

ISSN 1514259-0

Analecta Veterinaria

Publicación de la Facultad de Ciencias Veterinarias

Volumen 22 n° 1 2002



Universidad Nacional de La Plata

La Plata, Buenos Aires, Argentina



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

Autoridades

Decano

Méd.Vet. Eduardo Rafael Pons

Vicedecano

Dr. Edgardo Nosetto

Secretario Académico

Dr. Marcelo Pecoraro

Secretario de Postgrado

Dra. Pilar Peral García

Secretario de Extensión Universitaria

Méd.Vet. Alicia Antonini

Secretario de Ciencia y Técnica

Dr. Edgardo Nosetto (a cargo)

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité Editorial

(Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi (h)

Dr. Pablo E. Martino

Méd.Vet. Enrique Pennimpede

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

Responsable Versión Electrónica

Méd.Vet. Santiago Corva

Supervisión de Estilo

Méd.Vet. Julio Bernal

Prof. Nora B. Vázquez

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 22 n° 1, 2002

Publicación de la

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

Consultores:

R. Bowden (Argentina), F. Capano (Uruguay), A. Conigliaro (Argentina), L. Estol (Argentina), E. Montero Gei (Costa Rica), A. Parma (Argentina), R. A. Fernández (Argentina), J. Lasta (Argentina), L. Rodríguez Roque (Costa Rica), A. Fernández Alosa (Brasil), H. Tersolo (Argentina), J. Zorzópulos (Argentina), E. Gimeno (Argentina), C. Schenk (Argentina), E. Coppo (Argentina), L.M. Friche Passos (Brasil), J.M. Gutiérrez (Costa Rica), R. Cacchione (Argentina), F. Cortés Benavides (España), M. Carballo (España), R.M. Dauder (España), R. de Torres (Argentina), P. Ostrosky-wegman (España), J. Surralles Calonge (España), N. Auza (Argentina), M. Barrandeguy (Argentina), M. Carballo (Argentina), J.A. Coppo (Argentina), C. Corbellini (Argentina), F. Costa (Argentina), C. Eddi (Argentina), A. Fosatti (Argentina), E. Gentilini (Argentina), S. Gómez Cabrera (Argentina), C. Gómez Dumm (Argentina), J. González Tomé (Argentina), A. Guglielmone (Argentina), I. von Landzewitsch (Argentina), N. Leardini (Argentina), L. León Vizcaino (España), H. Molinuevo (Argentina), E. Moras (Argentina), S.J. de Oliveira (Brasil), J. Pereira (Argentina), J. Pistani (Argentina), B. Ruksan (Argentina), B. Rutter (Argentina), E. Smitsaart (Argentina), J. Troiano (Argentina), C. Carfagnini (Argentina), J. de Filippo (Argentina), C. Machado (Argentina), I. Sommerfelt (Argentina), C. Lerena (Argentina).

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones. Asimismo, reflejará las actividades académicas de postgrado, de extensión y de educación a distancia que se desarrollan en esta Casa de Estudio.

The Journal ANALECTA VETERINARIA is a biannual publication of the College of Veterinary Sciences of the National University of La Plata, Argentina. It is dedicated to the diffusion of scientific reports in the field of the Veterinary Sciences, generated in this and in other institutions. Also, it will reflect the academic activities of graduate school, of extension and of distance education that they are developed in this College.

ISSN 0365514-8 Versión Impresa

ISSN 1514259-0 Versión Electrónica

ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: CC 296 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

Las opiniones expresadas por los autores que contribuyen a esta revista no reflejan necesariamente las opiniones de este medio, ni de las entidades que la auspician o de las instituciones a que pertenecen los autores.

Queda prohibida la reproducción total o parcial por cualquier metodología actual o a crearse del material impreso en esta revista sin el consentimiento expreso del Editor. Autorizada la reproducción con fines académicos-docentes mencionando la fuente. El uso de nombres comerciales está destinado únicamente para la identificación y no implica el respaldo directo o indirecto de los Ministerios de la Nación Argentina ni de los países respectivos de donde provengan los trabajos. Tampoco se garantizan ni respaldan los productos promocionados en los avisos de publicidad.

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

Si tiene acceso a INTERNET, puede recuperar la revista electrónicamente y en forma gratuita mediante el protocolo de traslado de archivo (File Transfer Protocol) (FTP anónimo). Los números de la revista a partir del Volumen 18 están disponibles en formato de archivo: pdf (Portable Document File-Adobe Acrobat Reader®) siendo idéntica a la versión impresa de la revista y puede imprimirse en cualquier impresora que permita diferenciar escala de grises o colores. Se recomienda que la misma posea un resolución mínima de 600 x 600 dpi.

Dirección electrónica:

Puede recuperar la revista accediendo a la página en la Web
<http://www.fcv.unlp.edu.ar>

Para más información sobre cómo recibir ANALECTA VETERINARIA electrónicamente, enviar un e-mail a la dirección: analecta@fcv.unlp.edu.ar

Si tiene dificultades para recuperar la revista electrónicamente envíe un mail a:
sgcorva@fcv.unlp.edu.ar

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX
(www.latindex.unam.mx),

Ulrich's International Periodicals Directory
(www.ulrichsweb.com)

Zoological Records
(www.biosis.org.uk/products_services/zrss.html).

Citación de la versión electrónica: La citación de los artículos aparecidos en la versión electrónica de ANALECTA VETERINARIA (VE) debería seguirse según el siguiente ejemplo:

Costa E.F. y col. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por Hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta Veterinaria* (VE) 1998; 18,1/2: 7-13 (7 pantallas). Recuperable de www.fcv.unlp.edu.ar

Citación de la versión CD-ROM: La citación de los artículos aparecidos en la versión en CD-ROM de ANALECTA VETERINARIA (CD-ROM) debería seguirse según el siguiente ejemplo:

Tittarelli C.M. y col. Efecto de las lluvias sobre la composición mineral de gramíneas y *Lotus glaber mill* del partido de Magdalena. *Analecta Veterinaria* (CD-ROM) 2001; 21,1: 54-57 (4 pantallas).

