

# Modelo para la inducción de granulocitopenia en pollos de engorda mediante la administración de 5-fluorouracilo

Xóchitl Hernández Velasco\*  
Gary García Espinosa\*  
Jaime A. Navarro Hernández\*\*  
José A. Quintana López\*  
Michael Kogut Henri\*\*\*  
Guillermo Téllez Isaías\*

## Abstract

Fifty one-day-old broiler chicks were used in this study in a polymorphonuclear leukocyte (PMN) depletion model with 5-fluorouracil treatment chicken. Forty-five animals were randomly assigned into 3 groups of 15 birds each, and 5 chicks were used for bacteriologic monitoring. On day 17, the control Group (1) was intravenously inoculated with sterile phosphate-buffered solution (2 ml PBS on average) and pH 7.4, and Groups 2 and 3 were inoculated with a single dose of 200 and 300 mg/kg body weight 5-fluorouracil (5-FU) to each bird, respectively. On days 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 and 15 postinoculation (PI), 10 chicks from each group were bled for counts of total- and differential white blood cells and determination of polymorphonuclear leukocytes/total leukocytes (PMN/TL) ratio per day. A fast reduction in PMN/TL ratio started from day 1 after 5-FU treatment, and a further reduction in PMN/TL ratio occurred from days 7 to 9 PI. On day 15 PI, birds treated with the 5-FU recovered their PMN/TL ratios to the normal. There were highly significant differences ( $P < 0.001$ ) in PMN/TL ratio between groups, between PI days, as well as in the interaction 5-FU dosage and PI time. A significant reduction ( $P < 0.05$ ) in the PMN/TL ratio was found in birds given 200 and 300 mg/kg BW 5-FU and between days, compared with the control birds. Clinical signs of toxicity appeared in birds treated with 300 mg/kg body weight 5-FU.

**Key words:** CHICKEN, 5-FLUOROURACIL, POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES, GRANULOCYTOPENIA.

## Resumen

Se utilizaron 50 pollitos de engorda de un día de edad que fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos con 15 aves cada uno, más 5 para muestreo bacteriológico. A los 17 días de edad, se inoculó en promedio 2 ml de solución salina fosfatada estéril, por vía endovenosa a las aves del grupo 1, mientras que en los grupos 2 y 3 se les administró 5-fluorouracilo (5-FU) en solución a dosis de 200 y 300 mg/kg de peso, respectivamente. A 10 aves de cada grupo se les tomó una muestra sanguínea durante los días 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 15 postratamiento (PT) para realizar un conteo total y diferencial de leucocitos; posteriormente se obtuvo la proporción de leucocitos polimorfonucleares / leucocitos totales (PMN/L<sub>T</sub>). Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la proporción de PMN/L<sub>T</sub> en los grupos tratados con 5-FU disminuyó a partir del día 1 hasta el día 9 PT, los valores más bajos se presentaron al día 9 PT y los valores normales se

Recibido el 5 de mayo de 1997 y aceptado el 13 de noviembre de 1997.

\* Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

\*\* Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

\*\*\*USDA/ARS Food Animal Protection Research Laboratory Rt. Box 810 College Station, TX USA 77845.

recuperaron hasta el día 15 PT. Se encontraron diferencias altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre los grupos, entre los días de muestreo, así como en la interacción de la dosis de 5-FU y el tiempo PT en relación con los valores de las proporciones de PMN/ $L_T$ . Asimismo, se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre las proporciones de PMN/ $L_T$  de las aves tratadas con 5-FU en comparación con las aves del grupo testigo, así como entre los días de muestreo en los grupos tratados. Las aves tratadas con 300 mg de 5-FU/kg de peso presentaron signos de toxicidad.

**Palabras clave:** POLLO DE ENGORDA, 5-FLUOROURACILO, LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES, GRANULOCITOPENIA.

