

CONTEOS LEUCOCITARIOS EN EL PLAYERO ROJIZO (*CALIDRIS CANUTUS RUFÁ*) EN PATAGONIA, ARGENTINA

VERÓNICA L. D'AMICO

Centro Nacional Patagónico, CONICET. Boulevard Brown 2915,
U9120ACF Puerto Madryn, Chubut, Argentina. damico@cenpat.edu.ar

RESUMEN.— El principal componente del sistema inmunitario de los vertebrados está mediado por los leucocitos. En aves existen cinco tipos: heterófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. El objetivo de este trabajo es presentar los conteos leucocitarios obtenidos a partir del análisis de frotis sanguíneos para un ave migratoria de larga distancia, el Playero Rojizo (*Calidris canutus rufá*) en el sitio de invernada Río Grande, Tierra del Fuego, y durante la escala trófica en Bahía San Antonio, Río Negro, Argentina. Como se observa en general para las aves, los heterófilos y los linfocitos predominaron en ambos sitios, mientras que el resto de los leucocitos se observaron en menor proporción.

PALABRAS CLAVE: *conteo leucocitario, Playero Rojizo, sitio de invernada, sitio de parada.*

ABSTRACT. LEUKOCYTE PROFILE IN THE RED KNOT (*CALIDRIS CANUTUS RUFÁ*) IN PATAGONIA, ARGENTINA.— The immune response in vertebrates is primarily mediated by leukocytes. Types of leukocytes in birds are basophils, heterophils, eosinophils, lymphocytes and monocytes. The leukocyte profile obtained from blood smear analyses is reported for a long distance migrant, the Red Knot (*Calidris canutus rufá*) during its wintering at Río Grande, Tierra del Fuego, and its stopover site at San Antonio Bay, Río Negro, Argentina. Heterophils and lymphocytes were the most abundant leukocytes in both sites, while the other leukocytes showed lower proportions.

KEY WORDS: *leukocyte profile, Red Knot, stopover site, wintering site.*

Recibido 2 septiembre 2010, aceptado 4 mayo 2011

El sistema inmunitario protege al organismo mediante barreras de defensa sucesivas, cada una más potente que la anterior (Roitt et al. 2000). Ante la invasión de un agente extraño, los vertebrados producen dos respuestas inmunitarias mediadas por leucocitos: la respuesta innata no específica, en la cual intervienen las células fagocíticas (granulocitos y monocitos), y la respuesta adquirida, específica para un determinado agente patógeno, en la que actúan los linfocitos (Roitt et al. 2000). La función principal de los granulocitos es reconocer, fagocitar y degradar los agentes extraños. En aves existen tres tipos: los heterófilos, cuyo incremento puede indicar la presencia de enfermedades bacterianas o inflamaciones leves (Hawkey y Dennett 1989), los eosinófilos y los basófilos, que se encuentran en bajo número y se incrementan asociados a enfermedades crónicas, parasitarias, reacciones alérgicas y daños en los tejidos (Campbell 1994). Los linfocitos, junto con los heterófilos, son las células más numerosas en

las aves y su incremento puede indicar enfermedades parasitarias y crónicas, mientras que una disminución en su número puede indicar enfermedades virales (Hawkey y Dennett 1989, Eeva et al. 2005). Finalmente, los monocitos, las células de mayor tamaño, ocurren en bajo número y su incremento indica enfermedades crónicas o fúngicas (Campbell 1994). Las fórmulas leucocitarias (i.e., la cantidad de cada tipo de leucocito) proveen información del estado de salud en las aves (Campbell y Dein 1984, Davis et al. 2004, 2008). El aumento o la disminución de un determinado tipo de leucocito, además de reflejar enfermedades, también responden al grado de estrés a que está sometido un animal, incluyendo estrés por malnutrición y pérdida de peso significativa o un ejercicio físico extremo (Gershwin et al. 1985, Maxwell y Robertson 1998). Generalmente, los eventos que producen estrés incrementan los valores de heterófilos y disminuyen los valores de linfocitos, razón por la cual la proporción heterófilos/linfocitos es

aceptada como una medida de respuesta fisiológica al estrés (Davis et al. 2008).

