

NOTA TÉCNICA

Evaluación del hemoleucograma en becerros esplenectomizados *Bos taurus* de biotipos diferentes

Evaluation of hemoleucogram *Bos taurus* in splenectomized calves of different biotypes

Ana María Álvarez^{1*}, Emir Espinoza^{2*}, Carmen Madrid³, Abigail Muñoz¹ y Nersa González².

^{1*}Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Unidad de Sanidad Animal. Maracay, Aragua, Venezuela.

^{2*}Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT). San Antonio de los Altos, Miranda, Venezuela.

³Ejercicio Libre. Correo electrónico: amarlvarez@yahoo.com*, espinozaemir@yahoo.com*

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar la posible influencia del biotipo bovino (Holstein y Pardo Suizo), sobre el hemoleucograma de becerros esplenectomizados se utilizaron cuatro animales, dos de cada biotipo. El procedimiento quirúrgico utilizado mostró ser seguro, no observándose trastornos postoperatorios atribuidos al mismo. Las variables estudiadas comprendieron el hemoleucograma absoluto y las proteínas séricas totales, mediante el empleo de procedimientos estándares no automatizados. Se demostró que el eritograma y leucograma, fue influenciado por el factor etario ($P < 0,05$). A partir de los resultados obtenidos, no se puede afirmar cuál de los dos biotipos usados, sea el mejor modelo para el estudio de hemotrópicos de interés médico veterinario. Las modificaciones en las variables analizadas se atribuyen al estrés quirúrgico, lo cual pudo acelerar la producción de radicales libres y de las proteínas de fase aguda.

Palabras clave: Hemoleucograma, esplenectomía, Holstein, Pardo Suizo.

ABSTRACT

In order to assess the possible influence of the biotype (Holstein and Brown Swiss) on splenectomized calves hemoleucogram four animals were used, two of each biotype. Surgical procedure showed to be safe, postoperative disorders attributed to the same were not observed. Variables studied were absolute hemoleucogram and total serum protein, using standard procedures not automated. It was demonstrated that eritogram and leucogram was influenced by the age factor ($P < 0.05$). From these results, one can not say which of the two biotypes used, is the best model to study hemotropic of veterinarian interest. Changes in variables analyzed were attributed to surgical stress, which can accelerate free radical production and acute phase protein.

Key words: Hemoleucogram, splenectomy, Holstein, Brown Swiss.

INTRODUCCIÓN

La carencia de un modelo animal de laboratorio es uno de los principales obstáculos en los esfuerzos de los investigadores para elucidar los mecanismos clínicos, patogénicos e inmunitarios, entre otros, de las enfermedades hemotrópicas (anaplasmosis y babesiosis) transmitidas por garrapatas de la familia Ixodidae (*Rhipicephalus microplus*). Las estrategias de control mundial de estas noxas se enfocan hacia el uso de métodos más eficaces y sostenibles como es la vacunación (Bittar *et al.*, 2004). Para ello, se investigan inmunógenos o vacunas producidas con hemotrópicos atenuados, inactivados, subunidades de parásitos, proteínas recombinantes, cultivo celular y péptidos sintéticos (Facury *et al.*, 2012; Dark *et al.*, 2011; Murta, 2005).

En la actualidad, uno de los requisitos para probar la eficacia de esas vacunas, es la necesidad de contar con bovinos libres de hemoparásitos (*Anaplasma marginale*, *Babesia* sp.) y áreas exentas de garrapatas por considerarse a estos ectoparásitos como los principales vectores de la anaplasmosis y babesiosis bovina (Shkap *et al.*, 2007).

Las investigaciones sobre estos hemotrópicos en Latinoamérica y Venezuela, utilizan principalmente bovinos de la raza Holstein y en menor cuantía sus cruces u otras razas, sean de procedencia *taurus* o *indicus* (Rojas *et al.*, 2011; Blandino y Alonso, 2004; Espinoza *et al.*, 2002; Giardina *et al.*, 1993).