## Introducción

A diferencia de los mamíferos, en las aves el grupo de células polimorfonucleares (PMN) incluye a los heterófilos, eosinófilos y basófilos.<sup>1</sup> Debido al bajo número de eosinófilos y basófilos en pollos, en algunos estudios todos los PMN se han considerado como heterófilos.<sup>2,3,4</sup>

Los heterófilos son el equivalente de los neutrófilos en otras especies y tienen gran importancia como barrera de defensa contra infecciones bacterianas.<sup>3,5,6,7</sup>

Los heterófilos son células de patrullaje con gran fuerza contráctil, motilidad y direccionalidad que desempeñan funciones fundamentales en la resistencia innata y participan en la eliminación de microorganismos y tejidos muertos, por lo que son células que predominan inicialmente en los sitios de reclutamiento para llevar a cabo la inflamación.<sup>8,9</sup> Son reclutadas a los sitios de infección por componentes del agente y mediadores inflamatorios del huésped, mediante los procesos de pavimentación y adhesión al endotelio vascular, diapedesis y quimiotaxis.<sup>9,10,11</sup> Existen dos tipos de células fagocíticas especializadas: los macrófagos y los heterófilos polimorfonucleares; sin embargo, los heterófilos son más eficientes que los macrófagos para fagocitar y destruir bacterias, incluso en ausencia de opsoninas.<sup>9,12</sup>

Hasta el momento, sólo se han identificado en los gránulos de los heterófilos enzimas como la fosfatasa ácida,  $\beta$ -glucuronidasa y esterase inespecífica,<sup>13</sup> y se ha determinado que carecen de mieloperoxidasa y fosfatasa alcalina.<sup>14,15</sup> Existen estudios que describen el papel de los heterófilos *in vitro* contra diversas infecciones.<sup>3,16,17</sup>

Los eosinófilos también tienen capacidad fagocítica, pero menor a la de los heterófilos, aumentan en número en las infecciones por nematodos y en las reacciones de hipersensibilidad, mientras que los basófilos son menos abundantes.<sup>9</sup>

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un fármaco antineoplásico utilizado ampliamente para el tratamiento paliativo de carcinomas por su actividad selectiva sobre células cancerígenas, ya que se incorpora mejor dentro del tejido tumoral que dentro de los tejidos normales.<sup>18,19</sup>

El 5-FU es una fluoropirimidina que se metaboliza en el organismo a 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUM) que inhibe la síntesis de ADN por bloquear la actividad de la enzima timidina sintetasa; en este sentido la biotransformación por metilación del monofostato de desoxiuridina en monofostato de desoxitimidina no se lleva a cabo, provocando un desequilibrio metabólico y muerte de la célula.<sup>19,20</sup> Otro mecanismo de acción del 5-FU involucra la síntesis de ribonucleótidos que se incorporan dentro del ARN con iguales efectos.<sup>21</sup>

El 5-FU tiene un efecto citotóxico sobre las células progenitoras de la médula ósea que impide su replicación.<sup>22,23</sup> En ratones se ha notificado que el 5-FU disminuye el número de células precursoras de granulocitos-monocitos en forma transitoria; sin embargo, las células que sobreviven a su exposición, posteriormente aumentan su capacidad proliferativa sobrepasando los niveles normales y son capaces de producir neutrófilos con actividad bactericida normal.<sup>24,25</sup> Además, se ha demostrado que el 5-FU induce mielosupresión en ratones, predominantemente de PMN.<sup>26</sup> Kogut *et al.*<sup>2,3</sup> observaron que el 5-FU produce granulocitopenia en pollitos Leghorn de 2 semanas de edad.

Los objetivos de este estudio fueron adecuar un modelo para inducir granulocitopenia en pollos de engorda de 17 días de edad mediante la administración de 5-fluorouracilo, que permitiera evaluar el papel de los leucocitos polimorfonucleares en diferentes enfermedades aviares *in vivo*, así como determinar si las dosis de 200 y 300 mg/kg de peso de este fármaco son capaces de producir granulopenia severa sin efectos adversos.

