

ESTUDIO DE MACROFAGOS ALVEOLARES EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) - STUDY OF ALVEOLAR MACROPHAGES IN ALPACAS (*Vicugna pacos*)

Vásquez Cachay, María: FMV-UNMSM, Perú, evasquezc@unmsm.edu.pe; Ayón Sarmiento, Milder: FMV-UNMSM, Perú. evasquez@gmail.com

RESUMEN

Las alpacas representan una de las principales actividades económicas en los Andes peruanos y la presentación de problemas respiratorios en los primeros meses de vida es una limitante en su crianza. Los macrófagos alveolares (MA) juegan un rol importante en la regulación de la actividad inmune a nivel pulmonar, con la producción de factores bioactivos que son los responsables de actuar ante el ingreso de diferentes agentes que pueden alterar la homeostasis pulmonar. El presente estudio tuvo por objetivo de evaluar mediante lavado broncoalveolar los tipos leucocitarios presentes y el número de MA en el pulmón de la alpaca. Para tal efecto se utilizaron 9 alpacas adultas (3 hembras y 6 machos), clínicamente sanas, a las cuales se les realizó lavado broncoalveolar y en el cual se realizó la cuenta de número de MA y cuenta leucocitaria diferencial. Los resultados nos muestra que el número en un μ l es: Leucocitos 67,49; MA 48,14; polimorfonucleares (PMN) 16,70; Linfocitos 1,87; Basófilos 0,28 y eosinófilos 0,50. Mientras que la cuenta diferencial (%) fue: MA 74,28, PMN 21,98; linfocitos 2,67; basófilos 0,39 y eosinófilos 0,69. Por lo cual podemos concluir que en el lavado broncoalveolar los MA son el tipo leucocitario que tiene mayor número, lo cual nos indica que está jugando un rol muy importante en la regulación inmune del pulmón de la alpaca al igual que en otras especies animales.

Palabras claves: macrófago alveolar, alpaca, lavado broncoalveolar.

ABSTRACT

Breeding of alpacas are an important economic activity in Peruvian Andes and the lung problems in the first months of life limit their breeding. Alveolar macrophages (AM) play a important role in the regulation of local immune activity in the lung, through the bioactive production factors which are responsible of act when different agents enter whose could alter lung homeostasis. This study had the aim determinate the number of AM and the leukocytary count in alpaca's lung. We have used 9 male, healthy alpacas (3 female and 6 male). From bronchoalveolar lavage of each animal, the total of AM, total leukocytes and differential count were determinate. The results show us the number per μ l is: leucocytes 67.49; AM 48.14; polymorphonuclear (PMN) 16.70; Lymphocytes 1.87; Basophiles 0.28 y eosinophiles 0,50. And the differential count (%) was: AM 74.28, PMN 21.98; lymphocytes 2.67; basophiles 0.39 and eosinophiles 0.69. These results suggest that in bronchoalveolar lavage the AM are the most important leucocyte type, showing us that the AM play an

important role in the regulation of immunity in the lung of alpacas as in other animal species.

Key words: **Key words:** alveolar macrophage, alpaca, bronchoalveolar lavage.

INTRODUCCIÓN

Los macrófagos alveolares (MA) son las células presentadoras de antígenos más abundantes en las vías aéreas y espacios alveolares, donde juegan un rol importante en la regulación del sistema inmune y en cuadros de inflamación (Perez-Arellano *et al.*, 1990; Lohmann-Mattes *et al.*, 1994; Gordon y Read, 2002; Peters-Golden, 2004; Lambrecht, 2006). Sus funciones son fagocitosis, secreción de citoquinas y enzimas y control de microorganismos que ingresan al tracto respiratorio; son la primera línea de defensa pulmonar y de contacto para muchos antígenos inhalados, incluyendo agentes infecciosos, alérgenos y pequeñas partículas e inician la respuesta inmune y la perpetúan en el tiempo (Thepen *et al.*, 1989).