De tal manera, se presentan dificultades en el origen de los bovinos para uso experimental. Los de fuente *Bos taurus* son genéticamente más susceptibles a los hemotrópicos, cuando son comparados con los de origen *Bos indicus* (Góes, 2007; Espinoza *et al.*, 2002), pero en relación a los *Bos taurus* no hay citaciones que señalen cual raza es la más idónea para estudios experimentales con protozoarios y rickettsias intraeritrocitarias (Bittar *et al.*, 2004).

En esta investigación preliminar se propuso estudiar sobre los biotipos *Bos taurus* Holstein y Pardo Suizo esplenectomizados, la interacción del hemoleucograma y las posibles variaciones entre ellos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon cuatro becerros *Bos taurus*, dos del biotipo Holstein con siete meses de edad aproximadamente y dos biotipo Pardo Suizo de cinco meses. Previo a la esplenectomía experimental, todos los becerros fueron cuidadosamente examinados para descartar enfermedades hemotrópicas preexistentes, mediante el uso de técnicas parasitológicas, serológicas y moleculares (datos no presentados). La inmunosupresión quirúrgica se realizó mediante protocolo convencional (Reinbol *et al.*, 2010). Todo esto fue realizado manteniendo los principios bioéticos para ensayos o experimentos con mamíferos vivos.

Los animales experimentales se mantuvieron en un galpón bajo condiciones controladas para ectoparásitos y su alimentación consistió en el suministro de heno, alimento concentrado, minerales, vitaminas y agua *ad libitum*. El lapso del experimento abarcó seis semanas en los dos grupos de animales estudiados. Posterior a la esplenectomía, se tomaron muestras de sangre completa y suero, mínimo dos veces por semana. Las variables evaluadas correspondieron a la condición corporal (estado físico, datos no presentados), temperatura rectal (Temp), hematocrito (Ht), hemoglobina (Hb), número total de eritrocitos (NTE), número total de leucocitos (NTL), plaquetas (Plaq) y proteína sérica total (PST), mediante procedimientos estándares no automatizados (Benesis *et al.*, 2012ab; Rengifo *et al.*, 2010); Los resultados se expresaron en unidades internacionales estándares SI (Kaneko, 1989; Sandoval *et al.*, 1994).

Previamente al análisis estadístico, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks con el fin de determinar la normalidad de los datos, resultando que los mismos se ajustaron a una distribución normal. Los valores se agruparon en medias y su desviación estándar, comparándose por intermedio de una prueba "t" Student's para muestras independientes con un valor máximo del 5% (Petrie y Watson, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente evaluación, no se evidenció ninguna reacción adversa que pudiera

ser atribuida a la cirugía en los becerros esplenectomizados. Los valores de los componentes del hemoleucograma obtenidos en este trabajo preliminar, están representados en el Cuadro. Los valores medios de la temperatura rectal postesplenectomía en ambos grupos, no indicaron diferencia estadística, a pesar de ser los animales diferentes en biotipo y edades. Las anteriores medias oscilaron dentro de los valores fisiológicos señalados para la especie (Blood y Radostits, 1992).

Referente a los índices eritrocíticos Ht, Hb y NTE se notó desigualdad estadística ($P < 0,05$) al confrontar las medias respectivas del conjunto Holstein y Pardo Suizo; observándose para el caso de la hemoglobina que los becerros pardo suizo expresaron una media (14 g/l), ubicada hacia el límite superior señalado por algunos autores en sus investigaciones o por la literatura como referencia para los bovinos (Benesis *et al.*, 2012a; Espinoza *et al.*, 2002; Jain, 1986). Espinoza *et al.* (2002) estudiando la tetralogía hemotrópica en becerros biotipo cebuínos esplenectomizados a nivel de campo, encontraron promedios para la variable Ht y Hb cifras de 0,28 y 100 g/l, respectivamente. En el país existen muy pocos artículos donde se describan los parámetros del fisiologismo en becerros posterior a las esplenectomías o que traten de explicar si existe o no correlación dada la heterogenicidad de los animales utilizados en esos ensayos (Espinoza *et al.*, 2002; Giardina *et al.*, 1993; Aso, 1987).