En aves migratorias las diferencias en los conteos leucocitarios se pueden generar como consecuencia de los vuelos migratorios intensos y los intercambios energéticos que ellos conllevan (Piersma y Baker 2000). Estos intercambios determinan y optimizan las estrategias que modulan la historia de vida de las aves (Norris y Evans 2000). Además del costo energético que representan los vuelos, las aves migratorias deben afrontar desafíos relacionados con la variación en la calidad y disponibilidad de alimento (Moore et al. 1995), la competencia por los recursos (Moore y Yong 1991), el riesgo de predación, las condiciones climáticas desfavorables y la exposición a parásitos (Piersma y Baker 2000). Estos factores tienen efectos en la función inmunitaria (Buehler y Piersma 2007). En este sentido, la función inmunitaria podría suspenderse si los animales están comprometidos energéticamente con otras actividades (Raberg et al. 1998, Norris y Evans 2000). Por ello, conocer las fórmulas leucocitarias constituye una herramienta para la evaluación de la condición de salud de las aves aconsejable de ser incluida en los estudios ecológicos.

El Playero Rojizo (*Calidris canutus rufa*, Scolopacidae) es un ave playera migratoria de larga distancia que se reproduce en altas latitudes de la tundra ártica en Canadá y migra hacia América del Sur durante la temporada no reproductiva (Hayman et al. 1986). En los últimos años su población ha sufrido una drástica disminución: de 51 000 individuos estimados en Tierra del Fuego en 2000 a 14800 en 2008 (Niles et al. 2008). Consecuentemente, el Playero Rojizo ha sido incluido en el Apéndice I de la Convención de Especies Migratorias (Convención de Bonn): por el Consejo Científico en marzo de 2004 y por la Conferencia de las Partes en noviembre de 2005. En 2007 fue considerada por el COSEWIC (Committee on the Status of Endangered Wildlife of Canada) como especie amenazada y en 2008 se la consideró en esa misma categoría en Argentina (López-Lanús et al. 2008). Por esta razón, los estudios de la condición de salud en esta especie resultan de especial interés.

El objetivo de este trabajo es reportar conteos leucocitarios registrados para individuos de Playero Rojizo durante la temporada migratoria 2006-2007 en su estadía en la Patagonia

argentina, diferenciando entre un sitio de invernada y uno de parada trófica en migración hacia el norte. A su vez, este reporte complementa los valores obtenidos en la temporada previa en los mismos sitios (D'Amico et al. 2010).

MÉTODOS

Las muestras se obtuvieron en una misma temporada migratoria (2006-2007) en Río Grande, Tierra del Fuego (53°48'S, 67°43'O), el sitio de invernada más austral, y durante la escala trófica en Bahía San Antonio, Río Negro (40°43'S, 64°56'O). El Playero Rojizo arriba a Río Grande a principios de noviembre y la captura de individuos se realizó el 12 de noviembre de 2006. En San Antonio se encuentran aves entre fines de febrero y principios de mayo; la captura en este sitio se realizó el 28 de marzo de 2007.

Todas las aves muestreadas eran adultas (tres o más años) y ninguna de ellas mostraba signos de enfermedad al momento de ser capturadas. Se consideraron clínicamente sanas aquellas aves que presentaban buena condición física y de plumaje, peso adecuado para la especie en condiciones de migración, ausencia de trauma, serología negativa a las enfermedades influenza aviar, enfermedad de Newcastle, malaria aviar y encefalitis de San Luis (D'Amico et al. 2007), y valores hematológicos normales (D'Amico et al. 2010).

Se tomaron muestras de sangre de la vena braquial y se prepararon frotis sanguíneos sobre portaobjetos, se fijaron con alcohol absoluto y se tiñeron con Giemsa (Campbell 1994). Cada frotis fue observado bajo microscopio 1000×. El número total de leucocitos fue calculado contando todos los leucocitos en 50 campos de visualización (Hale y Briskie 2007, A Varisco, com. pers.). Se determinó la cantidad de cada tipo celular por cada 100 leucocitos (Campbell 1994, Hale y Briskie 2007), obteniéndose también la relación heterófilos/linfocitos (Maxwell y Robertson 1998). Los frotis fueron preparados, teñidos y analizados por la misma persona.

