

Perfil leucocitario en becerros anémicos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales

Leukocyte Profile in anemic calves naturally infected with gastrointestinal nematodes

Mariana Barrios*, Espartaco Sandoval, Jorge A. Borges, Darwin Sánchez, Yanireth Bastardo Rondón, Oswaldo Márquez y Lisbeth Dávila

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) Yaracuy. *Correo electrónico: mbarrios@inia.gob.ve

RESUMEN

Con el objeto de investigar la respuesta leucocitaria generada en becerros anémicos infectados con nematodos gastrointestinales, se tomaron muestras de sangre y heces a 76 becerros mestizos para realizar análisis hematológico y coprológico. En ausencia de anemia, el conteo de leucocitos se mostró dentro del límite de referencia en los animales no parasitados e incrementado significativamente en los animales parasitados (11,76 vs 16,17 x 10³/ul, P<0,05, respectivamente). En animales anémicos el conteo de leucocitos no mostró ninguna modificación ante la presencia o ausencia de parásitos (11,88 y 12,50 x10³/ul, respectivamente). En animales sin anemia, la mayoría de los casos de infecciones parasitarias resultaron leves a moderados, presentando un conteo de leucocitos incrementado solo en los casos leves. Los linfocitos se mostraron como el tipo celular predominante en la respuesta con la participación de eosinófilos y neutrófilos. En animales anémicos la mayoría de los casos fueron moderados a graves, los conteos de leucocitos totales, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos se mantuvieron constantes en las infestaciones leves y moderadas, con una disminución significativa de los mismos en las infestaciones graves (P<0,05). Se sugiere que en los becerros anémicos no existe una respuesta leucocitaria adecuada ante el reto parasitario, con un alto número de casos graves.

Palabras clave: respuesta inmune, parásitos gastrointestinales, hematología.

ABSTRACT

In order to assess the leukocyte response generated in anaemic calves infected with gastrointestinal nematodes, blood and feces samples were taken from 76 crossbred calves for hematologic and coprologic analysis. In anaemic animals the leukocyte count showed no significant change in presence or not of parasites (11.88 and 12.50 x 10³/ul, respectively). In animals without anaemia most cases of parasitic infections were mild to moderate, presenting an increased leukocyte count only in mild cases. The lymphocytes were the predominant cell type in the response with presence of eosinophils and neutrophils. In anaemic animals most were moderate to severe cases, the total leukocyte, lymphocyte, eosinophil and neutrophil counts did not show significant change in mild and moderate cases, with a significant decrease in serious cases (P<0.05). It is suggested that in anaemic calves there is no adequate leukocyte response to parasite challenge, with a high number of severe cases.

Key words: immune response, gastrointestinal parasites, hematology.

INTRODUCCIÓN

La anemia es un proceso caracterizado por una disminución en el número de glóbulos rojos (GR) circulante en sangre, una reducción del contenido de hemoglobina en estas células o ambos factores a la vez. Puede ser provocada por pérdida, destrucción excesiva o producción disminuida de este tipo celular (Coles, 1986). Numerosas publicaciones han documentado estudios experimentales en animales y seres humanos, los cuales demuestran que en estados carenciales, como la anemia, se puede reducir la resistencia del organismo a las infecciones, así como afectar de modo adverso el sistema inmunológico.

Dice Figueredo *et al.* (2006), en un estudio realizado en becerros con anemia ferropénica sugieren que la anemia compromete seriamente los mecanismos de defensa del organismo favoreciendo el incremento de la morbilidad por diarreas y neumopatías, pues ésta disminuye la actividad de los macrófagos y la producción de anticuerpos, y el hecho de que algunos animales desarrollen anemia depende por un lado de las reservas orgánicas de hierro al nacimiento y la pobre utilización de otras fuentes como el pasto que, en el animal adulto, debe satisfacer toda su demanda.