## Material y métodos

### Animales de experimentación

Se utilizaron 50 pollitos de engorda mixtos, Peterson  $\times$  Avian Farm de un día de edad, provenientes de una incubadora comercial; fueron criados en batería eléctrica\* ubicada en una unidad de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. A todas las aves se les proporcionó alimento balanceado de iniciación con 22% de proteína cruda y 3100 Kcal/kg y agua *ad libitum* hasta el final del experimento.

\* Petersime Brood-Unit; Petersime Incubator Company. Gettsburg, Ohio, U.S.A.

## 5-Flourouracil

Se administró 5-FU\* a dosis única de 200 y 300 mg/kg de peso<sup>2</sup> en la vena yugular de cada ave a los 17 días de edad, mientras que a las aves de los grupos testigos se les administró un volumen igual de solución salina fosfatada estéril con un pH de 7.4.

### Conteo total y diferencial de leucocitos

Las muestras de sangre de las aves se obtuvieron a la misma hora en cada uno de los grupos experimentales; de cada ave se colectó una muestra de 0.1 ml por punción de la vena radial, la sangre fue vertida en un vial de vidrio con 1.9 ml del diluyente de Natt y Henrick, ambas fueron mezcladas suavemente y se almacenaron para su conteo posterior por medio de un hematocitómetro.<sup>27</sup> Simultáneamente al muestreo para el conteo total de leucocitos, se tomó una gota de sangre y se hizo un frotis sanguíneo por pollo, que se dejó secar a temperatura ambiente, para posteriormente teñirse con la tinción de Wright. A partir de un total de 100 células de cada frotis, se realizó el conteo diferencial entre células mononucleares y PMN.<sup>1,2,3,13</sup> Las células se identificaron de acuerdo con la descripción de Lucas y Jamroz.<sup>4</sup> Se determinó la proporción de leucocitos polimorfonucleares/leucocitos totales (PMN/L<sub>T</sub>) por pollo.<sup>28</sup>

### Diseño experimental

Al día de llegada de los pollitos se realizó un muestreo bacteriológico a partir del alimento, la cama de las cajas de transporte y del hígado y del saco vitelino de 5 pollos tomados al azar del grupo inicial de 50. Al día 15 de edad las aves se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos de 15 cada uno, posteriormente se obtuvo una muestra basal de sangre para confirmar que las medias del conteo total y diferencial de leucocitos entre grupos estuvieran en línea base. Los tratamientos se asignaron aleatoriamente a cada uno de los grupos y consistieron en la aplicación por vena yugular a los 17 días de edad de: 1) grupo testigo, solución salina amortiguadora estéril, 2) grupo tratado con una dosis única de 200 mg/kg de peso de 5-FU, 3) grupo tratado con una dosis única de 300 mg/kg de peso de 5-FU. A los días 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 15 posadministración del 5-FU se muestrearon 10 aves de cada grupo para realizar el conteo total y diferencial de leucocitos, los 5 pollos restantes en cada grupo se mantuvieron durante el experimento para prevenir que no faltaran lecturas.

### Análisis estadístico

Los valores de la proporción de PMN/L<sub>T</sub> por pollo fueron sometidos a una prueba de análisis de varianza

(ANDEVA) con un diseño de dos factores con mediciones repetidas en un factor.<sup>29</sup>

## Resultados

En los dos grupos tratados con 5-FU se observó una disminución acelerada de la proporción de PMN/L<sub>T</sub> a partir del día 1, registrándose los valores más bajos entre

