Efecto de la radiación ultravioleta sobre la respuesta inmune en neonatos de yacaré overo (*Caiman latirostris*) inyectados con lipopolisacáridos de *Escherichia coli*

Lucía Fernández

Resumen:

La radiación ultravioleta (RUV) desempeña un papel importante en la determinación de las condiciones climáticas, el balance energético, el equilibrio natural del planeta y además, es un factor clave para muchas funciones fisiológicas de los organismos. Es una parte del espectro de emisión de la energía solar que corresponde al 72% del total, comprendido entre las longitudes de onda 200-400 nm, dividiéndose en tres bandas: A, B y C. Se sabe que los organismos vertebrados ectotermos utilizan el asoleamiento como un mecanismo para la termorregulación: Asimismo, la exposición al sol es esencial para su desarrollo y reproducción, siendo uno de los beneficios más importantes la síntesis de vitamina D3. La sobreexposición a radiación ultravioleta en los vertebrados podría provocar efectos perjudiciales, como por ejemplo la inmunosupresión, debilitando así el reconocimiento de los antígenos luego de unos días de ocurrida la irradiación. El Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), menciona que los efectos de la RUV sobre el sistema inmune encierra uno de los interrogantes de mayor preocupación y sugiere que la exposición a la radiación UV-B podría ejercer una influencia negativa sobre este sistema. Los lipopolisacáridos (LPS) constituyen el mayor componente de la pared celular de bacterias Gram-negativas y contienen una sustancia tóxica, el lípido A, que al ser reconocido por el sistema inmune en la mayoría de los organismos eucariotas superiores, puede desencadenar respuestas inflamatorias. El objetivo de nuestro estudio es determinar la influencia de diferentes intensidades de RUV sobre la respuesta inmune de *C. latirostris* inyectados con LPS bacterianos.

Fundamentación:

La irradiación del espectro UV en la superficie de la tierra es modificada por factores temporales, geográficos y meteorológicos. Los fotobiólogos ambientales normalmente definen las regiones de UV como: UV-C (200-280 nm), UVB (280-315 nm) y UVA (315-400 nm) (Frederick et al., 1989). Uno de los problemas más preocupantes en la actualidad a nivel mundial es el incremento de la radiación ultravioleta (RUV) sobre la superficie terrestre. La destrucción de la capa de ozono por gases de origen antropogénico está provocando un aumento de la radiación UV-B incidente sobre la tierra; sin embargo, la radiación UV-A no se ve modificada (López Figueroa, 2004). Las propiedades immunosupresivas que se le adjudican a la elevada exposición a la RUV son de importancia relevante (Schwarz, 2005) debido a que la radiación interfiere en diversas etapas del proceso inmune, originando una fotoinmunosupresión (Cabrera Silva et al., 2005). Ilyas (1986) y posteriormente Jeevan y Kripke (1993) afirmaron que el daño al sistema inmune inducido por este tipo de radiación podría tener efectos de gran alcance para la salud de las poblaciones, aumentando la susceptibilidad a las infecciones (Cabrera Silva et al., 2005).

Los Cocodrilianos son fuentes importantes de información para la investigación en inmunología desde un punto de vista filogenético (Cooper, 2002). Trabajos previos indican que la actividad antibacteriana de *C. latirostris* en presencia de *E. coli* es considerablemente mayor que en humanos y aves (Siroski et al., 2009). Merchant et al (2006) demostraron que *Alligator mississippiensis* responde rápidamente a la toxicidad de LPS de la misma bacteria mediante el incremento de

leucocitos. Esto sugiere que dichos reptiles tendrían un sistema inmunológico potente y eficiente. Asimismo, existen algunas condiciones que alteran el funcionamiento normal del sistema inmune como por ejemplo las situaciones estresantes (Shotts *et al*., 1972; Brisbin, 1982; Franklin *et al.*, 2003). Del mismo modo podríamos suponer que las exposiciones excesivas a RUV o a intensidades diferentes a las naturales podrían causar un efecto similar. Por tal motivo, se diseñó este estudio para aportar información sobre el efecto de la exposición a UVR a diferentes intensidades.