Impresión

Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata
CC296 (B1900AVW) La Plata,
Buenos Aires, Argentina

Diseño

Prof.Dr. Nestor Oscar Stanchi

**Todos los trabajos publicados en
ANALECTA VETERINARIA son sometidos
a revisores externos**

**All articles published in
ANALECTA VETERINARIA
are submitted to external
scientific reviewers**



Impreso en papel libre de ácido
Printed in acid-free paper

Impreso en Argentina
Printed in Argentina

Se solicita canje - On demande l'échange - We ask for exchange - Si prega lo scambio - Man bitter um austauch

Artículos de Investigación

Research articles

- READY TO EAT SALADS. AN ANALYSIS OF HEALTH AND SAFETY CONDITIONS. Ensaladas listas para consumo. Análisis de condiciones de higiene y seguridad. K Pellicer, J Copes, L Malvestiti, G Echeverría, E Nosetto, N Stanchi.** 4-6

Artículos de Revisión

Review articles

- METABOLISMO Y DEFICIENCIA DE COBRE EN LOS BOVINOS. Copper metabolism and deficiency in cattle. DE Rosa, GA Mattioli.** 7-16

- LA RABIA URBANA EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA: ORIGEN-EVOLUCIÓN-ACTUALIDAD. The urban rabies in the province of Buenos Aires, Argentina: Origin-evolution-present time. CF Amasino, CJ Garbi, MF Amasino.** 17-31

- CRIBADO ANTIHELMÍNTICO PRIMARIO: SISTEMAS PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD NEMATOCIDA IN VITRO. Primary anthelmintic screening: systems for the evaluation of *in vitro* anthelmintic activity. MM Martínez Grueiro.** 32-49

Comunicaciones breves

Short communications

- ENDOCARDITIS VERRUCOSA VENTRICULAR IZQUIERDA. Left vegetans valvular endocarditis. D Arias, M Tortora, A Cruz, L Klima, R Rodríguez, A Massone, N Stanchi.** 50-52

- ACCIÓN DE FINASTERIDE SOBRE EL VOLUMEN PROSTÁTICO EN CANINOS CON HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA. Effect of finasteride on prostatic volume in canine prostatic hypertrophy. MA Stornelli, MC Stornelli, RR Rodriguez, C Scodellaro, CA Savignone.** 53-57

READY TO EAT SALADS AN ANALYSIS OF HEALTH AND SAFETY CONDITIONS

K Pellicer¹, J Copes¹, L Malvestiti¹, G Echeverría³,
E Nosetto³, N Stanchi²

¹Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. ²Cátedra de Microbiología y Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas (LADIB), ³Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

ABSTRACT: Fifty ready to eat salads bought in markets in La Plata (Argentina) have been microbiologically analyzed. It has been found that 88 % had an average of 540 cfu/g faecal coliform bacteria, 64 % had *Escherichia coli*. No isolation of *E.coli* O:157H:7 was achieved. On the other hand there was only one isolation of *Listeria monocytogenes* type 4 (2 %). Therefore 88 % of fresh cut salad did not meet the health and safety conditions required for human consumption.

Key Words: *Listeria*, *Escherichia coli*, ready to eat salads.

ENSALADAS LISTAS PARA CONSUMO. ANÁLISIS DE CONDICIONES DE HIGIENE Y SEGURIDAD

RESUMEN: Cincuenta ensaladas listas para consumo compradas en mercados de La Plata (Argentina) fueron analizadas microbiológicamente. Se ha encontrado que el 88% tenían un promedio de 540 ufc/g de bacterias coliformes fecales, 64 % tenían *Escherichia coli*. Ningún aislamiento de *E.coli* O:157H:7 fue logrado. Por otro lado sólo se logró un aislamiento de *Listeria monocytogenes* tipo 4 (2 %). Por consiguiente, el 88% de las ensaladas cortadas frescas no se encontró en condiciones de higiene y seguridad requeridas para el consumo humano.

Palabras clave: *Listeria*, *Escherichia coli*, ensaladas lista para consumo.

Fecha de recepción: 22/10/01

Fecha de aprobación: 11/07/02

Dirección para correspondencia: Julio Copes. Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA
E-mail: jcopes@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCTION

During recent years there has been an increasing emphasis on the importance of the consumption of fresh vegetables for the healthy diet. This type of food can be dangerous to consumers health if safety measures are not strictly complied with at the time of preparation. In these cases, contamination can be caused by animal manure and contaminated irrigation water. Several authors make reference to the presence of bacteria (*E. coli*, *Listeria monocytogenes*) and illness outbreak have been associated to the consumption of raw vegetables such as cabbage, lettuce, tomato, etc. (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

The symptom of the disease range from a mild flu-like illness to severe septicaemia, diarrhoea, hemorrhagic syndrome, particularly in children and immunosuppressed; infection during pregnancy can result in abortion, stillbirth or birth of a severely affected baby (*Listeria*).

Considering the particularities of this food (ready to eat products) that is dedicated to their consumption without a washing or later cooking a microbiological analysis has been carried out to determine the conditions of aptitude of these products.

It has been found in that the whole population (not only children, elderly people, pregnant women, and people with immunology problems) are consumers of this type of foods and they don't wash it because the own label (in general) indicate that it is ready to eat.

MATERIAL AND METHODS

Several types of salads ready to eat in the original recipients were subject to microbiological analysis.

Fifty salads of different types were bought randomly in duly authorized markets paying special attention to the good state of their wrappings. Fifty four per cent of the products (27 out of 50) were labelled and elaboration date was specified. Forty six per cent (23 out of 50) showed no information at all. Sixty per cent (30 out 50) were displayed in refrigerators. None of the recipients had "best before" recommendations.

Three samples of 25 g denominated A, B, and C were taken from each salad. Sample A was homogenized in culture broth with tryptone (0.1 %) and sodium chloride (0.85 %) (12) in a 1/100 dilution and it was inoculated for the Most Probable

Number (MPN) method for faecal coliform bacteria count. Sample B was used for *Escherichia coli* investigation (spp. and O:157H:7) according to Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (13). Sample C was used to determine the presence of *Listeria monocytogenes*. Briefly, the primary enrichment was inoculated in Bleb (Buffered *Listeria* enrichment broth-Oxoid), the secondary one was also inoculated in Bleb. Finally both were inoculated in PALCAM (Oxoid). After colony identification, biochemical procedures were carried out. The serological procedures were carried out in Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbran" (INEI/ANLIS), using commercial antisera for serotype 1 and 4 (French Pasteur Institute).

RESULTS

Faecal coliform bacteria findings are shown in Table 1. Eighty eight per cent of the analyzed products (44 out of 50) were positive. The average was 540 cfu/g, including the six negative samples. Eighteen per cent of the samples (9 out of 50) showed extreme values (>2400 cfu/g).

E. coli was isolated from 34 out of 50 products (68 %). All the inoculated colonies fermented the sorbitol in Mc. Conkey sorbitol solid culture (Britania) therefore the absence of *E. coli* O:157 H:7 was assumed.

Only one strain (2 %) developed characteristics of the genus *Listeria* in Palcam agar. This strain showed motility at 22 °C, was positive to esculin bile, developed in 6,5 % NaCl and fermented Kigler culture as expected. CAMP test result was identical to that of *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115. Serological test characterized the isolated strain as type 4.