La anemia y las infecciones parasitarias son los dos principales problemas sanitarios que afectan a los becerros, reportándose prevalencias superiores al 70% para ambos padecimientos (Barrios *et al.*, 2010a), por lo que surge el interés de estudiar el comportamiento del perfil leucocitario en becerros anémicos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de sangre y de heces a un grupo de 76 becerros mestizos, de ambos sexos, con edad y peso promedio de 149 días y 103 kg, respectivamente, provenientes de tres unidades de producción de doble propósito en el sector La 36 del municipio Manuel Monge, estado Yaracuy en Venezuela. A estos animales se les realizó: a) estudio hematológico, para el diagnóstico de anemia y reacción leucocitaria y b) estudio coprológico, para el diagnóstico y cuantificación de la infección parasitaria.

La muestra de sangre se tomó en forma aséptica por venipunción de la vena yugular utilizando el sistema vacutainer y la muestra de heces por estimulación peristáltica de la ampolla rectal utilizando una bolsa de recolección a manera de guante. Estos procedimientos se realizaron según metodología descrita por Sandoval *et al.* (2008).

La concentración de hemoglobina fue determinada por el método de la cianometahemoglobina (kit comercial Hemoglownier); el hematocrito, por la técnica del microhematocrito y el conteo de eritrocitos con cámara hematimétrica utilizando solución salina al 0,9% como diluyente.

El conteo de leucocitos totales se realizó utilizando cámara hematimétrica y solución de Turk como diluyente. El recuento diferencial de leucocitos se obtuvo contando 100 células a partir de un frotis de sangre periférica coloreado con Giemsa, obteniendo de esta manera contajes relativos, los cuales fueron transformados a valores absolutos considerando el número total de leucocitos como 100% (Schalm *et al.*, 1981).

Se utilizó la técnica coprológica cuantitativa de McMaster, empleando solución salina hipersaturada como líquido de flotación (Campos y Bautista, 1989).

Se consideraron anémicos a aquellos animales que presentaron una o más de las siguientes condiciones: hemoglobina (Hb) < 10 g/dl; hematocrito (Hto) < 30%, y/o glóbulos rojos (Gr) < $5,0 \times 10^6$ /ul. Se consideraron parasitados a aquellos animales que presentaran más de 50 huevos por gramo de heces (hpg). La clasificación según el nivel de infección se hizo de acuerdo con los criterios establecidos por Skerman y Hillard (1966): casos graves (>700 hpg), casos moderados (300-700 hpg) y casos leves (50-250 hpg).

En base a la presencia de anemia y de infestación parasitaria los animales fueron clasificados en cuatro grupos (Cuadro 1): I.) Sin anemia y sin parásitos, II.) Sin anemia con parásitos, III.) Anémicos sin parásitos y IV.) Anémicos con parásitos. La mayoría de los animales se ubicaron en los grupos III y IV (n= 11 y 53, respectivamente), es decir que el 84% de los animales presentaron anemia, de los cuales

Cuadro 1. Frecuencia absoluta de becerros con y sin anemia, infectados o no, en forma natural con nematodos gastrointestinales.

	Sin parásitos	Con parásitos	Total	*p
Sin anemia	5 (I)	7 (II)	12	0,56
Con anemia	11(III)	53 (IV)	64	< 0,0001
Total	16	60	76	---
*p	0,13	< 0,0001	---	---

Prueba Ji cuadrado. Diferencias estadísticamente significativas, con un valor de $P < 0,05$. Los números romanos entre paréntesis, indican el grupo en que fueron clasificados.

14% no se encontraban parasitados y 70% si. Del porcentaje de animales sin anemia (grupos I y II) el 7% no se encontraba parasitado y el 9% si.

Los valores promedios del estudio hematológico de la serie roja y de la coprología, para los cuatro grupos se muestran en el Cuadro 2, donde se observa claramente como en los grupos I y II los valores hematológicos están normales, respecto a los otros grupos (III y IV), en donde estos se encuentran disminuidos, describiéndose claramente un estado de anemia.

