Análisis de la fagocitosis de neutrófilos ovinos mediante quimioluminiscencia procedentes de corderas intoxicadas con aflatoxinas

Gracia, E.[1], Fernández A.[2], Saez T.[2], Hernández M.[3], Verde M.T.[2], Sanz M.C.[2], Pérez M.[2], Amorena, B.[1]

[1]*Depto. Sanidad Animal, Servicio de Investigación Agraria, Carretera Monatañana, 50080-Zaragoza*
[2]*Depto. Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Miguel Servet 177, 50013-Zaragoza*
[3]*Laboratorio de Sanidad Animal y Campañas Ganaderas, Doctor Iranzo 6, 50013-Zaragoza*

INTRODUCCION

Para valorar la función fagocítica se ha utilizado ampliamente el test NBT, pero en los últimos años se ha utilizado la medida de la respuesta oxidativa que ocurre cuando los fagocitos fagocitan partículas, resultando en la emisión de una luz la cual puede ser captada mediante un luminómetro (Quimioluminiscencia). Este método tiene una amplia aplicación clínica para valorar *in vitro* la activida de los polimorfonucleares (PMN) en individuos inmunodeficientes (Steele, 1991). Durante la aflatoxicosis se ha observado un incremento de la susceptibilidad a enfermedades bacterianas que podría estar relacionado con una disminución de la capacidad fagocítica de los PMN (Miller y Wilson, 1994). Respecto a la hematología, se ha descrito en pollos anemia de tipo hemolítico (Tung et al., 1975). Sin embargo, en terneros y ponis se ha observado un incremento de los valores de la serie roja en (Bortell et al., 1983; Brucato et al., 1986) y recientemente en corderos jóvenes se ha visto este mismo aumento (Fernández et al., 1995). En este trabajo se desriben por primer vez la valoración de la actividad fagocítica de neutrófilos por quimioluminiscencia de corderas intoxicadas con aflatoxinas y la variación de sus parámetros hematológicos.

MATERIAL Y METODOS

Diseño experimental: Los animales, alimentación, lotes y tomas de muestras son los mismos que los indicados en la comunicación: "*Alteración de la inmunidad celular y humoral en corderas intoxicadas con aflatoxinas*" presentadas a este Congreso.

Quimiolumiscencia de neutrófilos: Se siguió el método de Blair et al., (1988) y Thomas et al., (1988) con algunas modificaciones. El método consiste en aislar los leucocitos de la sangre con una solución de lisis y enfrentar los neutrófilos a partículas de zimosán (10 mg/ml, Sigma) opsonizados con un 10% de suero ovino. La quimioluminiscemcia se determina en un luminómetro (Luminoskan RS 1.0,

Labsystem, Finlandia). La señal lumínica se aumenta mediante luminol (10^{-4} M, Sigma) y el resultado se expresa como Unidades Relativas de Luz (RLU)/10.000 neutrófilos. Los análisis se realizaron por duplicado.

Análisis hematológicos: Se sacó sangre a los 0, 7, 14, 23, 30 y 37 días de intoxicación de la yugular de las corderas. Se utilizaron tubos con EDTA-K^{++} como anticoagulante. La concentración de glóbulos rojos (GR) y blancos (GB), valor hematocrito (Hct) y concentración de hemoglobina (Hb) se determinaron en un contador de partículas Sysmex F-800. Los índices hematológicos, VCM, CMHC y HCM se calcularon a partir de los datos de GR, Hct y Hb. El recuento diferencial de GB se realizó tiñiendo una extensión sanguínea con Panóptico rápido (QCA).

RESULTADOS Y DISCUSION

El único efecto de la intoxicación por aflatoxinas sobre la hematología fue en el último día de intoxicación en que se observó una disminución de los GR (14,3±2,3 y 15,9±2,2x10^6/µl en intoxicados y control respectivamente, $P<0,05$) y en el Hct (36,5±7,8 y 41,9±4,7 en intoxicados y control respectivamente, $P<0,05$) e incremento de la CMHC (35,1±7,8 y 28,9±4,7 g/dl en intoxicados y control respectivamente, $P<0,05$) y la HCM (8,9±1,6 y 7,6±1,3 pg en intoxicados y control respectivamente, $P<0,05$). Estos resultados no están de acuerdo con un reciente trabajo (Fernández et al., 1995) en el que hallamos un aumento en los valores de la serie roja, pero con corderos machos, de 45 días de edad y de raza Rasa Aragonesa, por lo que los factores de edad, sexo y raza podrían haber influído en los resultados de este trabajo, como se ha demostrado que influyen en los pollos broiler (Lanza et al., 1980a,b). Además, los animales estuvieron dos semanas más de intoxicación. En la serie blanca sólo se encontró un aumento en el nivel de monocitos (0,22±0,1 y 0,11±0,1x10^3/µl en lote intoxicado y control respectivamente, $P<0,01$) a los 30 días de intoxicación.