DISCUSSION

This study show that 88 % of the products analyzed (44 out of 50) did not meet the health and safety conditions to be considered suitable for consumption, owing to the faecal coliform bacteria found. In the case of genus *Listeria* bacteria findings are different from those shown by Monge *et al* (1999); they found that 32 % of the products contaminated with *Listeria* spp. and 8 % with *L. monocytogenes*. On the other hand, 44 % of fresh cut and prepared salad vegetables in the Netherlands were positive (14) whereas in our study only 2 % of the salads (1 out of 50) were contaminated with *L. monocytogenes*.

Ready to eat salads expended in La Plata

Table 1: Most Probable Number findings for faecal coliform bacteria in different kinds of salads.

Tabla 1: Número más probable hallado de bacterias coliformes fecales en diferentes tipos de ensaladas

Trademark	Elaboration date	Refrigerated	MPN/g faecal coliform bacteria	Amount of salads
Yes	Yes	No	>2400 cfu/g	6
No	No	Yes	>2400 cfu/g	3
Yes	Yes	Yes	From 1100 to 240 cfu/g	6
No	No	Yes	From < 240 to 4 cfu/g	20
Yes	Yes	No	From < 240 to 4 cfu/g	9
Yes	Yes	Yes	Negative	6

markets have shown that microbiological control, application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) systems, and the education of people involved in the preparation and selling of the products are of major importance since such products are consumed without undergoing any kind of processing. In addition to these approach, increasing attention to sanitation, hygiene and the application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) procedures during manufacturing practices should help to reduce the risk of health to eat salads.

REFERENCES

- 1.-Rodríguez RH. La Higiene de los Alimentos y la Salud Humana: Significación de los productos de Origen Animal. Seminario Internacional. Enf. Trans. por Alimentos. Su importancia en la Industria y la Salud Pública. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Bs As. (Argentina). 1998; p:51-62.
- 2.-Norrung B, Andersen JK, Schulndt J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. Int J Food Microbiol 1999. 53 (2-3): 195-203.
- 3.-HACCP and Hygienic Design. Seminario hacia el siglo XXI en el control de los Alimentos. Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. Servicio Nacional de Sanidad Animal. Buenos Aires (Argentina). 1995.
- 4.-Rivas M. El laboratorio en el diagnóstico de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Seminario Internacional. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Su importancia en la Industria y la Salud Pública. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Bs. As. (Argentina). 1998; p. 71-83.
- 5.-Voyer L. Síndrome Urémico Hemolítico. Clínica, Epidemiología y Hábitos Alimentarios en Argentina. Seminario Internacional. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Su importancia en la Industria y la Salud Pública. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Bs. As. Argentina. 84-100; 1998.
- 6.-Monge R, Arias-Echandi M. Presence of *Listeria monocytogenes* in fresh salad vegetables. Rev Biomed 1999; 10: 29-31.
- 7.-Brackett RE. Presence and Persistence of *Listeria monocytogenes* in Food and Water. *Listeria monocytogenes* a Foodborne Pathogen. Overview Outstanding Symposia in Food Science & Technology Food Technol. 1988; 42:162-164.
- 8.-Doyle MP. Effect of Environmental and Processing Conditions on *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* a Foodborne Pathogen. Overview Outstanding Symposia in Food Science & Technology. Food Technol. 1988; 42:169-171.
- 9.-Slustker L, Altekruze S, Swedlow D. Foodborne diseases. Emerg Pathog Emerg Trends Infec Dis Clin of North America. 1998; 12:199-216.
- 10.-Altekruze S, Swedlow DL, Wells SJ. Factors in the Emergence of Food Borne Diseases. Vet Clin of North America. Food Animal Practice. 1998; 14: 1-15.
- 11.-Copes J, Pellicer K, Echeverria MG, Stanchi N, Martinez C, Leardini N,. Investigación de *Listeria monocytogenes* en quesos de pasta blanda. Rev Arg de Microbiol. 2000; 32:49-52.
- 12.-Mossel DAA, Moreno Garcia B. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. Ed. Acribia S.A. ISBN 84-200-0561-4. Zaragoza (España). 1985.
- 13.-Microbiological Methods. Official Methods 996.09 *E. coli* 0157:H7 in selected foods. In: Association of Official Analytical Chemists International. Chapter 18, 1995; p: 218.
- 14.-Pitt W, Harden T, Hull R. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. The Australian Journal of Dairy Technology. 1999; 54: 44-65.

METABOLISMO Y DEFICIENCIA DE COBRE EN LOS BOVINOS

DE Rosa¹, GA Mattioli^{1,2}

¹Cátedra de Fisiología; ² Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE)
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: En el bovino el Cu se absorbe a nivel intestinal y es depositado en el hígado, desde donde se distribuye vía sanguínea hacia los tejidos, para ser incorporado a metaloenzimas dependientes de Cu. El Cu endógeno se elimina principalmente por bilis y secundariamente por leche y orina. Durante la gestación es importante la transferencia de Cu al feto. Los animales en crecimiento y las hembras gestantes poseen los mayores requerimientos. Los signos clínicos de la hipocuprosis son variados y de importancia productiva, incluyendo menores ganancias diarias de peso, menor resistencia a infecciones y trastornos reproductivos. Estos signos obedecen a daños bioquímicos que precedidos por disminuciones en las concentraciones hepáticas y plasmáticas de Cu, obedecen a una menor actividad enzimática. Estos cambios definen las etapas de la enfermedad y son empleados en el diagnóstico de la deficiencia. La hipocuprosis puede ser simple o condicionada por elevadas concentraciones de Mo, Fe o S en la dieta. Al tener incidencia geográfica, esta deficiencia puede ser caracterizada en una zona por la asociación suelo-planta-animal.

Palabras clave: Cobre, bovinos, metabolismo, hipocuprosis, diagnóstico.

COPPER METABOLISM AND DEFICIENCY IN CATTLE

Abstract: In cattle Cu is absorbed in intestine, then is transported to liver, which transfer it by blood to tissues, where Cu is bound to Cu-dependent metalloenzymes. The most active excretion occur via the bilis, and small amount are excreted through urine and milk. During pregnancy take place an important transfer to fetus. Growing and pregnant animals have higher Cu requirements. Signs of Cu deficiency are varied and has productive consequences, including lower growth, immune and reproduction efficiency. These signs are due to biochemical damages, which are preceded by reduction of liver and plasma Cu concentrations and Cu enzyme activities, which can be used to identify the phases of Cu deficiency and therefore support the diagnosis. Hypocuprosis can occur as a single deficiency or conditioned by the presence of high dietary Mo, Fe or S concentrations. Copper deficiency has a geographical incidence and can be characterized into the affected area by the soil-plant-animal relationship.

Key Words: Copper, cattle, metabolism, hypocuprosis, diagnostic.

