

NOTES

Caribbean Journal of Science, Vol. 34, No. 3-4, 313-315, 1998
Copyright 1998 College of Arts and Sciences
University of Puerto Rico, Mayagüez

Valores de Referencia de Inmunoglobulina G en Tres Poblaciones del Manatí (*Trichechus manatus*): Puerto Rico, Colombia y Florida

Nilda M. Jiménez-Marrero,¹ Irma Méndez-Matos,² Ruby A. Montoya-Ospina,³ Ernest H. Williams, Jr.,¹ Lucy Bunkley-Williams,⁴ y Antonio A. Mignucci-Giannoni³, ¹Departamento de Ciencias Marinas, Universidad de Puerto Rico, PO Box 908, Lajas, Puerto Rico 00667, ²Departamento de Tecnología Médica, Universidad Interamericana, San Germán, Puerto Rico 00683, ³Red Caribeña de Varamientos • Caribbean Stranding Network, PO Box 38030, San Juan, Puerto Rico 00937, ⁴Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico, PO Box 9012, Mayagüez, Puerto Rico 00681.1

Un aspecto clínico muy útil para establecer el estado de salud de un animal, y cómo su medio ambiente lo afecta es la concentración de inmunoglobulinas. Los niveles de inmunoglobulinas pueden relacionarse con algunas enfermedades y pueden usarse para corroborar el diagnóstico de éstas (Turgeon, 1996). Además el sistema inmunológico de algunos animales es afectado por sustancias que contaminan su hábitat natural. Estas sustancias deprimen el sistema haciéndolos susceptibles a enfermedades y provocando un aumento significativo en la mortandad de algunas especies (Ross, 1995). Para detectar estas fluctuaciones en el sistema inmunológico, es necesario conocer los niveles normales de inmunoglobulinas en individuos de poblaciones naturales.

En este estudio determinamos las concentraciones de inmunoglobulina G (IgG) en individuos de tres poblaciones de manatíes (*Trichechus manatus*) de Puerto Rico, Colombia y Florida.

Las muestras de sangre se obtuvieron de manatíes silvestres capturados como parte de un proyecto de radio-telemetría en Ceiba, Puerto Rico (n = 2); manatíes en rehabilitación en Puerto Rico (n = 2); manatíes en semi-cautiverio rescatados en la provincia de Magdalena, Colombia (n = 20); y manatíes en cautiverio rescatados por Sea World en Florida (n = 5). Los manatíes de Colombia y de Puerto Rico fueron capturados utilizando una red y llevados a un área de sombra para examinarlos y tomar las muestras. Las muestras de Florida se tomaron como parte de exámenes rutinarios en el acuario. Las muestras de sangre se tomaron del plexo venoso, al lado palmar de la aleta pectoral, entre el radio y la ulna (Geraci y Lounsbury, 1993). La sangre se colectó en un tubo estéril que se colocó en posición vertical a temperatura ambiente (22-25°C) por 30 minutos para permitir la coagulación. Luego la muestra se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. El suero se dividió en alícuotas de 2 ml y se congeló hasta ser analizado.

Se utilizó una placa de 12 fosas de inmunodifusión radial (RID, siglas en inglés) para IgG humana (Hycor Biomedical's Accuplate Radial Immunodiffusion Test System). Se descongeló una alícuota de cada individuo a temperatura ambiente. Como ensayos previos habían demostrado que el suero puro produce aros de precipitación demasiado grandes como para ser leídos con la tabla de referencia del RID, se diluyó el suero con solución salina a una concentración de 1:2 y 1:4. Se aplicaron 5 microlitros de muestra en cada fosa. Ambos análisis (1:4 y 1:2) se procesaron simultáneamente. Para validar el equipo se hicieron controles con muestras de sangre humana con valores altos y bajos en cada ensayo. Se cubrieron las placas y se dejaron a temperatura ambiente por 24 horas. Se midieron los aros de precipitación al 0.1 mm más cercano usando una regla especial (Quip meter, Helena laboratories). Doce días después se hizo otro análisis con las muestras diluidas 1:4. Luego de cuatro meses se corrió otro análisis. En este último las concentraciones muy altas de IgG se diluyeron 1:8 y las otras se diluyeron 1:4. Para establecer una relación entre los diámetros de los aros de precipitación y la concentración de IgG real, se diluyó IgG pura de manatí de Florida, a tres concentraciones (1:2, 1:4 y 1:8) con solución salina. Las tres concentraciones se procesaron en el RID.