Para el análisis del perfil leucocitario se determinó la media y la desviación estándar, estudiándose la diferencia entre medias, realizando el análisis de varianza. Todo el análisis estadístico se realizó con el programa InfoStat (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores promedio del contejo de leucocitos ($\times 10^3/\text{ul}$) en becerros con y sin anemia se muestran en el Cuadro 3. En el grupo de animales sin anemia y sin parásitos, el contejo de leucocitos se encontró dentro del límite de referencia ($11,76 \times 10^3/\text{ul}$), mientras que en el grupo de animales sin anemia y con parásitos se observó un incrementado significativo de los leucocitos totales ($16,17 \times 10^3/\text{ul}$).

El contejo de leucocitos, es uno de los componentes inflamatorios que se altera ante la irrupción de un agente extraño, tal es el caso de los nematodos, donde normalmente debe existir un incremento en el número de estas células ante el reto parasitario (Bautista, 2009; Barrios *et al.*, 2011). La respuesta inmune contra los nematodos puede ser transitoria y poco eficaz,

desarrollándose a medida que los animales están en contacto con los parásitos, por consiguiente es importante que este contacto se de a temprana edad para que la inmunidad se vaya desarrollando paulatinamente (Villar, 2007).

En el caso de los grupos de animales anémicos, el contejo de leucocitos permaneció normal ante la presencia o no de parásitos ($11,88$ y $12,50 \times 10^3/\text{ul}$, respectivamente). Esta falta de respuesta a la infección parasitaria pudiera estar relacionada con los estados carenciales (deficiencia de nutrientes) propios de los procesos anémicos, ya que los animales anémicos sufren desajustes en su fisiología, condicionándolos a una disminución de sus mecanismos de resistencia (Figueredo *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que animales bien nutridos son generalmente menos susceptibles a las infecciones parasitarias, en los cuales, aun si se establecen endoparásitos, sus efectos pasan desapercibidos y se ha demostrado que rupturas en el plano nutricional afectan la inmunidad y permiten el establecimiento de parásitos adultos (Coop y Kyriazakis, 1999). Es tal la importancia de la nutrición en las infecciones por parásitos internos, que algunos autores consideran a ésta como el efecto primario y a los parásitos jugando un papel secundario en la presencia de la enfermedad (Villar, 2007).

Al evaluar la frecuencia de animales sin anemia de acuerdo al nivel de infestación (Figura 1), se observó que la mayoría de los casos resultaron infecciones leves a moderadas, con apenas un caso grave; por su parte el contejo de leucocitos totales mostró un incremento en los casos de infecciones leves que tendió a

Cuadro 2. Valores promedio del estudio hematológico de la serie roja y de la coprológica en becerros infectados o no en forma natural con nematodos gastrointestinales.

Grupos	I	II	III	IV
Hb (g/dl)	11,7 ± 1,2	11,7 ± 1,2	10,5 ± 2,3	9,2 ± 2,1
Hto (%)	33 ± 4	34 ± 4	28 ± 6	26 ± 6
Gr (x 10 ⁶ /ul)	7,92 ± 3,63	10,27 ± 3,34	4,25 ± 2,72	4,43 ± 2,38
hpg	0	450	0	950

Hb: hemoglobina; Hto: hematocrito; Gr: glóbulos rojos; hpg: huevos por gramo de heces. I: sin anemia y sin parásitos; II: sin anemia con parásitos; III: anémicos sin parásitos; IV: anémicos con parásitos.

Cuadro 3. Valores promedio del conteo de leucocitos (x10³/ul) en becerros con y sin anemia infectados o no en forma natural con nematodos gastrointestinales.

	Sin parásitos (x10 ³ /ul)	Con parásitos (x10 ³ /ul)	*p
Sin anemia	11,76 ± 3,34(I)	16,17 ± 4,40(II)	0,04
Con anemia	12,50 ± 3,67(III)	11,88 ± 4,82(IV)	0,69
*p	0,71	0,02	---

*Análisis de varianza. Diferencias estadísticamente significativas, con un valor de P<0,05