Fecha de recepción: 23/12/00

Fecha de aprobación: 17/07/02

Dirección para correspondencia: D.E.Rosa, Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: mattioli@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La hipocuprosis es una de las carencias minerales más frecuentes en el mundo (1). Considerando que el correcto control de esta deficiencia depende de conocer conceptos previos sobre el tema, en este trabajo se revisará la homeostasis del Cu en el bovino y los aspectos sobresalientes de la enfermedad, incluyendo sus causas, consecuencias y posibilidades de diagnóstico.

I - Metabolismo del Cobre en los bovinos

I.1. Absorción, almacenamiento y transporte

Si bien los monogástricos absorben el 30 y hasta el 50 % del Cu presente en la dieta, en los rumiantes el porcentaje de absorción es menor. Esto se debería en parte al ambiente reductor del rumen que produce, por un lado, la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} , el cual es más difícil de absorber (2) y, por otro lado, la formación de sulfuros (S^{-2}) a partir de sulfatos (SO_4^{-2}), los que se combinan con Cu para formar CuS , compuesto altamente insoluble que no puede ser absorbido (3). En vacas Holstein en lactación la absorción de Cu fue estimada en $5,1 \pm 1,5$ % (4). La absorción varía además en función de la raza (5), de la forma química del Cu (6) y de la presencia de factores de interferencia (7).

Ward y col. (5) registraron una mayor absorción aparente de Cu en novillos Angus que en Simmenthal, la cual podría deberse a una mayor excreción biliar de Cu en los últimos (8).

La influencia de la forma química del Cu sobre el porcentaje de absorción queda demostrado en los trabajos de Kegley y Spears (6), quienes en dos experiencias demostraron igual biodisponibilidad del CuSO_4 y de Cu-lisina, mientras que el CuO no era prácticamente absorbido.

Muchos factores son capaces de interferir con la absorción del Cu. Entre los más importantes se hallan las altas concentraciones de molibdeno (Mo), azufre (S), hierro (Fe), calcio (Ca), cadmio (Cd), zinc (Zn), fitatos y ácido ascórbico.

El sitio y especialmente el mecanismo de absorción del Cu en el tracto gastrointestinal no han sido bien establecidos. En términos generales se acepta que la absorción es intestinal, que el intestino grueso tiene mayor importancia en los rumiantes que en los monogástricos y que el retículo-rumen y el abomaso no son sitios de absor-

ción importantes (9).

El Cu ingresa a través del ribete en cepillo del enterocito que lo deposita uniéndolo a metalotioneína (MT), una proteína con 25-30 % de cisteína en cuyos grupos sulfhidrilos ($-\text{SH}_2$) liga metales (Cu, Zn, Cd, Hg). Si bien todos estos metales estimulan la producción de MT en el enterocito, la mayor estimulación la realiza el Zn, el cual es desplazado por el Cu que posee mayor afinidad por la enzima, quedando libre para estimular la síntesis de nueva MT (10). En el duodeno de bovinos la MT es la principal fracción de Cu y tendría dos funciones primordiales, por un lado sería responsable de la captación y almacenaje temporario del Cu hasta su absorción, y por otro lado representa un mecanismo defensivo evitando la captación de cantidades excesivas de Cu u otros metales (11).

Al ingresar al torrente circulatorio el Cu se une principalmente a la albúmina y secundariamente a aminoácidos libres. Ambas fracciones, denominadas cobre de reacción directa (CRD) debido a que reaccionan con el dietiltiocarbamato sin acidificación previa, ceden fácilmente el Cu al hígado (12).

El hígado ha sido reconocido como el principal órgano de depósito de Cu en el organismo, y cumple un rol clave en su metabolismo (9). El $92,5 \pm 5$ % del CRD es captado por el hígado. El resto se distribuye por otros tejidos ($2,9 \pm 0,8$ %), leche ($3,5 \pm 4,5$ %) y orina ($1,5 \pm 0,3$ %) (4). Una vez incorporado al hepatocito, el Cu se almacena unido a la MT y en los lisosomas, para ser utilizado en la síntesis de ceruloplasmina (Cp), previa degradación lisosomal o por intercambio mediado por glutatión (GSH), o bien ser excretado con la bilis (10, 13).

La Cp sintetizada en el hígado se libera hacia el plasma, donde representa el 70 a 95 % del Cu sérico y es la principal fuente de Cu para los tejidos (10). Estudios cinéticos con Cu^{64} en bovinos indican que el 24 % del Cu presente en leche provenía directamente del Cu absorbido en el aparato digestivo (4).

I.2. Acciones fisiológicas

Las metaloenzimas dependientes de Cu más importantes son la Cp, la superóxido dismutasa (SOD), la tirosinasa, la citocromo-c-oxidasa y la monoamino oxidasa o lisil oxidasa.

La Cp es una α -2 globulina sintetizada en el hígado. Es una glucoproteína de PM 132.000 con

6 átomos de Cu por molécula y 7 a 8 % de hidratos de carbono (10). Sus funciones principales son el transporte de Cu desde el hígado a los tejidos (14), acción antioxidante, modulación de la respuesta inflamatoria como proteína de fase aguda en infecciones o estrés, oxidación del Fe^{+2} para que éste pueda ser transportado hasta los tejidos hematopoyéticos por la transferrina y finalmente oxidación de aminas aromáticas (10).

La SOD es una metaloenzima ampliamente distribuida por el organismo. Posee un PM de 34.000 con 2 átomos de Cu y 2 de Zn por molécula. Así como la Cp es importante como antioxidante plasmático, la SOD actúa como principal antioxidante intracelular. Su función es inactivar los iones superóxidos con la producción de peróxido de hidrógeno y oxígeno. El peróxido de hidrógeno, aún tóxico, es inactivado por las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (14).

La tirosinasa participa en la oxidación del aminoácido tirosina, paso metabólico involucrado en la formación de melanina. Por ello, la ausencia congénita de esta enzima causa albinismo. Los pasos iniciales de formación de melanina son también comunes a la formación de adrenalina y noradrenalina (15).

La citocromo-c-oxidasa es un complejo que contiene los citocromos a y a3 de la cadena respiratoria, posee dos átomos de Cu además de dos grupos hemo con sus respectivos átomos de Fe. Representa la enzima terminal de la cadena respiratoria y cataliza la transferencia de 4 electrones al O_2 para formar 2 moléculas de agua y ATP. Su ubicuidad y función para la obtención de energía hacen que esta enzima sea vital para el animal.

Se han identificado varios tipos de monoamino oxidasas en el organismo. Ubicadas en la membrana mitocondrial externa, se encargan de producir la desaminación oxidativa de diversas monoaminas como adrenalina, noradrenalina, tiramina, triptamina y serotonina (15). Una enzima similar, denominada lisil oxidasa, se encarga de producir la desaminación oxidativa de residuos de lisina en las fibras de colágeno y elastina. Esta reacción permite la formación de puentes cruzados en el colágeno y la elastina, los cuales otorgan la resistencia mecánica y las características funcionales de estas fibras (16).