A pesar que el efecto edad de los animales experimental, podría influenciar el NTE y la concentración de la hemoglobina, es difícilmente definible por los datos visualizados en esta investigación técnica, expresar que las diferencias encontradas en el índice hematimétrico hemoglobina, sea atribuible inequívocamente a la edad de los becerros pardo suizo.

En cuanto a los parámetros hematológicos (eritrograma) en su conjunto, la supresión quirúrgica del bazo no afectó tales variables en los dos grupos analizados; la explicación podría ser inferida, dado que la producción de eritrocitos es regulada por la eritropoyetina, hormona secretada por el riñón, y este metabolito puede estimular bajo un régimen adecuado de proteínas, minerales y vitaminas a la médula ósea para aumentar su ritmo de producción, aproximadamente en 48 a 78 horas, lo cual quizás contribuya de manera fehaciente a que los becerros esplenectomizados recuperen rápidamente sus valores del eritrograma (Goez, 2007), si están sometido durante el lapso experimental a una alimentación adecuada.

El número de leucocitos circulantes se modifica considerablemente, y la variación depende además de la edad, de otros factores entre los cuales se debe considerar el estrés (estado fisiológico del animal; Jain, 1986). En este estudio preliminar, los datos conseguidos del NTL en los dos grupos valorados se mantuvieron durante todo el lapso experimental dentro del rango de

Cuadro. Valores medios y desviación estándar ($X \pm DE$) del hemoleucograma en los becerros Holstein y Pardo Suizo esplenectomizados.

VARIABLES	HOLSTEIN		PARDO SUIZO		DS ¹
	X	± DE	X	± DE	
Temp (°C)	38,5	0,2	38,6	0,2	
Ht (l/l)	0,28	0,02	0,32	0,02	0,05
Hb (g/l)	91	10	141	14	0,05
NTE (T/l)	6,6	0,7	7,3	1,1	0,05
NTL (g/l)	6,8	0,7	7,5	0,8	0,05
Pla (x 1000)	235	43	247	70	
PST (g/l)	68	6	65	4	

¹ Diferencia significativa ($P < 0,05$); X = media.

4 a 12 g/l mencionado por Jain (1986). De la misma manera, las medias estuvieron próximas a la cifra referencial (Benesi *et al.*, 2012b; Jain, 1986). Se observó que los becerros Pardo Suizo indicaron una media más alta que los Holstein, y a su contrastación estadística, reflejaron diferencia significativa ($P < 0,05$). Inferimos que la explicación anterior, pudiera ser atribuida a la edad del grupo P S (cinco meses), ya que el contaje del NTL tiende ser alto en animales en crecimiento (Jain, 1986).

En consecuencia, la esplenectomía como estrés quirúrgico, y al afectar las subpoblaciones de leucocitos, debió producir diversas anomalías inmunológicas, como disminución en los niveles de anticuerpos (IgM, IgG), disfunción del sistema fagocítico mononuclear (SFM) y respuesta anormal a la presencia de antígenos (Brandt *et al.*, 2005; Ochoa *et al.*, 2003), situación que no se pudo evidenciar o deducir en este estudio piloto. En ese mismo orden de ideas, existen suficientes evidencias que la producción de una herida quirúrgica, presupone el incremento de la demanda calórica, de células involucradas en los procesos inflamatorios y las de reparación hística. De forma paralela, la reconstrucción y/o reparación del tejido lesionado, requiere la colaboración proteica con aporte de aminoácidos esenciales, siendo estos a su vez indispensables para la glucogenogénesis, síntesis de proteínas plasmáticas y reactantes de fase aguda.

Con relación a las plaquetas (Cuadro) se observa que las medias en los dos grupos experimentales, se mantuvieron por debajo del promedio referencial (5×10^5), aunque el rango para este índice es bastante amplio ($1 - 8 \times 10^5$; Jain, 1986). La comparación estadística no fue significativa. Por consiguiente, la esplenectomía no afectó o alteró de manera comprometida el sistema de la coagulación, hallazgo clínico laboratorial que permite el monitoreo del tratamiento y formular un pronóstico después del estrés quirúrgico.

