substances in human salivary glands using lectin-gold complexes. *J. Histochem. Cytochem.*, 36: 337-348.
- Shifrine, M., L.S. Rosenblatt, N. Taylor, N.W. Hetherington, V.J. Matthews and F.D. Wilson. 1980. Seasonal variations in lectin induced lymphocyte transformation in beagle dogs. *J. Interdisciplinary Cycle Res.*, 11: 219-231.
- Slifkin, M. and R.J. Doyle. 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 3: 197-218.
- Wayne, R.K. 1986. Cranial morphology of domestic and wild canids: the influence of development on morphological change. *Evolution*, 40: 243-261.