Se espera que la sobreexposición a RUV induzca un fenómeno de inmunosupresión en los animales generando una respuesta inmune disminuida al efecto de los LPS de *E. coli.*

Objetivo:

Evaluar los efectos de la exposición a diferentes intensidades de radiación ultravioleta sobre la respuesta inmune en ejemplares de *C. latirostris* inyectados con lipopolisacáridos bacterianos.

Materiales y Métodos:

Se utilizaron 27 ejemplares de yacaré overo de 3 meses de edad provenientes del Programa de *ranching* en Santa Fe, Argentina, denominado Proyecto Yacaré. Se utilizaron 9 animales por nido, de 3 nidos diferentes, lo cuales fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos de 9 ejemplares (3 de cada nido por grupo). Todos los animales fueron identificados individualmente con *tags* numeradas (Natl. Band and Tag CO., Newport, Kentucky). Se evaluó el peso (M) con una balanza BOECO® (precisión 0,1 g), longitud total (LT) y longitud hocico-cloaca (LHC) con una cinta métrica (precisión 0,5 cm), al inicio y al final de la experiencia (Figura 1).



Figura 1: Toma de medidas morfométricas de crías de *Caiman latirostris*.

Los animales se ubicaron en cajones plásticos inclinados en con una parte seca y una parte con agua, dentro de un ambiente calefaccionado a 31 ºC ± 1 ºC. Las temperaturas fueron registradas con almacenadores de datos (HOBO Data Logger, ONSET COMPUTER CORPORATION, POCASSET, MA, USA).

Los pichones fueron alimentados *ad libitum* tres veces por semana con una mezcla de cabeza de pollo molida (60 %) y alimento balanceado seco diseñado para reptiles (40 %). La limpieza de las bateas se intercaló con los días de alimentación.
Los tratamientos consistieron en:

- 12 horas de exposición a intensidad de 1 lámpara (RUV)
- 12 horas de exposición a intensidad de 2 lámparas(RUV)
- Exposición a ciclo luz-oscuridad de un fotoperíodo normal (FN)

Las crías estuvieron bajo este régimen de fotoperíodo durante 95 días (Figura 2). Para las diferentes intensidades se utilizó, una lámpara diseñada para reptiles de 18 watt (UVA 30% y UVB 5%; Silvania Reptistar®). Una vez finalizada la exposición a RUV, algunos animales fueron inyectados con LPS de *E. coli* K-235 (Sigma) a una dosis de 1mg/Kg. (Merchant et al, 2006), mientras que a otros se los inyectó con suero fisiológico (SF).



Figura 2. Diferentes tratamientos a los que estuvieron expuestas las crías de *C. latirostris.*

Pasadas las 72 horas de ser inyectados los animales, se realizó una extracción de sangre del seno de la vena espinal (Zippel et al. 2003) con agujas de 25 G x 5/8" y jeringas de 5 ml (Figura 3). La misma fue colocada en eppendorfs heparinizados y el plasma fue separado por centrifugación, la cual se realizó a temperatura ambiente. Este último, se mantuvo refrigerado a – 20°C para las determinaciones propuestas.

Se evaluó el efecto provocado por la radiación ultravioleta sobre el sistema inmune, mediante el recuento total y diferencial de glóbulos blancos (GB) en sangre, y la actividad del sistema complemento.



Figura 3. Extracción de sangre de los animales expuestos a Radiación Ultravioleta

Para el recuento total de leucocitos se utilizó la cámara de Neubauer. Se tomó una alícuota de sangre y se diluyó con NaCl 0,6% (Lewis *et al.,* 2008), en una relación 1:200. Las muestras se observaron en microscopio óptico con aumento total de 450x. Una vez realizado el recuento, los resultados se expresaron en número de células por milímetro cúbico de sangre.

Para el recuento diferencial de GB se realizaron 2 frotis por animal sobre portaobjetos limpios, se tiñeron con solución de May Grunwald (50%)- Giemsa (10%). Las muestras se observaron en microscopio óptico con aumento de 1000x (Figura 4). Se registró la cantidad de cada uno de los subtipos de glóbulos blancos (heterófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos) cada 100 GB analizados por frotis, para ambas replicas (Figura 5).