Bajo una variedad de condiciones, los MA pueden generar respuesta temprana con la liberación de citoquinas (TNF α , IL-1), componentes del complemento y quimiocinas, que tienen la función de activación autocrina para promover la generación de quimiocinas CXC, como la proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2) y el quimioatrayente de neutrófilos inducido por quimiocinas (CINC) (Czermak *et al.*, 1999)

Los MA tienen particularidades que lo diferencian de otros macrófagos; por ejemplo expresan altos niveles de CD11c, molécula que no es expresada por otros macrófagos y generalmente solo se expresa en células dendríticas (DC), algunas células NK y algunas células T activadas (Paine *et al.*, 2001; Gonzales-Juarrero *et al.*, 2003; Grundy y Sentman, 2005; van Rijt *et al.*, 2005). Bajo activación de citoquinas inflamatorias, los MA liberan óxido nítrico vía iNOS, lo cual constituye un mecanismo de defensa del organismo (Lorsbach *et al.*; 1993); por otro lado la cascada inflamatoria que desencadenan los MA, puede ser inhibida por la proteína surfactante A (SP-A), lo cual constituye un mecanismo de regulación de la respuesta inmune a nivel pulmonar (Miles *et al.*, 1999).

La crianza de alpacas en zonas altoandinas del Perú, tiene como segundo problema de salud en crías, los problemas respiratorios donde las neumonías provocadas por virus y bacterias son una limitante en la producción (Victorio *et al.*, 2003; Cirilo *et al.*, 2012), y al no existir estudios sobre fisiología respiratoria y sobre el rol que juegan los MA en camélidos sudamericanos, se planteó el presente estudio con el objetivo de evaluar mediante lavado broncoalveolar los tipos leucocitarios presentes y el número de MA en el pulmón de la alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Ejecución: El presente trabajo se desarrollo en el Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en la ciudad de Lima, Perú.

Animales: Se utilizaron 9 alpacas (3 hembras y 6 machos) adultas, clínicamente sanos, todos los animales fueron de descarte y sacrificados para consumo humano.

Método Experimental

Lavado Broncoalveolar: Para realizar el lavado broncoalveolar se procedió según las técnicas descritas por Larson y Busch (1985) y Sweeney *et al.* (1992); para lo cual se limpió la tráquea con una gasa, y a unos 7 cm antes de la bifurcación de ésta se hizo un corte por el cual se introdujo un catéter de 0.8 cm de diámetro por 50 cm de largo, el cual está conectado a una jeringa de 50 ml. Se procedió a introducir el catéter en el pulmón izquierdo hasta la parte más distal del bronquio primario, para luego depositar 40 ml de cloruro de sodio al 0.09%. Se dejó reposar por 2 minutos para luego retirar el líquido por succión suave. El líquido recolectado fue depositado en tubos graduados de plástico heparinizados y medidos, para luego ser puestos en un envase térmico con hielo para su posterior evaluación en el laboratorio. La misma técnica se repitió en el pulmón derecho.

Cuenta Leucocitaria: El conteo de leucocitos totales se realizó según la técnica de Benjamin (1991) que consistió en homogenizar las muestras, luego se llenó con la muestra una pipeta dilutora de leucocitos hasta la marca de 0.5 µl y se completó con líquido dilutor de leucocitos hasta 11 µl. La dilución obtenida 1:20 fue colocada en cámara de Neubauer para luego realizar el contaje. El conteo obtenido de cada pulmón fue sometido a un proceso matemático para encontrar la cuenta por µl; la fórmula utilizada fue la siguiente:

$$N^{\circ} \text{ Cel}/\mu\text{l} = \frac{(V_{\text{der}} \times \text{NCC}_{\text{der}}) + (V_{\text{izq}} \times \text{NCC}_{\text{izq}})}{(V_{\text{der}} + V_{\text{izq}})}$$

V_{der} : Volumen recolectado del pulmón derecho

V_{izq} : Volumen recolectado del pulmón izquierdo

NCC_{der} : Número de células contadas del lado derecho

NCC_{izq} : Número de células contadas del lado izquierdo

Frotis y coloración de las muestras: La muestra obtenida de cada pulmón fue centrifugada a 900 revoluciones por minuto durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y del precipitado se recolectó 0.2 ml, con lo cual se hicieron extensiones en láminas portaobjetos. Las láminas fueron secadas para luego ser fijadas por 3 minutos con alcohol 96°, para luego ser coloreadas con la tinción May-Grünwald-Giemsa (Benjamin, 1991).

Lectura de Láminas: Se realizó en un microscopio binocular con luz incorporada Carl Zeiss, modelo Primo Star (Alemania), a un aumento de 100x. Se realizó un barrido de cada lámina y se contaron 200 células leucocitarias haciendo diferenciación de ellas en MA, polimorfonucleares, linfocitos, eosinófilos y basófilos, y obteniendo la cuenta diferencial; y mediante operaciones matemáticas se halló el número real de cada tipo celular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A cada animal se le suministró un total de 80 ml para el lavado broncoalveolar (LBA), de los cuales se recuperó 27.33 ± 7.97 ml, lo cual es un 34.17% del total suministrado (Tabla 1), estos valores son similares a lo encontrado por Vásquez *et al.* (2001) en bovinos.