I.3. Vías de eliminación

La bilis es la principal vía de excreción del Cu absorbido. Los lisosomas serían los encarga-

dos de tomar el Cu y volcarlo a la bilis posiblemente por exocitosis (2). Buckley (4) registró una pérdida diaria de Cu por bilis del 0,87 % del Cu hepático en vacas Holstein en lactación, y estos valores coinciden con los encontrados por Charmley y col. (17) en novillos Friesian. Sin embargo, la excreción biliar de Cu varía entre razas. Gooneratne y col. (8) demuestran que vaquillonas Simmenthal excretan el doble de Cu por bilis que vaquillonas Angus, mientras que en ambas razas la excreción biliar se eleva al aumentar la concentración de Cu en la dieta. La propia bilis limita la reabsorción del Cu por lo cual la mayor parte de éste se pierde por heces (10).

Durante la gestación, la madre, transfiere al hígado fetal una gran cantidad de Cu, de modo que al nacer el ternero posee una concentración hepática hasta 300 ppm mayor a la de su madre, expresada sobre materia seca (MS). La concentración hepática de Cu en el feto depende del período de gestación, creciendo en forma exponencial, y de la concentración hepática de la madre. Cuando ésta es inferior a 25 ppm (MS) el depósito hepático fetal se reduce significativamente (18). La transferencia masiva de Cu al feto es posiblemente una adaptación fisiológica para compensar la baja concentración de Cu en la leche. Esta posee alrededor de 0.15 mg de Cu por litro (1) y puede disminuir en estados de deficiencia, pero no se incrementa más allá del rango normal al aumentar el aporte de Cu en la dieta (19).

Una pequeña cantidad de Cu se excreta por orina. Buckley (4) registró una pérdida por esta vía de 0,24 mg por día en bovinos que absorben 11,8 mg de Cu. Ward y col. (5) informan que la pérdida de Cu por orina representa alrededor del 1 % de Cu ingerido.

I.4. Requerimientos de Cu

Los requerimientos netos de Cu en un rumiante incluyen aquellos de mantenimiento, que sirven para compensar las pérdidas endógenas, sumados a los de producción (crecimiento, gestación o lactancia). Estos requerimientos indican la cantidad de Cu que debe ser absorbido, por lo cual la dieta debe aportar una cantidad mayor, que se conoce como requerimiento bruto. El requerimiento bruto debe ser cubierto con la dieta. Asumiendo un coeficiente de absorción bajo (3 %), Suttle (20) estimó que la dieta de terneros debe contener entre 6,2 y 7,5 ppm de Cu (MS), según la edad y el ritmo de crecimiento. Sin embargo, Mills y col. (21) debieron elevar de 8 a 15 ppm (MS) la concentración de Cu en la dieta para evitar signos clínicos de hipocuprosis en animales

en crecimiento. En adultos, los requerimientos aumentan en la gestación (9) y no tanto en la lactancia, por la baja concentración de Cu en la leche. El National Research Council (NRC) (22) recomienda una concentración de Cu en la dieta de 8 ppm (MS) para todas las categorías de bovinos de carne.

II - Deficiencia de Cu en bovinos

La hipocuprosis bovina se presenta en muchas partes del mundo y bajo diferentes condiciones (1).

II.1. Tipos de deficiencia

Como otras deficiencias minerales, la hipocuprosis puede ser causada por un bajo aporte del elemento en la dieta, denominándose en este caso deficiencia simple o primaria, o bien puede ocurrir que el aporte de Cu sea adecuado pero otros factores de la dieta interfieran con el aprovechamiento del Cu ingerido, en cuyo caso se habla de deficiencia condicionada o secundaria.

II.2. Factores responsables de la deficiencia condicionada

El Mo ha sido el factor de interferencia más estudiado, posiblemente por ser el responsable de los cuadros más graves de hipocuprosis y los primeros en ser registrados (23, 24). El Mo provoca su interferencia interactuando con el S ingerido, el cual se convierte a nivel ruminal en sulfuro, que al unirse al Mo forma tiomolibdatos (TMs). Según el número de átomos de S en la molécula, los TMs se denominan mono, di, tri o tetra tiomolibdatos. Los dos últimos complejan al Cu y se unen a material particulado y a proteínas de alto peso molecular, perjudicando su absorción (25). Parte de los TMs son absorbidos en intestino y ejercen un efecto sistémico sobre el organismo. A nivel plasmático complejan al Cu y lo unen a la albúmina en una posición anómala, creando una fracción de Cu plasmático que ya no es disponible para los tejidos. Por otra parte, los TMs absorbidos aumentan las pérdidas orgánicas de Cu principalmente por bilis y secundariamente por orina (26). La interferencia del Mo parece depender, más que de su concentración absoluta en la dieta, de la relación Cu:Mo y se ha sugerido que ésta debe ser mayor a 2:1 para evitar la deficiencia condicionada (23).

Aún con bajas concentraciones de Mo, el S por sí solo puede interferir con la absorción de Cu. El mecanismo de interferencia sería la formación de sulfuros de Cu (CuS) insolubles en el rumen y el abomaso, los cuales no pueden ser ab-

sorbidos (3). Se considera que una concentración de S en la dieta superior al 0,3 % (MS) ya contribuye a la deficiencia (27). Viejo y col. (28) detectaron bajas cupremias, menores ganancias de peso y signos clínicos de hipocuprosis en terneros que consumían un forraje con cantidades adecuadas de Cu ($7,7 \pm 0,9$) y Mo ($1,2 \pm 0,5$) pero con altos contenidos de S ($0,6 \pm 0,09$ %). El agua de bebida puede ser una fuente importante de S. Smart y col. (29) provocaron la deficiencia con una concentración de S en el agua de 500 mg/l, a pesar de que la dieta poseía cantidades adecuadas de Cu (10 ppm) y buena relación Cu:Mo (4:1).

Se han propuesto fórmulas para predecir la cantidad de Cu de la dieta que será absorbida, teniendo en cuenta las interferencias del Mo y del S (1).

Varios trabajos han demostrado que altas concentraciones de Fe en la dieta reducen las concentraciones de Cu hepático y plasmático. Estos efectos se han informado con concentraciones de Fe de 581 y 1200 ppm (MS) (30), 800 ppm (MS) (31), 600 ppm (MS) (32) y con apenas 250 ppm (MS) (33). El mecanismo exacto de interferencia del Fe no ha sido bien aclarado, pero podría estar relacionado con la formación de sulfuros de Fe en el rumen, que se solubilizan en el abomaso favoreciendo la formación de CuS, no disponibles para su absorción (34).