Figura 4. Observación al microscopio de las muestras sanguíneas de *Caiman latirostris*.

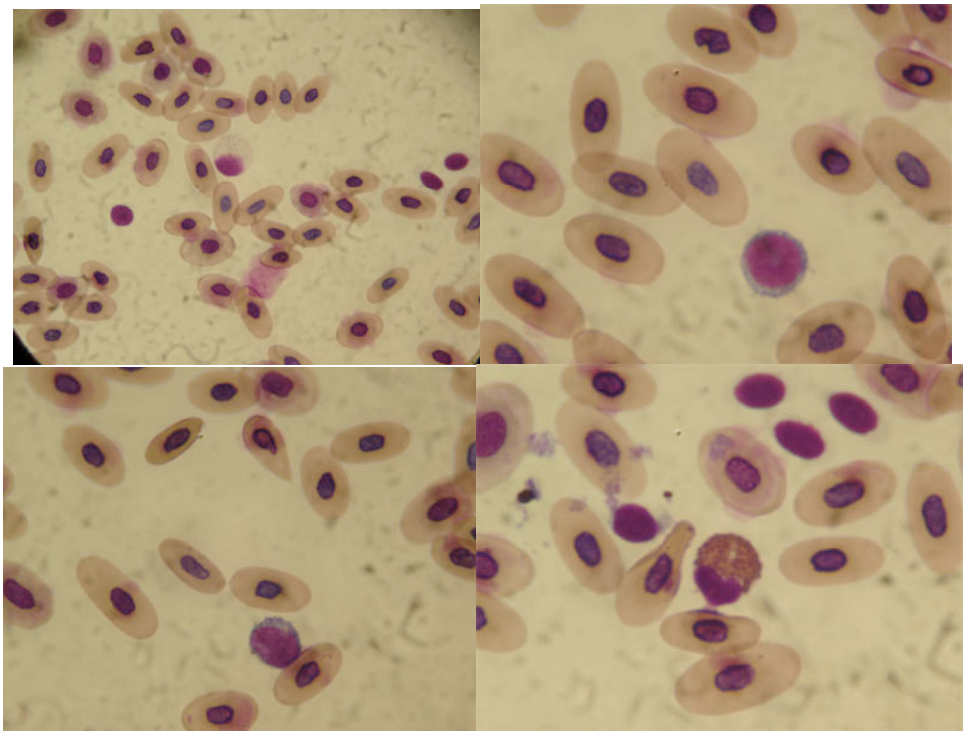


Figura 5. Subtipos de glóbulos blancos de *Caiman latirostris*. Heterófilo y linfocitos (izquierda arriba), Monocito (derecha arriba, izquierda abajo); Eosinófilo (derecha abajo).

Resultados:

- **Recuento total:**

No se observó diferencia significativa entre los distintos tratamientos de exposición RUV y FN, para el recuento total de GB ($p>0,05$). En cambio, se detectó un incremento significativo en el recuento total de GB en los animales inyectados con LPS en todos los tratamientos ($p=0,002$), por lo que no hubo influencia de la exposición previa a RUV o FN en la respuesta posterior a la inyección con LPS ($p>0,05$) (Figura 5). Estos resultados demuestran que se desencadenó una respuesta inmune frente al estímulo de un agente extraño. En este caso los tratamientos de exposición a RUV no habrían inducido ningún fenómeno de inmunosupresión en los animales inyectados con los LPS de *E. coli.*