Tabla 1: Volumen suministrado y Volumen recolectado mediante lavado broncoalveolar en alpacas (*Vicugna pacos*).

n	Volumen		Volumen		%	
	Suministrado	Recuperado				
	(ml)	(ml)	X	DS	X	DS
9	80	27.33	7.97		34.17	9.96

X: promedio, DS: desvío estándar

Considerando a todos los animales en un solo grupo, el número de leucocitos totales por microlitro fue de 78,02, siendo este valor mayor en hembras (91,79 cel/ μ l) y menor en machos (71,13 cel/ μ l), lo cual se refleja en los diferentes tipos leucocitarios, donde el mayor tipo lo representa los MA, seguido de polimorfonucleares y linfocitos (Tabla 2).

Al evaluar la cuenta diferencial en el LBA en alpacas, observamos que los MA es la fracción más importante, seguido de polimorfonucleares, linfocitos, eosinófilos y basófilos, observándose además que MA es mayor en hembras que en machos, mientras que polimorfonucleares, linfocitos, basófilos y eosinófilos es mayor en machos que en hembras (Tabla 3).

Tabla 2: Número de células por microlitro (Nº cel/ μ l) según tipo celular en lavado broncoalveolar de alpacas (*Vicugna pacos*).

	HEMBRAS		MACHOS		TODOS	
	X	DS	X	DS	X	DS
Número de animales	3		6		9	
Leucocitos totales	91,79	28,96	71,13	12,46	78,02	20,33
Macrófagos alveolares	68,96	7,10	51,05	9,87	57,02	12,40
Polimorfonucleares	21,08	20,61	16,72	8,08	18,17	12,32
Linfocitos	1,58	1,56	2,22	2,92	2,01	2,46
Basófilos	0,00	0,00	0,42	0,82	0,28	0,68
Eosinófilos	0,18	0,17	0,72	0,89	0,54	0,76

X: promedio, DS: desvío estándar

Tabla 3: Cuenta diferencial (%) de 200 leucocitos en lavado broncoalveolar de alpacas (*Vicugna pacos*).

	HEMBRAS		MACHOS		TODOS	
	X	DS	X	DS	X	DS
Número de animales	3		6		9	
Macrófagos alveolares	78,33	15,57	72,25	9,55	74,28	11,26
Polimorfonucleares	19,93	14,62	23,00	8,32	21,98	9,95
Linfocitos	1,50	1,32	3,25	4,05	2,67	3,38
Basófilos	0,00	0,00	0,58	1,02	0,39	0,86
Eosinófilos	0,25	0,25	0,92	1,11	0,69	0,95

X: promedio, DS: desvío estándar

Los rangos encontrados de MA en alpacas se encuentran dentro del rango encontrado en bovinos a nivel del mar y altura (Vásquez *et al.*, 2001), aunque son menores que los de altura, lo cual nos está indicando que en estos animales los MA representan la primera defensa a nivel pulmonar al igual que en otras especies de mamíferos (Arend y Mannik, 1973); por otro lado varía en el porcentaje encontrado en hembras, Vásquez *et al.*, 2000 reporta en bovinos hembras un menor número de MA que en machos, lo cual lo relaciona con una menor respuesta pulmonar de estos animales a la hipoxia, variando en este caso en donde las alpacas hembras podrían tener un mayor número de MA que estaría relacionado con una mejor respuesta pulmonar a cuadros infecciosos, no existiendo información al respecto sobre si machos o hembras son más afectados.

Los valores reportados por Weissbecker *et al.* (1969) fue de 40 MA/ μ l, lo cual es menor a lo encontrado en este estudio; Arend y Mannik (1973) reportaron 90 MA/ μ l y mientras que Lay *et al.*, (1986) reportó 85,70 MA/ μ l lo cual es similar a lo encontrado en este estudio. Esto nos estaría demostrando que los MA son la fuente primaria de citoquinas inflamatorias en el pulmón de la alpaca, y su activación dependería de diversos factores al igual que en otras especies de mamíferos (Czermak *et al.*, 1999), así como representan un lugar de absorción de macromoléculas (Lombry *et al.*, 2004), lo cual significa una barrera de defensa del organismo ante el medio y el inicio de cascadas que sirven para la regulación de las funciones que desempeña el pulmón.