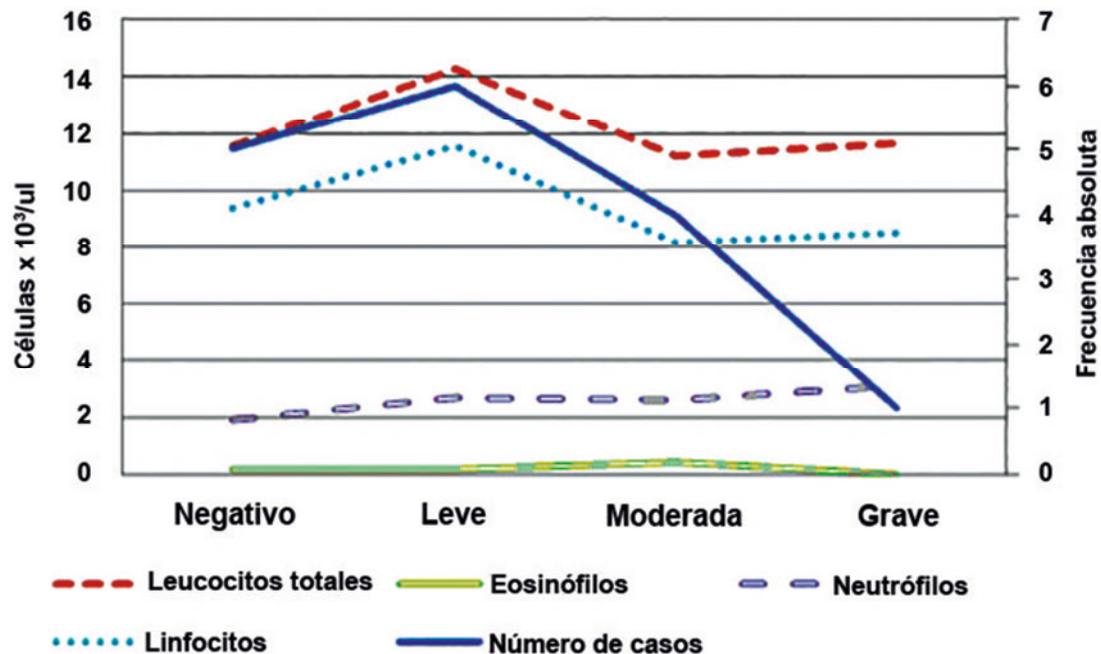


Figura 1. Reacción leucocitaria y frecuencia de animales sin anemia infectados con nematodos gastrointestinales.

normalizarse; todos los cambios observados fueron significativos ($P < 0,05$).

La leucocitosis en los casos leves y moderados probablemente se deba a una respuesta a la infestación, la cual permitió el control de la misma consiguiéndose solo un caso grave, donde el recuento de leucocitos fue normal. El comportamiento de los diferentes tipos de leucocitos, en este grupo, mostró un incremento en el conteo de eosinófilos en los casos de infección moderada, seguido de una caída drástica en los casos graves, resultados que coinciden con los de Sandoval *et al.* (2007) en ovejas; por su parte los neutrófilos, presentaron un incremento progresivo desde los casos leves hasta alcanzar su pico máximo en los casos graves y finalmente los linfocitos presentaron un incremento significativo en los casos leves con una disminución progresiva hasta alcanzar límites normales en los casos de infección moderada y grave, comportándose esta curva de la misma manera que la del conteo de leucocitos totales.

Estos resultados permiten inferir que el tipo celular responsable del incremento en el conteo de leucocitos en los casos leves, es el linfocito, el cual probablemente active una respuesta celular, donde participan los eosinófilos y neutrófilos para controlar la infección (casos moderados), resultando en un número reducido de casos graves.

Los eosinófilos liberan peroxidasa, proteína básica y catiónica, neurotoxinas y una gran variedad de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y mediadores lipídicos que son perjudiciales para el parásito, lo que las convierte en potentes células efectoras. Los neutrófilos, por su parte, son capaces de fagocitar y producir una serie de citocinas pro-inflamatorias y liberar especies reactivas de oxígeno (aniones superóxido, peróxidos, radicales hidroxilo y halógenos) las cuales son responsables de la expulsión de los gusanos adultos (De Veer *et al.*, 2007; Rothenberg y Hogan, 2006).

Estos resultados reflejan una adecuada respuesta de las células inflamatorias al estímulo antigénico constante (pastos infectados con nematodos gastrointestinales), destacándose el protagonismo de los linfocitos y los eosinófilos en dicha respuesta (Barrios *et al.*, 2011).