II.3. Patogenia

El animal expuesto a un balance negativo de Cu pasa por una serie de fases o etapas sucesivas que terminan en el cuadro clínico de hipocuprosis.

La primera etapa, denominada de depleción, comienza cuando la dieta no cubre los requerimientos del organismo, el cual comienza a mantener el aporte de Cu a los tejidos gastando su depósito hepático. Por esta razón, la etapa de depleción cursa sin signos clínicos y sólo es evidente en ella una disminución de la concentración hepática de Cu.

La etapa de deficiencia se inicia cuando las reservas hepáticas comienzan a agotarse y ya no pueden mantener niveles normales de Cu en sangre ($> 60 \mu\text{g}/\text{dl}$), por lo cual esta etapa se caracteriza por la aparición de la hipocupremia.

Finalmente, cuando el aporte sanguíneo de Cu a los tejidos sigue disminuyendo se produce la etapa de disfunción, en la cual las enzimas tisulares Cu dependientes se ven afectadas en su fun-

cionamiento, causando daños bioquímicos que conducen a la aparición de los signos clínicos de la hipocuprosis (20).

II.4. Signos clínicos asociados a la hipocuprosis

Debido a que varias enzimas Cu dependientes pueden verse afectadas en la etapa de disfunción, la signología clínica relacionada con la hipocuprosis es variada, incluyendo alteraciones del pelaje, diarrea, desórdenes cardiovasculares, trastornos óseos y articulares, menor desarrollo corporal, anemia, menor resistencia a las infecciones y alteraciones en la reproducción.

Las alteraciones del pelaje incluyen cambios de color y aspecto. La acromotriquia (despigmentación del pelaje) es un signo característico de la deficiencia, que se manifiesta con un tono gris en zonas oscuras y que suele ser evidente alrededor de los ojos (anteojeras). Según Underwood (19), la acromotriquia suele ser el primer signo clínico de la deficiencia, presentándose cuando aún el aporte de Cu a los tejidos es suficiente para prevenir otros signos. Este concepto se ha generalizado y ello representa un riesgo, debido a que ciertos animales llegan a presentar graves signos clínicos antes de que la acromotriquia se haga evidente (21). Existe un acuerdo general en aceptar que las alteraciones en el pelaje se deben a la menor actividad de la enzima tirosinasa (1).

La diarrea es otro signo asociado a la hipocuprosis. Si bien se presenta con más frecuencia en casos de deficiencia condicionada por exceso de Mo, también se asocia a deficiencia simple de Cu (21). La evaluación ultramicroscópica de las vellosidades intestinales de animales hipocuprosos con diarrea, revela que existen marcadas alteraciones a nivel mitocondrial, asociadas a una disminución en la actividad de la citocromo-c-oxidasa en todo el intestino delgado. La evidencia de que la falta de Cu a nivel intestinal es la responsable de la diarrea es su rápida remisión cuando se administra una dosis baja de Cu por vía oral (10mg), la cual no logra revertir otros signos clínicos de hipocuprosis, ni tampoco elevar los niveles de Cu plasmático (21).

El antecedente más importante de desórdenes cardiovasculares en bovinos con hipocuprosis es la denominada *Falling disease* o enfermedad de las caídas, que se presenta en el oeste de Australia cuando los animales consumen forrajes con bajo contenido de Cu (1-3 ppm). La lesión consiste básicamente en una degeneración progresi-

va del miocardio con fibrosis reemplazante, que conduce a muerte súbita por falla cardíaca ante un estrés o ejercicio moderado (19). Leigh (35) observó hipertrofia cardíaca en novillos con hipocuprosis, asociada a alteraciones mitocondriales.

Mills y col (21) informaron alteraciones vasculares en terneros con hipocuprosis, especialmente en un animal que murió por ruptura de la vena cava posterior. Estas lesiones se deberían a una elastogénesis defectuosa causada por la menor actividad de la enzima lisil oxidasa.

Los desórdenes óseos y articulares se presentan en casos de hipocuprosis extrema y especialmente en animales jóvenes. Se manifiestan con deformaciones articulares en el tarso, metatarso, carpo y metacarpo, claudicaciones y debilidad ósea que provoca fracturas espontáneas, especialmente de costillas. Las lesiones óseas incluyen rarefacción y adelgazamiento del hueso cortical en húmero, fémur, tibia, radio, metacarpo y metatarso. El tejido óseo presenta osteoporosis, con disminución de la actividad osteoblástica y con actividad osteoclástica normal. A nivel epifisiario se observa osificación demorada del cartílago calcificado, adelgazamiento cortical y deficiencia del hueso trabecular (21, 36). La lesión bioquímica primaria a nivel óseo es probablemente la menor actividad de la enzima lisil oxidasa (19).

La anemia se presenta en casi todas las especies con hipocuprosis severa (19), sin embargo es poco frecuente en bovinos (30, 31, 32). La causa de la anemia se relaciona con la menor actividad ferroxidasa de la Cp, lo cual concuerda con un aumento en la concentración hepática de Fe (21). Otra causa puede ser la reducción de la vida media de los eritrocitos debido a la disminución en la actividad de la SOD eritrocitaria durante la hipocuprosis (9).

La menor resistencia a infecciones se considera como una de las consecuencias de la hipocuprosis. Sin embargo, y a pesar de los numerosos trabajos al respecto, sólo puede afirmarse que existen fundamentos para esta asociación sin que realmente haya sido demostrada. Los primeros resultados al respecto se obtuvieron en corderos de razas y líneas genéticas más sensibles a la hipocuprosis, en los que aumentó el número de muertes por infecciones (37). Trabajos experimentales en bovinos con hipocuprosis inducida, demostraron que ésta se asocia con linfopenia, especialmente del grupo B, y monocitosis (38), con menor producción de anticuerpos contra eritrocitos porcinos (39), y disminución de la capacidad

fagocítica y lítica de los neutrófilos (38).

Las alteraciones reproductivas en bovinos parecen relacionarse especialmente con hipocuprosis secundaria por exceso de Mo. La presencia de Mo, más que la carencia de Cu, parece ser la responsable de la menor fertilidad en bovinos, causando demoras en la pubertad, menor tasa de concepción y alteraciones del ciclo estral. Los mecanismos no son claros, pero los bovinos suplementados con Mo presentan una menor liberación de hormona luteinizante (40). En ratas deficientes en Cu se demostró que dietas ricas en Mo reducen los picos de hormona folículo estimulante y la secreción de estrógenos, mientras que sólo este último efecto se observó en los animales con deficiencia simple de Cu. Esto parece indicar que estarían involucrados diferentes mecanismos (41).