RESULTADOS

Los conteos totales de leucocitos no mostraron diferencias significativas entre sitios (Prueba de Mann-Whitney; $U = 159, P > 0.05$;

Tabla 1). Los heterófilos y los linfocitos fueron los leucocitos más abundantes en los individuos analizados en ambos sitios, mientras que los basófilos, los eosinófilos y los monocitos se observaron en menor proporción. En Río Grande el tipo leucocitario más abundante correspondió a los heterófilos, mientras que en Bahía San Antonio, por el contrario, predominaron los linfocitos. Consecuentemente, la relación heterófilos/linfocitos mostró valores significativamente mayores en Río Grande ($U = 28.5, P < 0.05$). Los otros tipos celulares no mostraron diferencias significativas entre sitios ($P > 0.05$).

DISCUSIÓN

En Patagonia, el Playero Rojizo mostró los patrones leucocitarios esperados normalmente para las aves (Campbell 1994), siendo los heterófilos y los linfocitos los leucocitos más abundantes. Por lo general, los conteos de basófilos, eosinófilos y monocitos suelen ser bajos, a no ser que las aves estén atravesando un proceso infeccioso específico (Grasman 2002, Nun et al. 2003). En este caso, no se pudo observar que las aves examinadas estuvieran pasando por un proceso patológico con manifestación en el conteo leucocitario.

Si bien la abundancia de leucocitos totales fue similar en ambos sitios, en Río Grande la contribución de los heterófilos respecto de la de los linfocitos fue mayor. Luego de la larga migración y de alcanzar las costas de Río Grande, es probable que las aves se encuentren energéticamente estresadas y su inmunología comprometida. En este sentido, Buehler et al. (2010) encontraron que los conteos de linfocitos en el Playero Rojizo eran más bajos al arribar a un sitio de reabastecimiento luego de su migración de larga distancia y aumentaban significativamente en la etapa posterior de almacenamiento de reservas e incremento de masa corporal. Buehler et al. (2010) concluyeron que las aves que se están recuperando podrían estar inmunológicamente comprometidas debido al esfuerzo físico durante el vuelo migratorio o bien como resultado del compromiso adaptativo entre la función inmune y la migración. Aunque es probable que esto mismo suceda en Río Grande y en San Antonio Oeste, en ambos sitios se realiza solo una captura de aves por temporada, por lo cual no es posible comparar la condición física de

Tabla 1. Perfil leucocitario del Playero Rojizo (*Calidris canutus rufa*) en el sitio de invernada Río Grande y en su escala trófica en Bahía San Antonio. Se muestra el promedio \pm EE con el rango (entre paréntesis).

	Río Grande	Bahía San Antonio
Leucocitos		
totales	42.5 \pm 4.2 (21–100)	32.6 \pm 2.8 (18–61)
Basófilos (%)	1.7 \pm 0.4 (0–9)	2.5 \pm 0.4 (0–6)
Heterófilos (%)	50.3 \pm 2.5 (17–69)	23.0 \pm 2.6 (8–49)
Eosinófilos (%)	0.8 \pm 0.2 (0–3)	0.8 \pm 0.2 (0–3)
Linfocitos (%)	41.1 \pm 2.5 (25–69)	69.3 \pm 2.8 (42–85)
Monocitos (%)	6.0 \pm 0.6 (1–12)	4.4 \pm 0.7 (1–13)
Heterófilos/ linfocitos	1.4 \pm 0.1 (0–3)	0.4 \pm 0.1 (0–1)
<i>n</i>	23	20

los individuos tanto a su arribo como a su partida. Además, el largo vuelo migratorio provoca que las células musculares se dañen considerablemente (Buehler y Piersma 2007). Esto genera una redistribución de células fagocíticas que invaden las células dañadas para removerlas (Smith 1991), lo cual también probablemente incrementa los valores de heterófilos en Río Grande. Los individuos comienzan a mudar sus plumas de vuelo en este sitio (González 2007), proceso energéticamente costoso que puede también contribuir a aumentar los valores de la proporción heterófilos/linfocitos. De todas formas, es importante considerar que una respuesta inmune, en este estudio determinada por los valores leucocitarios y la proporción heterófilos/linfocitos, se produce principalmente en defensa de agentes extraños, por lo cual siempre es posible que un aumento o disminución de un tipo leucocitario en particular sea consecuencia de que las aves están atravesando algún proceso infeccioso no determinado, o recuperándose de él (Tompkins 2007).