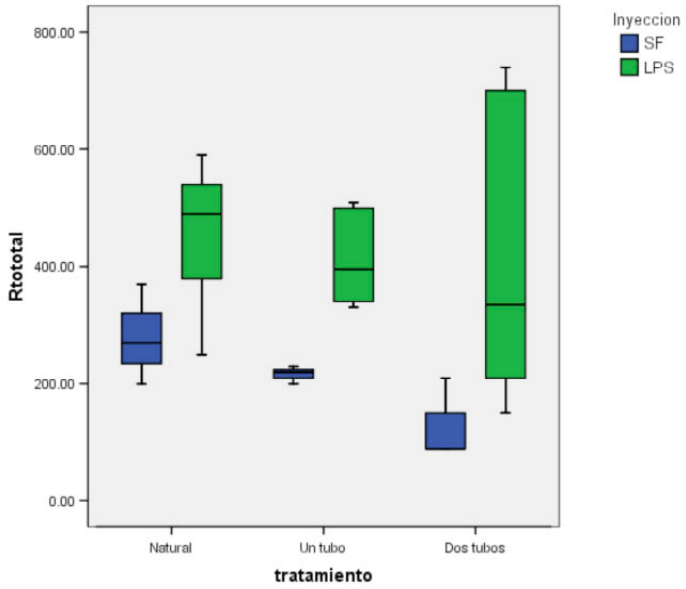


Figura 5. Recuento total de glóbulos blancos de los diferentes tratamientos.

- **<u>Linfocitos:</u>**

Los animales inyectados con LPS presentaron menor cantidad de linfocitos en comparación con los animales inyectados con SF (p= 0,001). Aquellos expuestos a RUV, presentaron mayor cantidad en el recuento de linfocitos en comparación con los animales del grupo FN (p < 0,01) (Figura 6).

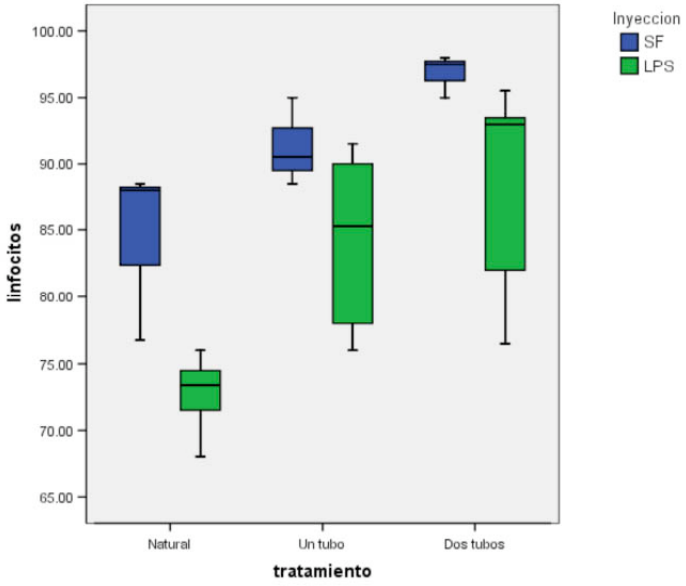


Figura 6. Recuento de Linfocitos en animales inyectados con SF y animales inyectados con LPS.

- **Heterófilos:**

La inyección con LPS produjo un incremento significativo en la cantidad de heterófilos en comparación con aquellos inyectados con SF solo en el grupo expuesto a FN (p=0,01). Esto podría indicar que en los grupos expuestos a RUV existe una supresión de la respuesta inmune. La exposición a radiación UV en ambos grupos indujo una disminución significativa en la cantidad de heterófilos respecto del recuento observado en los animales expuestos a FN (p < 0,01) (Figura 7).

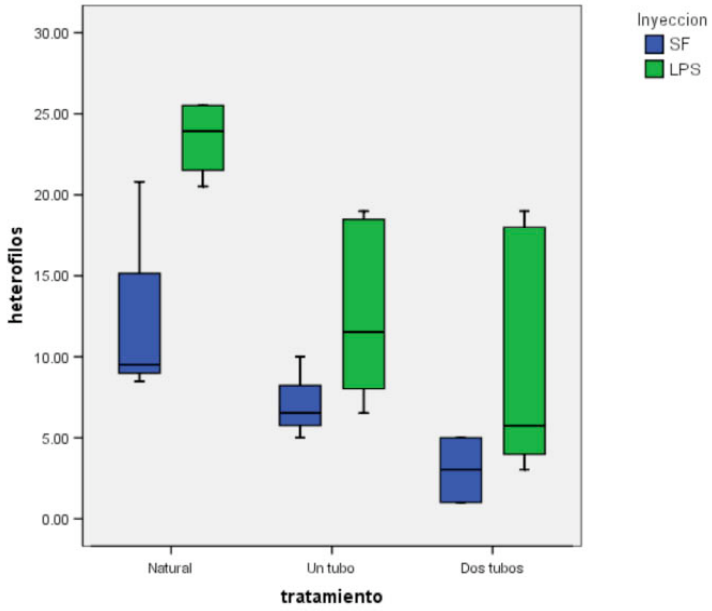


Figura 7. Recuento de Heterófilos en animales inyectados con SF y animales inyectados con LPS

No se observó efecto de la exposición a RUV o la inyección con LPS en las demás categorías de GB.