Kanobana *et al.* (2003) demostraron que las infecciones primarias y secundarias con el parásito *C. oncophora* están asociadas con dos olas de eosinófilos, la primera independiente de linfocitos T y la segunda dependiente de linfocitos T (CD4+), comprobándose el papel que tienen los eosinófilos como células efectoras contra estadios adultos de este parásito.

En los animales anémicos (Figura 2) la mayoría de los casos fueron moderados a graves, los conteos de leucocitos totales, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos se mantuvieron constantes en las infestaciones leves y moderadas, con una disminución significativa de los mismos en las infestaciones graves ($P < 0,05$). Estos resultados sugieren que no existe respuesta leucocitaria adecuada ante la infección parasitaria, permitiendo un gran número de casos moderados y graves. La caída significativa de los leucocitos en los casos graves pudiera estar relacionada a factores parasitarios que logran modular y/o evadir la respuesta leucocitaria (Bautista, 2009; Barrios *et al.*, 2011).

La relación entre el estado nutricional, la respuesta inmune y la susceptibilidad a infecciones ha sido un tema considerado en investigaciones recientes. Es generalmente aceptado que la malnutrición de moderada a severa resulta en un deterioro variable de la respuesta inmune, más notablemente la inmunidad mediada por células, actividad fagocítica, sistema de complemento y la inmunidad de mucosas. Relacionado con el estado nutricional, el hierro es un nutriente esencial para la mayor parte de los tejidos, un factor importante en la actividad vital de cada célula del organismo y cumple varias funciones biológicas en él.

Es importante destacar, que la influencia de la deficiencia de hierro (anemia ferropénica) sobre la respuesta del sistema inmune había sido documentada en animales de laboratorios y roedores, mostrando una reducida síntesis del ADN linfocitario, disminuciones del número de células T, y en la actividad citotóxica (Vale, 1999; Martínez, 2009).

Por otra parte, Papale *et al.* (2008) señalaron que la anemia ferropénica influye en la infestación parasitaria, ya que el hierro se encuentra involucrado en la modulación de la respuesta inmune contra los parásitos. Asimismo, la