Los datos se analizaron mediante el método estadístico Nested ANOVA modelo II para el análisis de muestras de distintos tamaños (Sokal y Rohlf, 1989). Se analizaron diferencias entre poblaciones y entre individuos, diferencias por el tiempo de almacenamiento de la muestra y diferencias entre las diluciones utilizadas. Los datos de Colombia y Florida se analizaron para diferencia entre sexo utilizando el método estadístico de clasificación singular ANOVA.

Los aros de precipitación del suero de manatí fueron más tenues que los de humanos. La curva de la concentración de IgG pura de manatí tomada con sus respectivos diámetros de precipitación en el RID, está

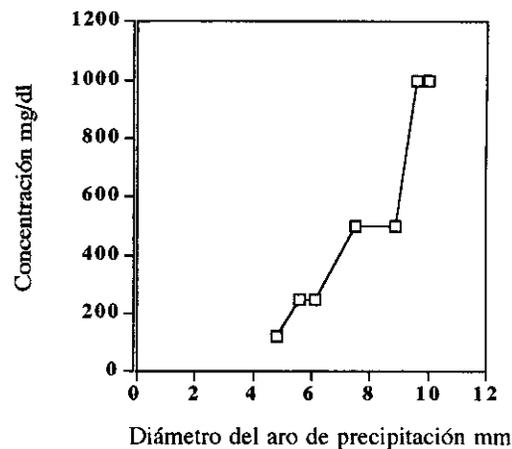


FIG. 1. Curva estándar de concentración de IgG pura de manatí de Florida.

TABLA 1. Promedio de los tres ensayos para la concentración de inmunoglobulina G (IgG) de manatí de tres localidades.

Individuo	Localidad	Sexo	Concentración con RID TR ¹	Concentración basada en ecuación
² NEPST410	Colombia	M	1803.00	180.58
NEPST402	Colombia	F	2745.00	315.84
NEPST157	Colombia	F	3518.00	367.43
NEPST219	Colombia	M	3232.00	412.38
NEPST216	Colombia	F	3323.60	432.37
NEPST411	Colombia	F	3459.71	485.07
NEPST224	Colombia	M	4670.67	563.40
NEPST218	Colombia	F	4994.50	592.02
NEPST154	Colombia	M	6051.00	613.13
NEPST116	Colombia	M	5050.50	618.93
NEPST166	Colombia	M	4764.40	651.14
NEPST409	Colombia	F	6148.00	654.24
NEPST213	Colombia	M	6496.00	683.28
NEPST404	Colombia	F	5970.67	721.19
NEPST221	Colombia	M	5581.33	750.94
NEPST405	Colombia	M	6668.00	1012.72
NEPST156	Colombia	F	5674.67	1074.27
NEPST225	Colombia	F	6332.00	1153.79
NEPST153	Colombia	M	6724.00	1453.75
NEPST151	Colombia	F	5830.00	1461.62
NEPST212	Puerto Rico	M	7581.33	1023.90
³ TPR03	Puerto Rico	M	13620.00	1829.50
NEPST175	Puerto Rico	M	18536.00	1897.02
TPR-08	Puerto Rico	M	19312.00	2725.52
⁴ SWF-TM-7918-B	Florida	F	3450.50	435.78
SWF-TM-9004-B	Florida	M	3326.00	891.07
SWF-TM-8827-B	Florida	F	6094.67	1232.91
SWF-TM-8302-B	Florida	M	9198.00	1470.74
SWF-TM-8921-B	Florida	M	13440.00	2373.35