La determinación de la PST reveló que los valores medios de los becerros (Cuadro), fueron muy parecidos a los aludidos como fisiológicos en la literatura (Cotter, 2001; Harvey, 2001), y no arrojaron desigualdad estadística entre las medias. Por consiguiente la inmunosupresión

quirúrgica aparentemente no afectó la funcionalidad de las mismas; y su interpretación conjuntamente con los valores medios del hematocrito, permitió interpretar un cuadro fisiológico normal en los animales sometidos al estrés quirúrgico posterior a la esplenectomía (Tavares, 2007; Harvey, 2001).

Es importante acotar que Ochoa *et al.* (2003) en sus trabajos experimentales, utilizando como modelo biológico ratas Sprague Dawley, demostraron que la esplenectomía disminuye la producción de óxido nítrico y posiblemente otros radicales libres por parte del hígado, y como consecuencia el organismo es incapaz de producir una respuesta de fase aguda para cumplir con las propiedades metabólicas de destrucción de microorganismos por fagocitosis, síntesis de mediadores inflamatorios y la detoxificación.

Lo anterior es importante, y debería tomarse muy en cuenta al realizar la evaluación del comportamiento de los bovinos y sus biotipos cuando sean utilizados como modelos experimentales en el estudio enfermedades hemotrópicas para el desarrollo o adaptación de nuevas técnicas y protocolos, pruebas de fármacos, además de la implementación de enfoques terapéuticos acorde a las patologías estudiadas. Igualmente, por analogía las inquietudes aquí plasmadas como resultados de la interpretación de los datos, podrían dar algunas orientaciones sobre el comportamiento de la anaplasmosis y babesiosis bovina en animales a nivel de campo, los cuales generalmente están sometidos a un estrés constante por diversos agentes que conducen a múltiples desequilibrios de la homeostasia generando una respuesta con analitos de fase aguda, para contrarrestar los disturbios causados por las noxas, el daño tisular y los desórdenes inmunológicos.

A manera de conclusión no podemos afirmar con los datos aportados por este estudio piloto y el número de animales utilizados, cuál de los dos biotipos de animal *Bos taurus*, sea el mejor modelo para la replicación de hemotrópicos de interés médico veterinario, ya que las diferencias observadas podrían atribuirse a alteraciones fisiológicas pasajeras (estrés) dada las condiciones experimentales. Del mismo modo, se puede deducir que en el bovino

esplenectomizado existen otros mecanismos involucrados que pueden compensar la ausencia de subpoblaciones de leucocitos del SFM, indispensables para la respuesta inmune humoral y celular, y las respuestas de las proteínas de fase aguda (PFA). Es importante realizar más estudios para establecer de acuerdo a la raza y biotipos utilizados, el aporte de las PFA y la veracidad o no de las observaciones descritas en esta nota.