Si bien las lesiones causadas por una hipocuprosis severa alteran claramente el estado general de los animales, una menor ganancia diaria de peso puede ser la alteración clínica más importante ya que puede pasar desapercibida a menos que los animales sean pesados regularmente. De la recopilación de resultados en 23 ensayos dosis-respuesta quedó evidenciado que las menores ganancias diarias de peso se presentaban en aquellos casos debidos a exceso de Mo en la dieta (23). Esto creó la idea de un efecto propio del Mo. Sin embargo, la reproducción experimental de la deficiencia simple también causó alteraciones en el crecimiento (21). En ambos casos, la menor ganancia diaria de peso se debería a un menor consumo de alimento y a una menor conversión alimenticia (21, 31).

II.5. Diagnóstico

El diagnóstico de la hipocuprosis puede plantearse bajo dos aspectos diferentes: por un lado, cuando se busca identificar la deficiencia en los animales y por otro lado cuando se quieren conocer las causas que la provocan. El primero permite conocer el balance de Cu en los animales en estudio, mientras que el segundo incluye estudios medio-ambientales que identifican las zonas de riesgo y caracterizan el comportamiento epidemiológico de la enfermedad.

II.5.1. Diagnóstico de la deficiencia en animales afectados

No se ha identificado un parámetro preciso que indique el momento exacto en que los animales comienzan a sufrir las alteraciones clínicas o subclínicas de la hipocuprosis. Por ello se emplean las concentraciones de Cu en hígado y en plasma

como indicadores indirectos, y la actividad de varias cuproenzimas como indicadores directos del desbalance (42).

La concentración hepática de Cu es el primer parámetro afectado (etapa de depleción). Su concentración normal es de 100 a 400 ppm sobre base seca (MS) y guarda una relación lineal con la absorción intestinal cuando la dieta cubre los requerimientos (1, 19, 20, 43). Esto hace del Cu hepático un buen indicador de depósito, pero un insensible indicador de deficiencia (42, 43). Esto queda de manifiesto en las diferentes concentraciones hepáticas sugeridas como indicadores de pérdidas productivas. Mientras Ammerman (43) sostiene que los signos clínicos de hipocuprosis en bovinos se presentan con concentraciones hepáticas inferiores a 25 ppm, Lewis y col. (53) postulan un umbral de 30 ppm, Humphries y col. (31) obtienen respuestas en la ganancia diaria de peso en terneros con menos de 5 ppm, Mills y col. (21) con menos de 15 ppm, Viejo y Casaro (28) con 44 y 33 ppm, mientras que Suttle (42) postula que la disfunción se presenta con menos de 5 ppm, todas expresadas como MS. La obtención de la muestra se realiza por biopsia hepática (44), por lo cual el análisis de Cu hepático es un auxiliar útil y necesario en trabajos experimentales, pero de uso más limitado en diagnóstico de rutina.

El análisis de cupremia es un indicador sensible de la etapa de deficiencia. Cuando existe molibdenosis las cupremias pueden ser engañosamente elevadas por complejos de Cu y Mo no disponibles, pero estos pueden descartarse tratando el plasma con ácido tricloroacético (45). Otra alternativa es la medición de la actividad de Cp, que representa del 70 al 90 % de Cu plasmático (45). Debido a que el muestreo de sangre es rápido y sencillo es de elección en diagnósticos de rutina y estudios poblacionales (46). La cupremia no es un indicador directo de daño, pero debido a que la hipocupremia se profundiza durante el desbalance puede emplearse su valor predictivo. Para ello resulta útil subdividir los valores de cupremia en tres rangos: por encima de 60 µg/dl (normocupremia), entre 60 y 30 µg/dl (hipocupremia leve) y aquellos menores de 30 µg/dl (hipocupremia severa). La normocupremia sugiere que los animales no se hallan expuestos al desbalance (salvo en molibdenosis donde pueden coexistir normocupremias y signos de deficiencia). La hipocupremia leve, en cambio, es indicativa de que la reserva hepática de Cu ya no es capaz de mantener el nivel plasmático normal, pero posiblemente no se vean afectadas las enzimas Cu dependientes a nivel tisular.

lar, debido a que los animales no suelen mostrar signos clínicos importantes de la enfermedad ni responden a la suplementación con Cu en los ensayos dosis-respuesta (47). La hipocupremia severa es indicativa de un desbalance de Cu más importante, con la posibilidad de que si se mantiene lo suficiente exista ahora un compromiso enzimático, debido a que con valores inferiores a 30 µg/dl se presentan las consecuencias de la enfermedad (20). Han sido exitosos ensayos dosis-respuesta en grupos con hipocupremia severa, de 19 µg/dl (31), menores de 18 µg/dl (32), de 2 a 12 µg/dl (48) y menores de 30 µg/dl (28). El empleo de rangos de cupremia aumenta su valor diagnóstico, aunque no se ha hallado un valor exacto de cupremia que asegure una respuesta a la suplementación con Cu.

La menor actividad de las enzimas Cu dependientes es un indicador directo de la etapa de disfunción que llevarán a las manifestaciones de la hipocuprosis (1). Sin embargo, existen varios inconvenientes para utilizarlas con fines diagnósticos. Por un lado, la etiología de los signos clínicos es muchas veces compleja y el rol de las enzimas específicas no es siempre claro (9). Por otra parte, detectar menor actividad enzimática no implica un disturbio bioquímico, así por ejemplo la citocromo-c-oxidasa posee una actividad normal que sobrepasa en un 60 % la actividad mínima requerida para mantener el metabolismo oxidativo en el tejido hepático (7). Finalmente, medir la actividad de ciertas enzimas requiere de muestreos altamente invasivos y de técnicas poco sencillas, lo cual suele impedir su utilización con fines diagnósticos de rutina (1, 42). Suttle (42) propone medir la actividad de la SOD eritrocitaria (SOD-e), que al reflejar el balance de Cu en el animal durante la eritropoyesis, desciende más lentamente que la cupremia. Este hecho, por un lado, convierte a la actividad de SOD-e en un marcador de mayor valor predictivo de disfunción y por otro permitiría, junto al análisis de cupremia, inferir la duración del desbalance. El autor advierte sin embargo que la medición de SOD-e no es sencilla de realizar y controlar, siendo de utilidad para facilitar la interpretación de los valores de cupremia, pero no como alternativa en el diagnóstico de rutina.

II.5.2. Caracterización de la hipocuprosis bovina

La hipocuprosis posee una incidencia geográfica debido a que el medio ambiente provoca el desequilibrio en el animal, y éste puede caracterizarse por la asociación suelo-planta-animal. Aunque costosa en tiempo y dinero, la caracterización de la hipocuprosis en una zona permite definir el

desbalance mineral en términos reales, ajustar las medidas de control recomendables y hasta alertar sobre la posible ocurrencia de pérdidas subclínicas (49, 50, 51). Se han empleado en la caracterización de la enfermedad estudios de suelo y de sedimentos de drenaje, relevamientos de forrajes y estudios poblacionales.