- **Crecimiento:**

No se observó diferencia significativa en el peso, la LT ni el SVL entre los grupos expuestos a RUV y FN (p>0,05).

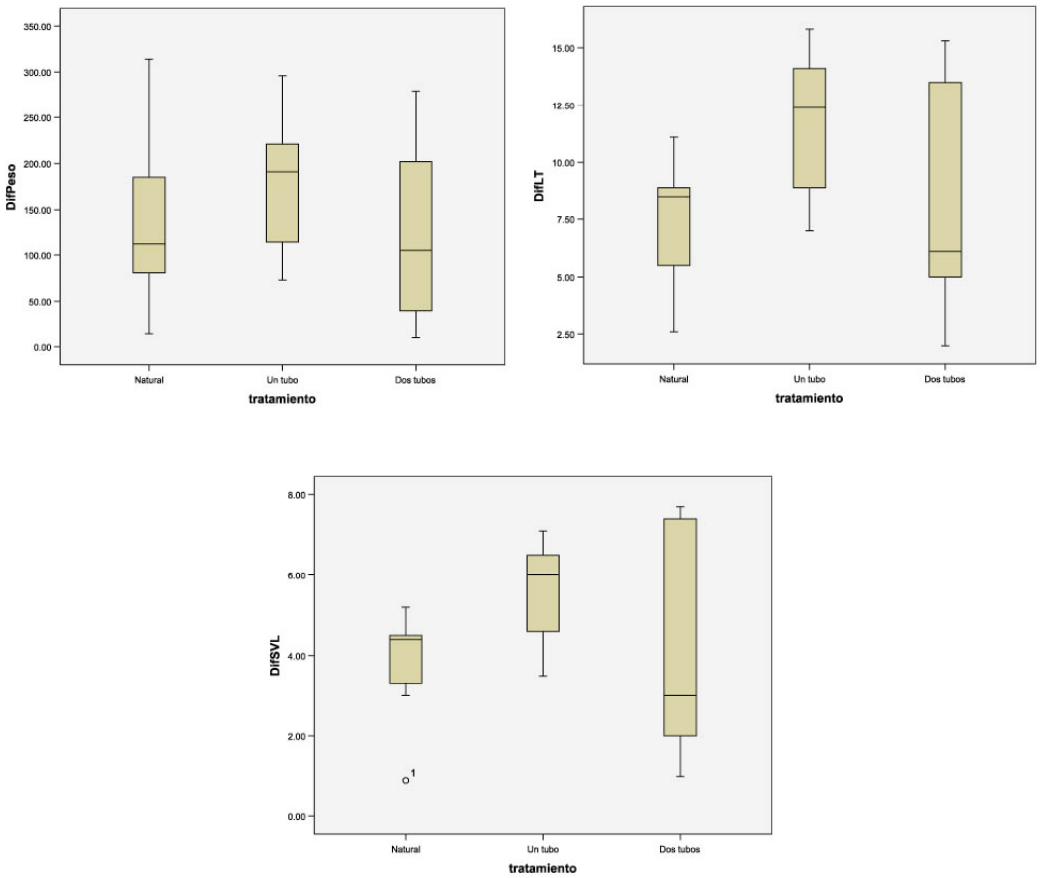


Figura 8 Variables de crecimiento en animales expuestos a diferentes tratamientos de RUV.

- **<u>Determinación del Sistema Complemento:</u>**

El porcentaje de hemólisis es significativamente menor en los tratamientos de RUV que en el tratamiento FN ($p< 0,01$), pero no existe diferencia significativa entre los dos grupos expuestos a RUV ($p> 0,05$). No se observó diferencia significativa entre los animales inyectados con LPS y los inyectados con SF ($p>0,05$).