¹TR = Tabla de referencia para IgG humana de RID

²NEPST# = Neptuno Stranding

³TPR# = Telemetry Puerto Rico

⁴SWF-TM# = Sea World of Florida- *Trichechus manatus*

definida por la siguiente ecuación: $y = 9.21 - 43.68x + 13.95x^2$ (Fig. 1). Todas las concentraciones de IgG se calcularon usando la ecuación antes descrita y la tabla de referencia de RID para IgG humana.

Los valores para la concentración de IgG de manatíes, según la curva de IgG puro, fueron de 154.28 a 2068.89 mg/dl para manatíes de Colombia; de 720.48 a 3324.96 mg/dl para los de Puerto Rico; y de 287.33 a 2901.75 mg/dl para los de Florida. Sin embargo, utilizando la tabla de referencia de RID para IgG humana los valores fueron más altos, con 1068.00 a 11268.00 mg/dl para Colombia; 2256.00 a 13440.00 mg/dl para Florida; y 5720.00 a 19312.00 mg/dl para Puerto Rico.

Promediando los tres análisis hechos por individuo (Tabla 1), el valor para la concentración de IgG según la curva de IgG pura fue de 180.58 a 1461.62 mg/dl para Colombia, de 1023.90 a 2725.52 mg/dl para Puerto Rico; y de 435.78 a 2373.35 mg/dl para Florida. Utilizando la tabla de referencia de RID para IgG humana los valores promedios fueron también más

altos, siendo de 1803.00 a 6724.00 mg/dl para Colombia; de 7581.00 a 19312.00 mg/dl para Puerto Rico; y de 3326.00 a 13440.00 mg/dl para Florida.

La concentración promedio, basada en la curva de IgG puro, para Colombia fue de 681.56 mg/dl, para Puerto Rico de 2491.98 mg/dl y para Florida de 1280.77 mg/dl. Al medir la concentración promedio para los individuos utilizando la tabla de referencia de RID, ésta fue 4659.63 mg/dl para Colombia, 12547.43 mg/dl para Puerto Rico y 5881.17 mg/dl para Florida.

El análisis estadístico de los valores de las concentraciones de IgG, obtenidos usando la ecuación cuadrática, fue significativo para tamaño de grupo ($P \leq 0.05$). El análisis entre grupos no fue significativo, indicando que no hay diferencia significativa entre las muestras corridas en distintos días y a distintas diluciones. Tampoco hubo diferencia por sexo, en manatíes de Colombia y Florida. Iguales resultados se obtuvieron al analizar las concentraciones de IgG obtenidas utilizando la tabla de referencia de RID para IgG humana.

Los valores de concentración de IgG obtenidos para las poblaciones estudiadas pueden servir como base para estudios inmunológicos futuros y para el diagnóstico de animales inmuno-deprimidos. Estos valores también pueden ser útiles para aquellos que se dedican a la rehabilitación de manatíes enfermos. En algunos casos, los niveles de inmunoglobulinas pueden utilizarse para corroborar el diagnóstico de enfermedades y observar su progreso. El establecimiento de un sistema sencillo, práctico y poco costoso para medir la concentración de IgG en suero de manatíes es particularmente importante para los investigadores que a menudo confrontan deficiencias presupuestarias. El sistema Hycor Biomedical's RID puede usarse con este propósito.

La diferencia entre los aros de precipitación formados al utilizar suero humano versus los del suero de manatí puede atribuirse a que el equipo está diseñado para reaccionar con la IgG humana; sin embargo, se presume que el equipo puede detectar la IgG de manatíes, ya que en general la molécula de IgG ha sufrido poco cambio durante la evolución de los mamíferos (Nash y Mach, 1971; Britt y Howard, 1983; Ross, 1995).