El estrés asociado a la captura puede alterar los valores leucocitarios (Buehler et al. 2008). Sin embargo, todos los muestreos sanguíneos de los individuos estudiados se efectuaron, en promedio, dentro de los 15 min de la captura y en ningún caso se superó las 3 h (Dietz et al. 2009). Por ello, se considera que los valores obtenidos en este trabajo se encuentran dentro de un rango de estrés de captura mínimo.

Los valores aquí presentados complementan a los reportados para los mismos sitios durante la temporada migratoria previa (2005-2006), cuando se encontró el mismo patrón leucocitario (D'Amico et al. 2010). En este caso no pudieron ser analizados otros parámetros hematológicos (e.g., la bioquímica sanguínea), que sí fue evaluada en la temporada anterior, resultando en valores esperados para la especie en cada uno de los sitios (D'Amico et al. 2010). Sin embargo, los datos proporcionados en este trabajo demuestran que los valores leucocitarios son diferentes en cada sitio y contribuyen un aporte sustancial al monitoreo sistemático de la condición física del Playero rojizo durante su migración en la Patagonia. Estos estudios de seguimiento sanitario de la especie se incluyen en el plan de recuperación de su población.

La literatura acerca de inmunidad de base celular en aves migratorias es escasa (Owen y Moore 2006) y es aún más limitada, particularmente, en aves playeras. Los valores celulares hematológicos dependen de factores que actúan a nivel individual (e.g., estado sanitario), del ambiente y su modificación y de las condiciones climáticas a las que están enfrentadas las aves. Por eso el análisis de estos valores puede resultar a veces difícil de interpretar. Si bien la mejor manera de estudiar la respuesta inmunitaria de un organismo es midiendo los diferentes componentes del sistema inmune (inmunidad mediada por células e inmunidad mediada por anticuerpos; Salvante 2006), la estimación leucocitaria a partir del análisis de frotis sanguíneos provee una buena medida del estado inmunitario general (Hale y Briskie 2007, Smits 2007) y es un método relativamente económico (Davis et al. 2008).

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias especialmente a Allan Baker, Marcelo Bertelotti y Patricia González por el constante apoyo durante el trabajo. Las capturas fueron organizadas por el Museo Real de Ontario (Canadá), el Museo de Río Grande, Virginia Choquintel y la Fundación Inalafquen. Gracias a todas las personas que ayudaron en los muestreos de Playero Rojizo, especialmente a Alejandra Varisco y Luciana Gallo por su cooperación en el sangrado de aves. Al Gobierno de Tierra del Fuego y la Dirección de Fauna Silvestre de Río Negro por el asesoramiento local en los trámites de permisos biológicos. Muchas gracias a los revisores del manuscrito por sus valiosas sugerencias. Este trabajo estuvo finan-

ciado por el Museo Real de Ontario y por Fondos de Humedales para el Futuro (RAMSAR). Durante este trabajo, VLD poseía una beca de doctorado de CONICET.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- BUEHLER DM, BHOLA N, BARJAKTAROV D, GOYMANN W, SCHWABL I, TIELEMAN BI Y PERSMA T (2008) Constitutive immune function responds more slowly to handling stress than corticosterone in a shorebird. *Physiological and Biochemical Zoology* 81:673–681
- BUEHLER DM Y PERSMA T (2007) Travelling on a budget: predictions and ecological evidence for bottlenecks in the annual cycle of long-distance migrants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 363:247–266
- BUEHLER DM, TIELEMAN I Y PERSMA T (2010) Indices of immune function are lower in Red Knots (*Calidris canutus*) recovering protein than in those storing fat during stopover in Delaware Bay. *Auk* 127:394–401
- CAMPBELL T (1994) Hematology. Pp. 176–198 en: RITCHIE BW, HARRISON GJ Y HARRISON LR (eds) *Avian medicine: principles and application*. Wingers, Lake Worth
- CAMPBELL TW Y DEIN FJ (1984) Avian hematology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 14:223–248
- D'AMICO VL, BERTELLOTTI M, BAKER AJ Y DÍAZ LA (2007) Exposure of Red Knots (*Calidris canutus rufa*) to select avian pathogens; Patagonia, Argentina. *Journal of Wildlife Diseases* 43:794–797
- D'AMICO VL, BERTELLOTTI M, BAKER AJ Y GONZÁLEZ PM (2010) Hematological and plasma biochemistry values for endangered red knots (*Calidris canutus rufa*) at wintering and migratory sites in Argentina. *Journal of Wildlife Diseases* 46:644–648
- DAVIS AK, COOK KC Y ALTIZER S (2004) Leukocyte profiles in wild House Finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. *EcoHealth* 1:362–373
- DAVIS AK, MANEY DL Y MAERZ JC (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22:760–777
- DIETZ MW, JENNI-EIERMANN S Y PERSMA T (2009) The use of plasma metabolites to predict weekly body-mass change in red knots. *Condor* 111:88–99
- EVA T, HASSELQUIST D, LANGEFORS Å, TUMMELEHT L, NIKINMAA M Y ILMONEN P (2005) Pollution related effects on immune function and stress in a free-living population of pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Journal of Avian Biology* 36:405–412
- GERSHWIN MER, BEACH RS Y HURLEY LS (1985) *Nutrition and immunity*. Academic Press, San Diego
- GONZÁLEZ PM (2007) Declinación poblacional del playero rojizo (*Calidris canutus rufa*) (Scolopaciidae): rol de la supervivencia específica por sexo y estrategias migratorias de larga distancia. Tesis de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires

- GRASMAN KA (2002) Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. *Integrative and Comparative Biology* 42:34–42
- HALE KA Y BRISKIE JV (2007) Decreased immunocompetence in severely bottlenecked population of an endemic New Zealand bird. *Animal Conservation* 10:2–10
- HAWKEY CM Y DENNETT PB (1989) *A colour atlas of comparative veterinary haematology*. Wolfe, Ipswich
- HAYMAN P, MARCHANT J Y PRATER T (1986) *Shorebirds. An identification guide to the waders of the world*. Christopher Helm, Londres
- LÓPEZ-LANÚS B, GRILLI P, DI GIACOMO AS, COCONIER EE Y BANCHS R (2008) *Categorización de las aves de la Argentina según su estado de conservación*. Aves Argentina/AOP y Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires
- MAXWELL MH Y ROBERTSON GW (1998) The avian heterophil leukocyte: a review. *World's Poultry Science Journal* 54:155–178
- MOORE FR, GAUTHREUX SA JR, KERLINGER P Y SIMONS TR (1995) Habitat requirements during migration: important link in conservation. Pp 121–144 en: MARTIN TE Y FINCH DM (eds) *Ecology and management of Neotropical migratory birds*. Oxford University Press, Nueva York
- MOORE FR Y YONG W (1991) Evidence of food-based competition among passerine migrants during stopover. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 28:85–90
- NILES LJ, SITTERS HP, DEY AD, ATKINSON PW, BAKER AJ, CARMONA R, CLARK KE, CLARK NA, ESPOZ C, GONZÁLEZ PM, HARRINGTON BA, HERNÁNDEZ DE, KALASZ KS, MATUS R, MINTON CDT, MORRISON RIG, PECK MK, PITTS W, ROBINSON RA Y SERRANO I (2008) Status of the red knot (*Calidris canutus rufa*) in the Western Hemisphere. *Studies in Avian Biology* 36:1–185
- NORRIS K Y EVANS MR (2000) Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* 11:19–26
- NUN CL, GITTLEMAN JL Y ANTONOVICS J (2003) A comparative study of white blood cell counts and disease risk in carnivores. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270:347–356
- OWEN JC Y MOORE FR (2006) Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes. *Condor* 108:389–398
- PIERSMA T Y BAKER AJ (2000) Life history characteristics and the conservation of migratory shorebirds. Pp. 105–124 en: GOSLINGS LM Y SUTHERLAND WJ (eds) *Behaviour and conservation*. Cambridge University Press, Cambridge
- RABERG L, GRAHN M, HASSELQUIST D Y SVENSSON E (1998) On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265:1637–1641
- ROITT I, BROSTOFF J Y MALE D (2001) *Immunology*. Mosby, Londres
- SALVANTE K (2006) Techniques for studying integrated immune function in birds. *Auk* 123:575–586
- SMITH LL (1991) Acute inflammation: the underlying mechanisms in delayed onset of muscle soreness? *Medicine and Science in Sports and Exercise* 23:542–551
- SMITS JE (2007) Are we enlightened about the immunocompetence of a severely inbred population of New Zealand robins? Challenges inherent in studies using immunological endpoints. *Animal Conservation* 10:14–16
- TOMPKINS DM (2007) Population bottlenecks and the avian immunity: implications for conservation. *Animal Conservation* 10:11–13