CONCLUSIONES

- Mediante lavado broncoalveolar se observó que los macrófagos alveolares es el tipo leucocitario más importante a nivel pulmonar en alpacas, lo cual representa un 74,28%.
- El número de leucocitos totales obtenidos fue mayor en hembras que en machos, sin embargo el porcentaje de MA en ambos sexos fue similar.

LITERATURA CITADA

1. **Arend WP, Mannik M. 1973.** The macrophage receptor for IgG: number and affinity of binding sites. *J Immunol* 110(6): 1455-1463.
2. **Benjamin MM. 1991.** Recuento de células sanguíneas. En: *Manual de Patología Clínica en Veterinaria*. Noriega Editores. México: Editorial Limusa S.A. de C.V. p 61-65.
3. **Cirilo E, Manchego A, Rivera H, Rosadio R. 2012.** Coexistencia de virus y bacterias en neumonías agudas en alpacas neonatas. *Rev Invest Vep Perú* 23(3): 317-335.
4. **Czermak BJ, Sarma V, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA. 1999.** In vitro and in vivo dependency of chemokine generation on C5a and TNF-alpha. *J Immunol* 162(4): 2321-2325.
5. **Gonzalez-Juarrero M, Shim TS, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP, Orme IM. 2003.** Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 171(6): 3128-3135.
6. **Gordon SB, Read RC. 2002.** Macrophage defences against respiratory tract infections. *Br Med Bull* 61: 45-61.
7. **Grundy M, Sentman CL. 2005.** GFP transgenic mice show dynamics of lung macrophages. *Exp Cell Res* 310(2): 409-416.
8. **Lambrecht BN. 2006.** Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 24(4): 366-368.
9. **Larson VL, Busch RH. 1985.** Equine tracheobronchial lavage: comparison of lavage cytologic and pulmonary histopathologic findings. *Am J Vet Res* 46(1):144-146.
10. **Lay JC, Slauson DO, Castleman WL. 1986.** Volume-controlled bronchopulmonary lavage of normal and pneumonic calves. *Vet Pathol* 23(6): 673-680.
11. **Lohmann-Matthes ML, Steinmüller C, Franke-Ullmann G. 1994.** Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 7(9):1678-1689.
12. **Lombry C, Edwards DA, Préat V, Vanbever R. 2004.** Alveolar macrophages are a primary barrier to pulmonary absorption of macromolecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(5): L1002-L1008.
13. **Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW. 1993.** Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 268(3): 1908-1913.
14. **Miles PR, Bowman L, Rao KM, Baatz JE, Huffman L. 1999.** Pulmonary surfactant inhibits LPS-induced nitric oxide production by alveolar macrophages. *Am J Physiol* 276(1 Pt 1): L186-L196.
15. **Paine R 3rd, Morris SB, Jin H, Wilcoxon SE, Phare SM, Moore BB, Coffey MJ, Toews GB. 2001.** Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(5): L1210-L1218.
16. **Pérez-Arellano JL, Alcázar-Montero MC, Jiménez-López A. 1990.** Alveolar macrophage: origin, kinetics and relationship with cells of the alveolo-interstitial region. *Allergol Immunopathol* 18(3): 175-183.
17. **Peters-Golden M. 2004.** The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31(1):3-7.

18. **Sweeney CR, Rossier Y, Ziemer EL, Lindborg S. 1992.** Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. *Am J Vet Res* 53(8): 1376-1379.
19. **Thepen T, Van Rooijen N, Kraal G. 1989.** Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. *J Exp Med* 170(2): 499-509.
20. **van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, Duez C, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. 2005.** In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 201(6):981-991.
21. **Vásquez M, Ayón M, Santillán G, Cueva S. 2000.** Macrófagos alveolares en bovinos Holstein de altura. Reunión Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Libro de resúmenes. Perú.
22. **Vásquez M, Ayón M, Santillán M, Rosadio R, Cueva S. 2001.** Macrófagos alveolares en bovinos sometidos a hipoxia crónica. *Rev Inv Vet Perú* 12(1): 71-78.
23. **Victorio W, Rivera H, Manchego A, Benito A, Quispe, R, Yaya K, Olazábal J, Rosadio R. 2003.** Evidencias serológicas de virus neumotrópicos en alpacas de la provincia de Canchis, Cuzco, Perú. En: *Memorias III Congreso Mundial sobre Camélidos*. Potosí, Bolivia. II: 155-158.
24. **Weissbecker L, Carpenter RD, Luchsinger PC, Osdene TS. 1969.** In vitro alveolar macrophage viability. Effect of gases. *Arch Environ Health* 18(5): 756-759.