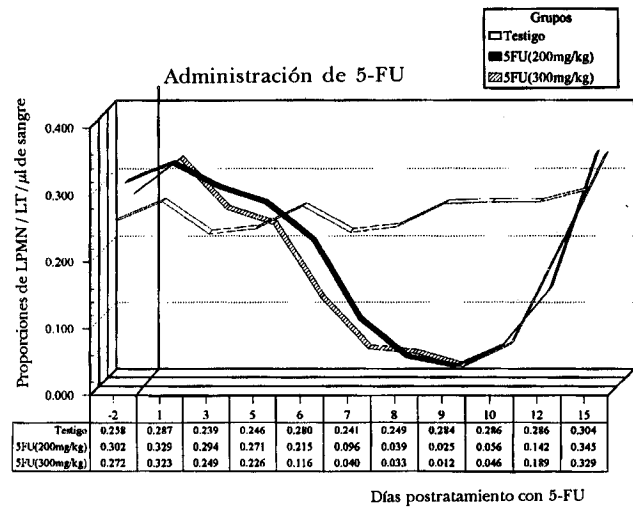


Figura 1. Efecto de la administración intravenosa de 200 o 300 mg de 5-fluorouracilo (5-FU)/kg de peso en pollos de engorda (10 aves por grupo) de 17 días de edad (día 0) sobre la proporción de leucocitos polimorfonucleares/leucocitos totales (LPMN/LT) en sangre periférica. Se observó un efecto de interacción altamente significativo ( $P < 0.001$ ) entre los grupos y los días de muestreo.

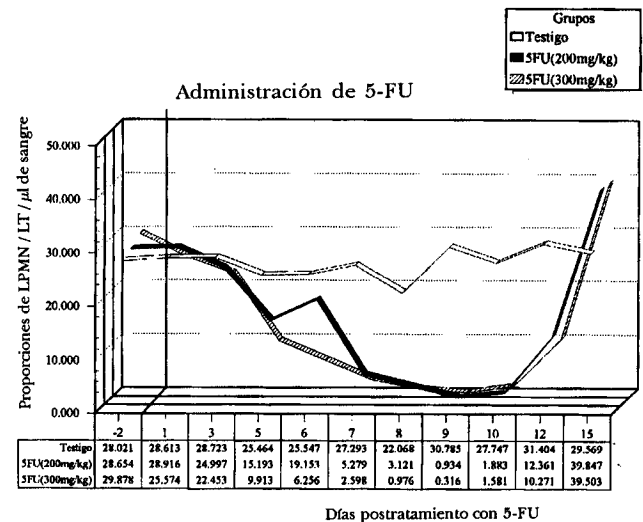
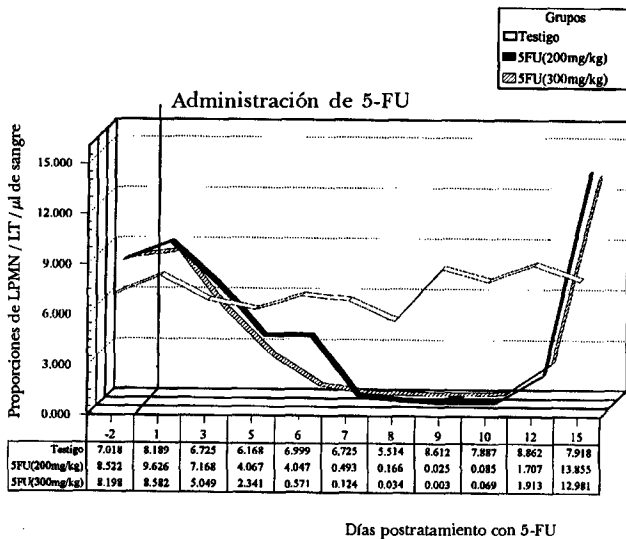


Figura 2. Efecto de la administración intravenosa de 200 o 300 mg de 5-fluorouracilo (5-FU)/kg de peso en pollos de engorda (10 aves por grupo) de 17 días de edad (día 0) sobre el número de leucocitos totales en sangre periférica.

\* Roche, S.A. de C.V., México, D.F.



**Figura 3.** Efecto de la administración intravenosa de 200 o 300 mg de 5-fluorouracilo (5-FU)/kg de peso en pollos de engorda (10 aves por grupo) de 17 días de edad (día 0) sobre el número de leucocitos totales en sangre periférica.

los días 7 y 10 postratamiento (PT), principalmente al día 9 PT; los valores normales se recuperaron en relación con el grupo testigo hasta el día 15 PT (Figura 1). Estos valores son reflejo del número total de leucocitos y número total de PMN, en los que se observa el mismo comportamiento (Figuras 2 y 3).