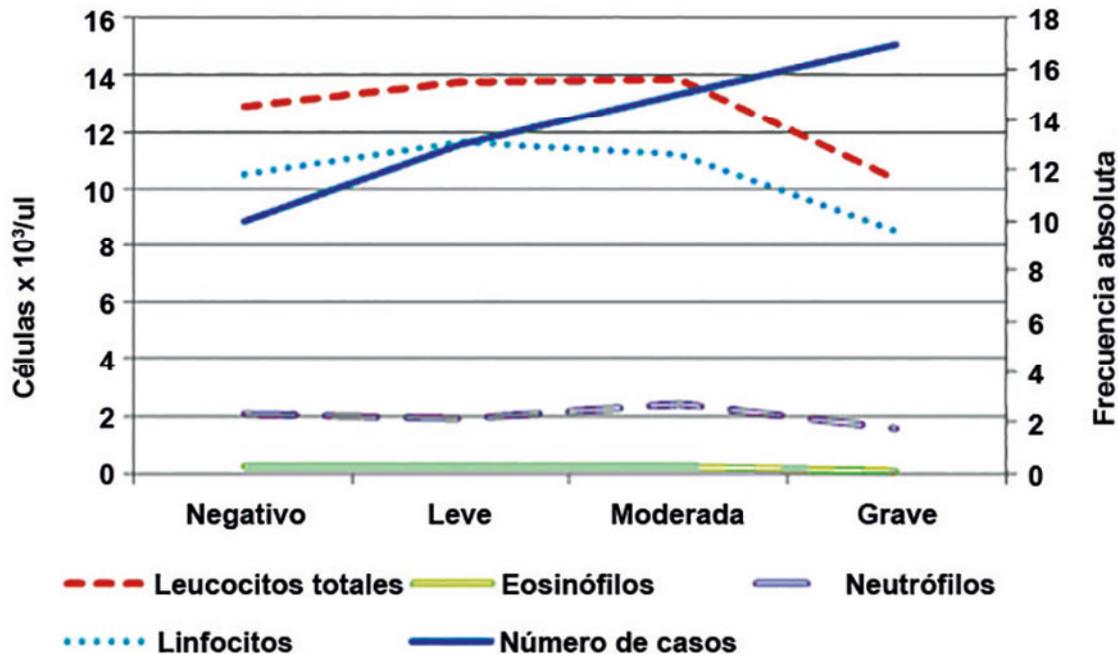


Figura 2. Reacción leucocitaria y frecuencia de animales anémicos infectados con nematodos gastrointestinales.

infección parasitaria contribuye al aumento en la prevalencia de anemia bien sea debido a pérdidas sanguíneas o impidiendo la absorción de estos nutrientes.

Sárközy *et al.* (1985), estudiaron la respuesta inmunitaria frente a Adenovirus tipo 1, inactivado, en terneros anémicos, encontrando una respuesta de anticuerpos neutralizantes, más baja que en los controles. Este grupo sugiere que la anemia es responsable de la pobre respuesta observada en los animales de ensayo.

Adicionalmente, Figueredo *et al.* (2006), demostraron que la anemia en terneros lactantes, aumenta el riesgo de morbilidad general desde 2,2 a 4,5.

CONCLUSIONES

Este estudio sugiere que en los becerros anémicos no existe una respuesta leucocitaria adecuada ante el reto parasitario, con un alto número de casos graves, mientras que, en los becerros sin anemia la reacción leucocitaria resulta efectiva, con un número inferior de casos graves.

Estos resultados abren nuevas perspectivas para realizar más estudios que permitan integrar aspectos bioquímicos, nutricionales e inmunológicos con los diferentes tipos de anemia en la búsqueda de correlacionar los estados carenciales con la susceptibilidad a enfermedades y disfunciones del sistema inmunológico.

LITERATURA CITADA

- Barrios, M., E. Sandoval, O. Camacaro, D. Sánchez, L. Domínguez, y O. Márquez. 2011. Leucograma y perfil proteico en becerros mestizos doble propósito, resistentes y susceptibles a la infestación natural por nematodos gastrointestinales. *Zootecnia Trop.*, 29(3): 363-372.
- Barrios, M., E. Sandoval, D. Sánchez y D. Fernández. 2010a. Efecto de un Tratamiento Antihelmintico sobre los Diferentes Tipos de Anemia Presentes en Becerros Parasitados con Estróngilos Digestivos. *Mundo Pecuario*, VI (1): 06-11.
- Barrios, M., E. Sandoval, R. Belisario, O. Camacaro, L. Domínguez y O. Márquez.