LITERATURA CITADA

- Aso, P. 1987. Las alteraciones séricas de los bovinos durante la anaplasmosis. Trabajo de Ascenso. USB. Sarteneja. Venezuela.
- Benesi, F., C. Teixeira, M. Leal, J. Lisboa, R. Mirandola, C. Shecaira and V. Gomes. 2012a. Leukograms of healthy Holstein calves within the first month of life. *Pesq. Vet. Bras.* 32(4): 352-356.
- Benesi, F., C. Teixeira, J. Lisboa, M. Leal, E. Birgel, J. Elizabeth Bohland e R. Mirandola. 2012b. Eritrograma de bezerras sadias, da raça Holandesa, no primeiro mês de vida. *Pesq. Vet. Bras.* 32(4):357-360.
- Bittar, J., M. Ribeiro, A Marciano, J. Salcedo y O. Martins. 2004. Perfil fenotípico de linfócitos periféricos de bovinos de raças européias. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56(1): 107-110.
- Blandino, T y M. Alonso. 2004. Resistencia del ternero a *Babesia bovis* y protección frente a un aislamiento heterólogo. *Rev. Salud Anim.* 26(2): 108-111.
- Blood, C y O. Radostits. 1992. *Medicina Veterinaria.* 7 ed. Interamericana-MacGraw-Hill. México
- Brandt, C., C. Leite¹, R. Manhaes, C. Filho, F. Manhaes e C. Barbosa. 2005. Avaliação do efeito da esplenectomia e auto-implante esplênico sobre algumas funções de monócitos em crianças com esquistossomose mansônica *Revista da Sociedade Brasileira Med. Trop.* 38(1): 38-42.
- Cotter, S. 2001. *Hematology.* Teton New Media. USA.
- Dark, M., B. Al-Khedery and A. Barbet. 2011. Multistrain genome analysis identifies candidate vaccine antigens of *Anaplasma marginale*. *Vaccine.* 29: 4923-4932.
- Espinoza, E., N. González y H. López. 2002. Hemoparásitos en becerros esplenectomizados bajo condiciones de pastoreo. *Veterinaria Trop.* 27(2): 99-110.
- Facury, P., A. Carvalho, E. Facury, C. Valgas and M. Barbosa. 2012. Evaluating the effectiveness of an inactivated vaccine from *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21(2): 112-117.
- Giardina, S., P. Aso and A. Bretaña. 1993. Antigen recognition on *Anaplasma marginale* and bovine erythrocytes: an electron microscopy study. *Veterinary immunology and immunopathology.* 38: 183-191.
- Góes, G. 2007. Aspectos clínicos e epidemiológicos das infecciones por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* em bezerros da raça Nelore no Estado de Sao Paulo. Tesis de Doctorado en Medicina Veterinaria. UNESP. FMVZ. Botucatu. Brasil.
- Harvey, J. 2001. *Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals.* Saunder. China.
- Jain, N. 1986. *Schalm's Veterinary hematology.* 4 ed. Lea and Febiger. USA.
- Kaneko, J. 1989. Appendixes. En Kaneko, J (Ed). *Clinical biochemistry of domestic animals.* Academic Press. San Diego. USA. pp. 877-901.
- Murta, C. 2005. Estudo experimental da resposta inmune celular de bovinos vacinados com o peptideo sintético SBbo23290 no controle da babesiose por *Babesia bovis* (Babes, 1988). Tesis de Maestría en Medicina Veterinaria. UFV. PPGMV. Minas Gerais. Brasil.
- Ochoa, J., M. Di Silvio, A. Lichtiger, L. Padilla y T. Billiar. 2003. Efectos de las citocinas esplénicas sobre la función hepatocelular:

- La esplenectomía disminuye la producción hepática de óxido nítrico. 8(3): 47-51.
- Petrie, A and P. Watson. 2006. *Statistic for veterinary and animal science*. 2ed. Blacwell Publishing. UK.
- Reinbold, J., J. Coetzee, L. Hollis, J. Nickel, C. Riegel, J. Christopher and R. Ganta 2010. Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. *Am. J. Vet. Res.* 71(10): 1178-1188.
- Rengifo, S., R. Silva, R. Botteon e P. Botteon. 2010. Hemograma e bioquímica sérica auxiliar em bezerros mestiços neonatos e ocorrência de enfermidades. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, .62 (4): 993-997.
- Rojas, E., J. Mosqueda, J. Álvarez, R. Hernández, J. Ramos, C. Rojas, C. Vega y J. Figueroa. 2011. Transmisión de cepas atenuadas de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* por garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 2(3): 267-281.
- Sandoval, E. 1994. Variaciones fisiopatológicas de la anemia en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Tesis de Maestría en Patología Veterinaria. UCV. FCV. Maracay. Venezuela.
- Shkap, V., A. de Vos, E. Zwegarth and F. Jongejan. 2007. Attenuated vaccines for tropical theileriosis, babesiosis and heartwater: the continuing necessity. *Trends in Parasitol.* 23(9): 420-426.
- Tavares, L. 2007. Anaplasmosse bovina: parâmetros clínicos e patologia clínica em bezerros infectados experimentalmente. Tesis de Maestría Medicina Veterinaria. UFMG. Escola de Veterinaria- Belo Horizonte. Brasil.