Se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ), en la interacción entre los grupos y los días de muestreo, esto significa que las dosis de 5-FU tienen diferentes efectos sobre la proporción de PMN/ $L_T$  conforme transcurre el tiempo después de su administración.

## Discusión

En los grupos tratados con 5-FU se observó una disminución marcada de los PMN totales a partir del día 1 PT, y llegó a sus niveles más bajos entre los días 7 y 10, posteriormente recuperaron los niveles normales; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kogut *et al.*<sup>2</sup> Además se observó un aumento de PMN por encima de los niveles normales el día 15, lo cual es un reflejo del efecto reversible y compensatorio de las células progenitoras de PMN; esto concuerda con los resultados obtenidos en estudios anteriores realizados con ratones.<sup>25,26</sup> Sin embargo, en el presente estudio se decidió notificar los resultados expresados en la proporción de PMN/ $L_T$  porque se consideró que fue menos variable que el número total de PMN en los grupos tratados.

En el grupo tratado con 300 mg/kg de peso de 5-FU, se observaron algunos signos adversos como caída de plumas, petequias y laceraciones en piel en algunos animales, la posología de este fármaco se basa en función del peso corporal;<sup>19,30</sup> sin embargo, las aves empleadas en este estudio fueron más grandes y pertenecieron a una estirpe pesada a diferencia de las aves utilizadas por Kogut *et al.*,<sup>2</sup> además el fármaco que se utilizó se administró como solución inyectable\* (presentación comercial), lo que facilitó su biodisponibilidad; en este sentido, en el presente estudio la dosis tóxica fue igual o posiblemente menor a 300 mg/kg de peso.

La médula ósea es uno de los principales sitios de acción del 5-FU en pacientes normales.<sup>19,30</sup> El 5-FU no tiene una actividad selectiva contra los leucocitos PMN; sin embargo, posiblemente estas células son más susceptibles que otras de la línea linfóide, debido a que su vida media es más corta. Los neutrófilos son células de supervivencia limitada, su vida media es de 2 a 3 días, mientras que otras células como los monocitos viven meses o incluso años.<sup>9</sup> Debido a que las células de rápido crecimiento fijan mejor al 5-FU,<sup>19</sup> posiblemente la mayor susceptibilidad de los PMN al 5-FU en aves sanas sea debido a la mayor capacidad de replicación de sus células progenitoras.

En las aves los PMN se forman y se desarrollan exclusivamente en la médula ósea,<sup>31</sup> por lo que el uso de 5-FU en pollos puede ser un buen modelo para el estudio de la resistencia a diversos agentes en condiciones de granulocitopenia.

## Referencias

1. Sturkie PD, Griminger P. Body fluid blood. In: Sturkie PD, editor. Avian physiology. New York: Springer-Verlag, 1986:102-121.
2. Kogut HM, Tellez IG, Hargis MB, Corrier ED, DeLoach RJ. The effect of 5-fluorouracil treatment of chicks: a cell depletion model for the study of avian polymorphonuclear leucocytes and natural host defences. Poultry Sci 1993;72:1873-1880.
3. Kogut HM, Hargis MB, Corrier ED, DeLoach RJ. Heterophils are decisive components in the early responses of chickens to *Salmonella enteritidis* infections. Microb Pathog 1994;16:141-151.
4. Lucas AM, Jamroz C. Atlas of avian hematology. Washington (DC): US Dept. of Agriculture (U.S.D.A.), 1961.
5. Powell PC. Immune mechanisms in infections of poultry. Vet Immunol Immunopathol 1987;15:87-113.
6. Powell PC. Macrophages and other nonlymphoid cells contributing to immunity. In: Toivanen A, Toivanen P, editors. Avian immunology. Boca Raton (FL): CRC Press, 1987:195-212.
7. Topp RC, Carlson HC. Studies on avian heterophils. III. Phagocytic properties. Avian Dis 1972;16:374-380.
8. Carlson HC. The acute inflammatory reaction in chicken breast muscle. Avian Dis 1972;16:553-558.
9. Roitt J, Brostoff J. Inmunología. 7a ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, S.A., 1994.
10. Kogut HM, Moyes BR, DeLoach RJ. Las citocinas y sus interacciones funcionales: potenciación de la respuesta

\* Fluoro-uracil. Roche, S.A. de C.V., México, D.F.