- 2010b. Clasificación de la anemia y su relación con el sexo, edad y carga parasitaria en becerros doble propósito del Valle de Aroa-estado Yaracuy. REDVET, 11(2). Disponible en línea: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020210/021003.pdf>. [Jun, 06, 2012]
- Barrios, M., E. Sandoval, J. Borges, D. Sánchez, Y. Bastardo y O. Márquez. 2012. La anemia en becerros: una limitante para su desarrollo. *Venezuela Bovina*, 23: 82-84.
- Bautista, C. 2009. Helmintos parásitos de importancia veterinaria: regulación de la respuesta inmunitaria del portador y su uso potencial para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. *Vet. Méx.*, 40 (3): 283-291.
- Campos, R. and R. Bautista. 1989. Diagnóstico de helmintos y hemoparásitos de rumiantes. *Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria*, A. C. pp. 24-27.
- Coles, L. 1986. *Veterinary Clinical Pathology*. (4^a ed.) Saunders. Philadelphia, Estados Unidos, pp. 103-105.
- Coop, R. y I. Kyriazakis. 1999. Nutrition-parasite interaction. *Vet. Parasitol.*, 84(3-4):187-204.
- De Veer, Kemp J. and E. Meeusen. 2007. The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunology*, 29: 1-9.
- Fetterer, R. H. and M. L. Rhoads. 1998. A hemolytic factor from *Haemonchus contortus* alters erythrocyte morphology. *Veterinary Parasitology*. 80 (1): 37-45.
- Figueredo, J. M., M. Abeledo y E. Vega. 2006. Influencia de la anemia en la aparición de procesos diarreicos y neumónicos del ternero. Disponible en línea: <http://www.monografias.com/trabajos40/anemia-ternero/anemia-ternero.html>. [Jun. 06, 2012]
- Figueredo, J. M., M. Abeledo y E. Vega. 2010. Determinación de la prevalencia de anemia en terneros en un sistema de cría artificial. REDVET, 11(3). Disponible en línea: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030310/031007.pdf>. [Jun. 10, 2012]
- INFOSTAT. InfoStat versión 2004. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Kanobana, K, A. Koets, N. Bakker, H. W. Ploeger and L. Vervelde. 2003. T-cell mediated immune responses in calves primary-infected or re-infected with *Cooperia oncophora*: similar effector cells but different timing. *Int J Parasitol*. Nov;33(13):1503-14.
- Martínez, I. 2009. Comportamiento del hierro sérico y la inmunidad celular en ancianos institucionalizados en el hogar "Santovenia". *Rev Cubana Med Gen Integ*. 25(4): 43-53.
- Papale, J., M. García, M. Torres, Y. Berné, G. Dellan, D. Rodríguez y N. Mendoza. Anemia, deficiencias de hierro y de vitamina A y helmintiasis en una población rural del estado Lara. *An.Venez.Nutr*. 21 (2): 70-76.
- Pino, L. y G. Morales. 2004. Características del parasitismo por nematodos gastrointestinales en rumiantes domésticos de Venezuela. REDVET. Disponible en línea: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n01104.html>. [Jun. 13, 2012]
- Rothenberg M. and S. Hogan. 2006. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.*, 24: 147-174.
- Sandoval, E., W. Montilla y D. Jiménez. 1997. Evolución de la parasitosis, hematología y crecimiento en becerros predestete en una finca de doble propósito, ubicada en la unidad agroecológica I61 del Valle de Aroa. *Veterinaria Tropical*. 22(2): 101-118.
- Sandoval, E., G. Morales, L. Pino, D. Jiménez, y O. Márquez. 2007. Evaluación del comportamiento leucocitario en ovejas a pastoreo como un criterio para determinar la susceptibilidad a la infección con estróngilos digestivos. REDVET. VIII (9). Disponible en línea: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090307/09072.pdf>. [Jun. 13, 2012]
- Sandoval, E., D. Jiménez, O. Márquez, G. Morales y L. Pino. 2008. Manual para la toma y conservación de muestras biológicas con fines diagnósticos en

- rumiantes. Publicación CIEPE. San Felipe, Venezuela. 8 p.
- Sandoval, E., M. Barrios M., G. Morales, O. Camacaro, L. Domínguez y O. Márquez. 2010. Clasificación morfológica de la anemia en vacunos mestizos de doble propósito criados en una zona de bosque seco tropical. *Zootecnia Trop.*, 28(4): 535-544.
- Sárközy, P., V. Pálfi, E. Schultz, A. Misley and F. Williams. 1985. Immune Response in Anaemic Calves. *Zentralblatt für Veterinärmedizin in Reihe B*, 32: 317–325.
- Shchelm O., N. Dain, E. Carrol. 1981. *Hematología Veterinaria* (1ª Ed). Hemisferio sur. Buenos Aires, Argentina. 857 p.
- Skerman, K. and J. Hillard. 1966. A handbook for studies of helminth parasites of ruminants. Near East Animal Health Institute, Teheran. Handbook No 2. Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). Roma. 196 p.
- Vale, O. 1999. Nutrición, inmunidad e infección en cerdos: papel del hierro, vitamina E y selenio. Una revisión. *Revista Científica, FCV-LUZ*. IX (3):174-179.
- Villar, C. 2007. Efectos del parasitismo gastrointestinal sobre la nutrición en vacunos. Disponible en línea: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/nutricion/articulos/efectos-parasitismo-gastrointestinal-sobre-t1556/p0.htm>. [Jun. 06, 2012]