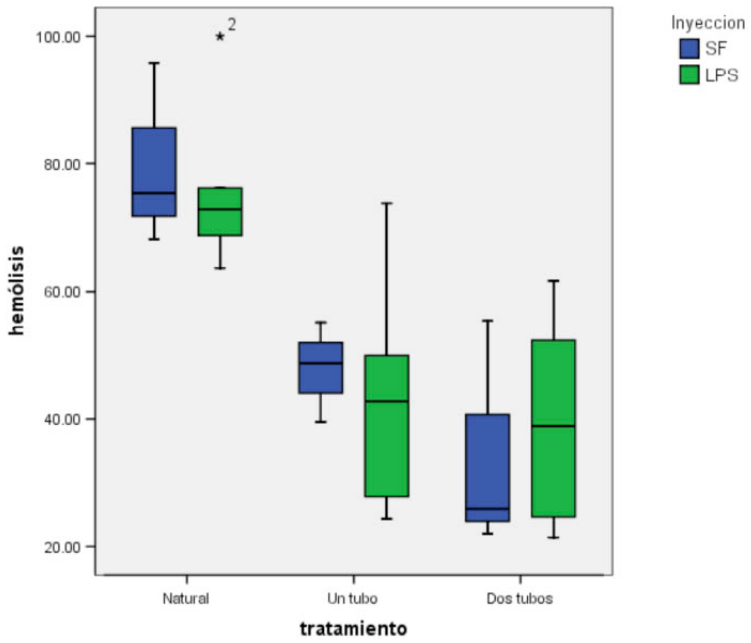
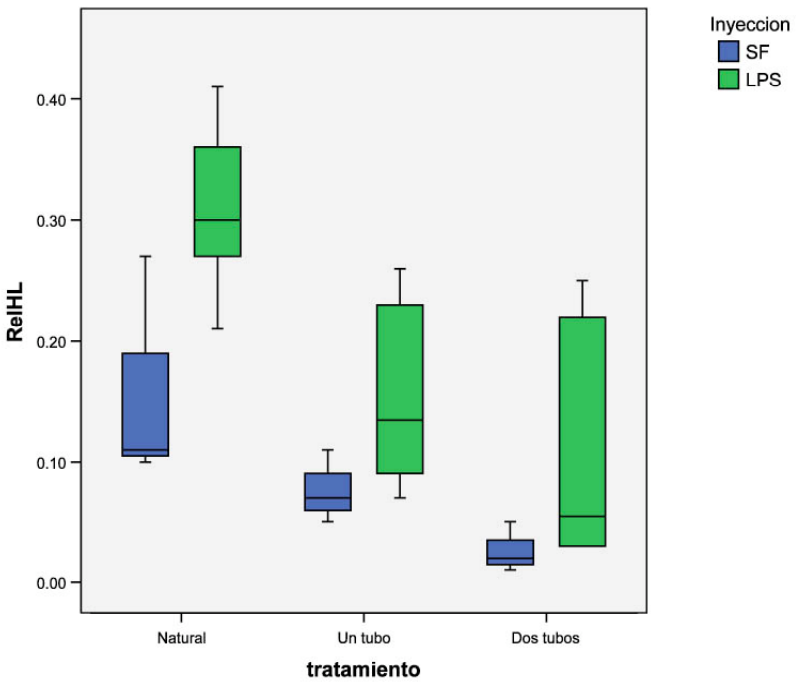


Figura 9. Porcentaje de hemólisis en animales inyectados con SF y animales inyectados con LPS

- **<u>Índice H/L:</u>**

El índice H/L mostró una disminución significativa en los dos tratamientos expuestos a RUV con respecto al tratamiento FN, pero no se percibió diferencia entre los dos grupos expuestos a RUV ($p < 0,01$). Respecto al tipo de inyección, existe un incremento de la relación en los inyectados con LPS respecto a los inyectados con SF ($p < 0,01$).