La calibración de este sistema a través de una ecuación que relaciona el diámetro de precipitación del suero de manatí con la concentración de IgG también es importante. Esto se hizo utilizando una muestra de IgG pura de manatí, por lo que las concentraciones eran conocidas. Los resultados cuantitativos de ambos métodos no son iguales; al igual que en análisis de laboratorio para humanos, la utilización de distintas metodologías arrojan distintos resultados. Lo importante es tener para cada sistema y población los valores de referencia.

Los resultados obtenidos son similares a los informados para delfines (Sweeney et al., 1987), aunque los manatíes muestran un valor mayor. La diferencia significativa encontrada para tamaño de grupos entre las tres poblaciones va de acuerdo a lo esperado, ya que a pesar de pertenecer a la misma especie, éstas se encuentran sometidas a influencias ambientales diferentes.

Nuestros resultados permiten validar el uso del sistema de inmunodifusión radial diseñado para humanos (RID) para ser utilizado con suero sanguíneo de manatíes.

Reconocimientos.—Agradecemos al Dr. P. M. McGuire (Universidad de Florida) por su valiosa aportación de ideas, sugerencias y por proporcionar la IgG pura de manatí para comparación. También le agradecemos al Dr. D. K. Odell y a Sea World de Florida permitirnos utilizar muestras de los animales bajo su cuidado. Agradecemos a J. P. Reid y a R. K. Bonde (Proyecto Sirenia) por incluir este estudio bajo su proyecto de capturas para radio-telemetría de manatíes. Las muestras de sangre fueron colectadas y transportadas bajo cartas de autorización emitidas a la Red Caribeña de Varamientos por el Departamento de Recursos Naturales y Ambientales, y la Oficina de Recuperación del Manatí del Servicio de Pesca y Vida Silvestre, bajo el permiso de investigación PRT-684532 del Proyecto Sirenia, y bajo los permisos de CITES US804391 del Servicio Nacional de Pesca y Vida Sil-

vestre y CO/A/4838 del Ministerio del Ambiente de Colombia. Agradecemos a A. R. Estrada-Acosta, M. Tacher-Roffe, y a un árbitro anónimo por sus valiosos comentarios sobre la redacción del manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Bossart, G. D., y L. A. Dierauf. 1990. Marine mammal clinical laboratory medicine. Páginas 1-43 *en* L. A. Dierauf (ed.), Handbook of marine mammal medicine: Health disease, and rehabilitation. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Britt, J. O. Jr., y E. B. Howard. 1983. The hematopoietic system. Páginas 64-72 *en* E. B. Howard (ed.), Pathobiology of marine mammal diseases. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Geraci, J. R., y V. J. Lounsbury. 1993. Specimen and data collection. Marine mammal ashore: A field guide for strandings. Publicación del Texas A & M Sea Grant, Galveston, Texas, 305 pp.
- Nash, D. R., y J. Mach. 1971. Immunoglobulin classes in aquatic mammals. Journal of Immunology 107:1424-1430.
- Ross, P. S. 1995. Seals, pollution and disease: environmental contaminant-induced immunosuppression. Tesis de doctorado, Universidad de Utrecht, Canada, 173 pp.
- Sokal, R. R., y F. J. Rohlf. 1989. Nested analysis of variance. Biometry. W. H. Freeman & Co., New York, New York, XXX pp.
- Sweeney, J. C., N. A. Vedros, y R. L. Stone. 1987. Quantification of dolphin IgG using field-use radial immunodiffusion. Páginas 74-82 *en* Proc. 18th Annual International Association of Aquatic Animal Medicine Conference.
- Turgeon, M. L. 1996. Antigens and antibodies. Páginas 14-33 *en* S. Bircher (ed.), Immunology and serology in laboratory medicine. C. V. Mosby Co., St. Louis, Missouri.