La quimioluminiscencia aumentada por luminol ha demostrado ser un buen método para valorar la función fagocítica de los neutrófilos y macrófagos (Steele, 1991). En la figura 1 se muestra la actividad fagocítica de los neutrófilos ovinos en este experimento. No se encontró ningún efecto de la intoxicación sobre la función fagocítica ($P>0,05$). En la aflatoxicosis de los animales se ha observado que son más susceptibles a enfermedades infecciosas probablemente debido a una disminución de capacidad de fagocitosis de los PMN (Miller y Wilson, 1994). Sin embargo, se ha encontrado discrepancia de resultados, ya que en algunos experimentos en aves intoxicadas con aflatoxinas se ha hallado que los trombocitos de las aves no se enontraban afectados (Chang y Hamilton 1979b), mientras que sí lo estaban los heterófilos y monocitos (Chang y Hamilton, 1979a). Otros estudios posteriores no han podido demostrar un efecto negativo de la aflatoxinas sobre la

función fagocítica de heterófilos en aves (Campbell et al., 1983). Estos estudios se han realizado enfrentando las células frente a gérmenes y tiñiendo una extensión para valorar microscópicamente la fagocitosis. No tenemos noticia de ningún estudio hecho de fagocitosis en mamíferos intoxicados con aflatoxinas, por lo que los resultados presentados aquí son los primeros que se tienen aplicando la técnica de quimioluminiscencia incrementada con luminol. Esta diferencia de resultados puede ser debida a los distintos métodos de valoración de la fagocitosis, especie animal, dosis y tiempo de intoxicación, todo ello factores importantes a la hora de interpretar los resultados.

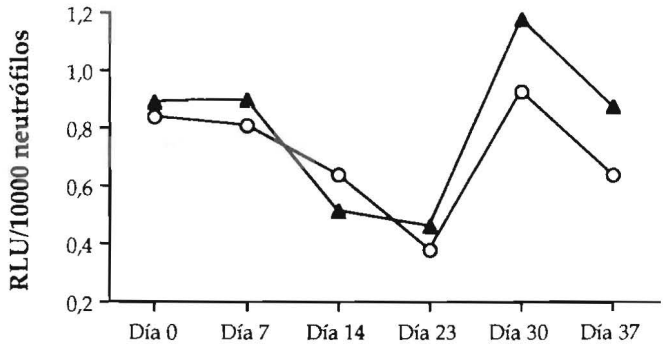


Figura 1: *Actividad de neutrófilos ovinos medidos mediante quimioluminiscencia aumentado con luminol en corderas intoxicadas con aflatoxinas (▲) y control (○).*

Agradecimientos: Este trabajo se ha financiado con una Ayuda de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza (nº 21-883).

BIBLIOGRAFIA

Blair A.L.. et al., (1988). J. Immunol. Methods, 112, 163-168.

Bortell R., et al. (1983). Am. J. Vet. Res., 44, 2110-2114.

Brucato, M. et al. (1986). Am. J. Vet. Res., 47, 179-183.

Campbell, M.L.et al., (1983). Poultry Sci., 62, 2138-2144.

Chang, C-F., Hamilton, P. B. (1979a). Poultry Sci., 58, 559-561.

Chang, C-F., Hamilton, P. B. (1979b). Poultry Sci., 58, 562-566.

Fernández A. et al. (1995). J. Appl. Toxicol. (aceptado).

Lanza G. M. et al. (1980a). Poultry Sci., 59, 282-288.

Lanza G. M. et al., (1980b). Poultry Sci., 59, 2686-2691.

Miller, D.M., Wilson, D.M., (1994). The Toxicology of Aflatoxins. Academic Press.

Steele R.W. (1991). Reviews of Infectious Diseases, 13, 918-925.

Thomas V.L. et al., (1988). J. Immunol. Methods, 111, 227-232.

Tung H-T et al., (1975). Poultry Sci., 54, 1962-1969.