- inflammatoria en el control de infecciones sistémicas por *Salmonella* en aves. Memorias del Curso de Avances sobre Inmunología Aviar; 1996 marzo 15; México (DF). México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, A.C., 1996:8-12.
11. Ming WJ, Bersani L, Mantovani A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1987;138:1474-1480.
  12. Stabler JG, McCormick TW, Powell KC, Kogut MH. Avian heterophils and monocytes: phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. *Vet Microbiol* 1994;38:293-305.
  13. Topp RC, Carlson HC. Studies on avian heterophils. II. Histochemistry. *Avian Dis* 1972;16:369-373.
  14. Atwal OS, McFarland LZ. A morphologic and cytochemical study of erythrocytes and leukocytes of *Coturnix coturnix japonica*. *Am J Vet Res* 1966;27:1059-1065.
  15. Brune K, Spintzanagel JK. Peroxidaseless chicken leukocytes: isolation and characterization of antibacterial granules. *J Infect Dis* 1973;127:84-94.
  16. Kogut HM, McGruder ED, Hargis MB, Corrier ED, DeLoach RJ. *In vivo* activation of heterophil function in chicken following infection with *Salmonella enteritidis* immune lymphopenic. *J Leukoc Biol* 1995;57:56-62.
  17. Latimer KS, Harmon BG, Glisson JR, Kircher IM, Brown J. Turkey heterophil chemotaxis to *Pasteurella multocida* (serotypes 3,4) generated chemotactic factors. *Avian Dis* 1990;34:137-140.
  18. Fujii S, Shirasaka T. Development of fluoropyrimidine derivatives. *Gan To Kagaku Ryoho* 1984;11:2316-2328.
  19. Goodman GA, Goodman LS, Rall TW, Murad F. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 7a ed. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 1987.
  20. Suga S, Kimura K, Kubo K, Aoyama H, Inukai N, Kato K, *et al.* Mode of action of fluoropyrimidines in relation to their clinical application. *Gan To Kagaku Ryoho* 1984;11:2301-2306.
  21. Pizzorno G, Sun Z, Handschumacher RE. Aberrant cell cycle inhibition pattern in human colon carcinoma cell lines after exposure to 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol* 1995;49:553-557.
  22. Molineux G, Migdalska A, Haley J, Evans G, Dexter M. Total marrow failure induced by pegylated stem-cell factor administered before 5-fluorouracil. *Blood* 1995;83:3491-3499.
  23. Shimamura M, Koboyashi Y, Yuo A, Urabe A, Okabe T, Komatsu Y, *et al.* Effect of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic injury in mice induced by 5-fluorouracil. *Blood* 1987;69:353-355.
  24. Donowitz GR, Quesenberry P. 5-fluorouracil effect on cultured murine stem cell progeny and peripheral leukocytes. *Exp Hematol* 1986;14:207-214.
  25. Yaeger AM, Levin J, Levin FC. The effects of 5-fluorouracil on hematopoiesis: studies of murine megakaryocyte-CFC, granulocyte-macrophage CFC, and peripheral blood cell levels. *Exp Hematol* 1983;11:944-952.
  26. Moore MAS, Warren DJ. Synergy of interleukin-1 and granulocyte colony stimulating factor *in vivo* stimulation of stem cell recovery and hematopoietic regeneration following 5-fluorouracil treatment of mice. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:7134-7138.
  27. Natt PM, Herrick AC. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Sci* 1952;31:735-738.
  28. Gross BW, Siegel HS. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis* 1983;27:972-979.
  29. Lyman R. An introduction to statistical methods and data analysis. 4th ed. Belmont (CA): Duxbury Press, 1993.
  30. Haskell MC. Cancer treatment. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995.
  31. Glick B, Rosse C. Cellular composition of the bone marrow in the chicken. Identification of cells. *Anat Rec* 1976;185:235-246.