Conclusión:

- A partir de la inyección de los LPS, se pudo detectar una respuesta inmune observada en la variación en el recuento total de GB.
- Los tratamientos de exposición a RUV ejercieron ningún fenómeno efecto sobre los animales inyectados con los LPS de *E. coli y* con SF.
- Los animales inyectados con LPS presentaron menor cantidad de linfocitos que aquellos inyectados con SF. Los expuestos a RUV, presentaron mayor cantidad en el recuento de la población linfocitaria en comparación con los animales del grupo FN.
- Algunas poblaciones de glóbulos blancos, particularmente los Heterofilos, no aumentaron ante el desafio de la inyección de LPS.
- La RUV podría estar generando una situación de estrés.

Bibliografía

- Brisbin, I.L Jr., 1982. Applied ecological studies of the American alligator at the Savannah River Ecology Laboratory: an overview of program goals and design in crocodiles. *In* Crocodiles. Proceeding of the 5th Meeting of the Crocodile Specialist Group. Gland, Switzerland: IUCN, pp. 376-388.
- Cooper, E.L., 2002 Comparative immunology. Curr. Pharm. Des. 8: 99-110.
- Franklin, C.E., Davis, B.M., Peucker, S.K.J., Stephenson, H., Mayer, R., Whittier, J., Lever, J., Grigg, G.C., 2003. Comparison of stress induced by manual restraint and immobilization in the estuarine crocodile, *Crocodylus porosus*. J. Exp. Zool. Part A: Compar. Exp. Biol. 298: 86-92.
- Frederick, J.E., Snell, H.E., Haywood, E.K., 1989. Solar ultraviolet radiation at the earth's surface. Photochem. Photobiol. 50, 443-50.

- Honeyman Mauro, J., 2005. Inmunidad y Radiación Ultravioleta. En: Radiacion Ultravioleta y Salud. Cabrera Silva, S., Lissi Gervaso, E., Honeyman Mauro, J. (eds.) Universia S.A, pp 185-205.
- Ilyas, M., 1986. Ozone modification: Importance for developing countries in the tropical/equatorial region, Titus, J.G. (ed.), in: Stratospheric ozone (Vol. 2), Effects of changes in stratospheric ozone and global climate, Proceedings of the United Nations Environment Programme (UNEP)/Environmental Protection Agency (EPA) International Conference on Health and Environmental Effects of Ozone Modification and Climate Change. Washington, D.C., U.S. Environmental Protection Agency. pp. 185-191.
- Jeevan, A., Kripke, M.L., 1993. Effect of ultraviolet radiation on immune system in mice and humans. Lancet 342, 1159-1160.
- Lewis, S.M., Bates, I., Bain, B.J. 2008. Dacie and Lewis. Hematología práctica. 10º edición. Editorial Elservier. España. Pp. 41.
- López Figueroa, F., 2004. Tecnociencia y Cultura a comienzos del SXXI. En: Análisis Transdiciplinar sobre la Destrucción de la Capa de Ozono e Incremento de Radiación Ultravioleta y sus Efectos sobre el Medio ambiente y salud Humana. José María Atencia y Antonio Diéguez (Coordinadores). Thema. Servicios de Publicaciones de la Universidad de Málaga, pp. 253-283.
- Merchant, M., Mills, K., Williams, S., Kleckley, F., Sims, A., Elsey R. M., Bushnell, J., 2006. Effects of bacterial lipopolysachharide on peripheral leukocytes in the American alligator (Alligator mississippiensis) Veterinary Immunology and Immunopathology. 111:315–320.
- Schwarz, T., 2005. Ultraviolet radiation-immune response. J. Dtsch. Dermatol Ges. 3, 11-8.
- Shotts, E.B. Jr., Gaines, J.L., Martín L., Prestwood, A.K., 1972. *Aeromonas*-induced deaths among fish and reptiles in a eutrophic inland lake. J. Am. Vet. Med. Assoc. 161:603-607.
- Siroski, P.A., Piña, C.I., Larriera, A., Merchant, M., Di Conza, J., 2009. Plasma Activity of the Broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*). Zoological Studies. 48(2): 238-242.
- Zippel, K.C., Lillywhite, H.B., Mladnich, C.R., 2003. Anatomy of the crocodilian spinal vein. J. Morphol. 258, 327-335.