II.5.2.1. Estudios de suelo y sedimentos de drenaje

La composición mineral del suelo es en algunas ocasiones un indicador razonablemente exacto de deficiencias potenciales en el ganado (51). Boila y col. (49) asociaron un área de mayor incidencia de hipocuprosis con formaciones geológicas ricas en Mo. Sin embargo, la intrincada red de factores que afectan la disponibilidad del mineral en el suelo, como pH, grado de drenaje y materia orgánica, y las limitaciones metodológicas para estimarla, hacen que la correlación entre la concentración mineral del suelo y el forraje sea generalmente baja (52).

Los sedimentos de los cursos de agua reflejan la composición mineral de los suelos que drenan, y representan un método apropiado para relevar áreas extensas aportando información primaria a bajo costo (51). En el Reino Unido Thornton y col. (53) relacionaron las áreas con excesivo, moderado y bajo Mo en los sedimentos con los niveles de cupremia en los rodeos, y hallaron una clara correlación negativa entre ambos parámetros. Esta metodología es más útil en los países en desarrollo, en los cuales la producción ganadera se basa en el pastoreo extensivo, con bajo o nulo nivel de fertilización y contaminación (51). Resultados obtenidos con esta técnica en 8 países en desarrollo fueron recopilados por el Centro de Medicina Veterinaria Tropical de Inglaterra (54).

II.5.2.2. Relevamientos de forraje

Para establecer la relación planta-animal debe tenerse en cuenta la concentración relativa de los elementos que interaccionan y definen su disponibilidad (Cu-Mo-S-Fe), en relación con los requerimientos del animal (20) y las diferencias causadas por la especie vegetal (71), el estado fenológico de la planta (55), las variaciones estacionales (56) y la contaminación con la tierra (50). A pesar de no contemplar todos los factores mencionados, los trabajos de relevamiento en forrajes han permitido caracterizar la deficiencia de Cu en áreas extensas de Guatemala (52), Canadá (57) y la Argentina (58, 59).

II.5.2.3. Estudios poblacionales

La caracterización de la hipocuprosis en una región ha requerido de trabajos de relevamiento en los bovinos de la zona (49, 58). Debido a que estos trabajos requieren de un muestreo costoso, han sido exitosos dos métodos alternativos: Uno de ellos es el análisis de Cu hepático en muestras tomadas en matadero, identificando la procedencia de los animales, que ha demostrado ser útil para identificar y confirmar zonas con deficiencia (18). Otra alternativa útil ha sido la utilización de muestras de plasma remitidas a centros de diagnóstico con otro fin, como el diagnóstico de brucelosis bovina. La validez de estos dos métodos alternativos puede ser discutida debido a la posibilidad de que los animales hayan sido suplementados y no se cuente con esta información, en cuyo caso los registros de deficiencia pueden ser subestimados.

CONCLUSIONES

Varios aspectos del metabolismo y de la deficiencia de Cu en los bovinos son aún poco conocidos. Quizás la mayor necesidad se centra en definir con mayor precisión las consecuencias de la enfermedad sobre el sistema inmune, la función reproductiva y el crecimiento, los cuales pueden pasar desapercibidos ocasionando pérdidas productivas de importancia. De ello se desprende que sigue siendo una deuda manifiesta la identificación de parámetros que indiquen con exactitud el momento en que estos trastornos comienzan a afectar al rodeo. Mientras tanto, el diagnóstico rutinario deberá basarse en el valor predictivo de los niveles de cupremia cada vez mejor ajustados, y en las mediciones de Cu hepático y de la actividad de enzimas dependientes de Cu.

Por otra parte parece necesario alentar la realización de estudios medio-ambientales que caractericen la enfermedad en las zonas afectadas. Estos permitirán alertar a los profesionales, responsables de la sanidad del rodeo en la región, sobre la existencia y el comportamiento epidemiológico de esta deficiencia, lo cual posibilitará la adopción de medidas sanitarias preventivas sobre una base racional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Underwood EJ, Suttle NF. The Mineral Nutrition of Livestock. CABI Publishing. London. UK. 1999.
2. Nederbragt H, Van den Ingh TSGAM, Wensvoort P. Pathobiology of copper toxicity. *Vet Quat* 1984; 6 (4):179-185
3. Suttle NF. Effects of organic and inorganic sulphur on the availability of dietary copper to sheep. *Br J Nutr*

1974; 32: 559-568

4. Buckley WT. A kinetic model of copper metabolism in lactating dairy cows. *Can J Anim Sci* 1991; 71: 155-166.
5. Ward J D, Spears JW, Gengelbach GP. Differences in copper status and copper metabolism among Angus, Simmenthal, and Charolais cattle. *J Anim Sci* 1995; 73: 571-577.
6. Kegley EB, Spears JW. Bioavailability of feed-grade copper sources (oxide, sulfate, or lysine) in growing cattle. *J Anim Sci* 1994; 72: 2728-2734.
7. Mills CF. Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. London (Inglaterra), 1983; p.1-10.
8. Gooneratne SR, Symonds HW, Bailey JV, Christensen DA. Effects of dietary copper, molybdenum and sulfur on biliary copper and zinc excretion in Simmenthal and Angus cattle. *Can J Anim Sci* 1994; 74: 315-325.
9. Gooneratne SR, Buckley WT, Christensen DA. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Can J Anim Sci* 1989; 69: 819-845.
10. Cousin RJ. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev* 1985, 45 (2): 238-309.
11. Fuentealba YC, Bratton GR. The role of the liver, kidney and duodenum in tolerance in the copper-loaded rat. *Anal Cell Pathol* 1994; 6: 345-358.
12. Evans GW, Wiederanders RE. Blood copper variation among species. *Am J Physiol* 1967; 213 (5): 1183-1185.
13. Fuentealba YC, Davis RW, Elmes ME, Jasani B, Haywood S. Mechanisms of tolerance in the copper-loaded rat liver. *Exp Mol Pathol* 1993; 59: 71-84.
14. Frieden E. Caeruloplasmin: a multifunctional metalloprotein of vertebrate plasma. Biological roles of copper. Ed. Elsevier/North Holland, New York (USA), 1980; p.93-124.
15. Blanco A. Química biológica, 5ta. Edición, Ed. El Ateneo. Buenos Aires (Argentina), 1989; p. 278-279.
16. Albert A, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biología molecular de la célula, Ed. Omega. Barcelona (España), 1990; p.116-133
17. Charmley LL, Symonds HW, Mallison CB. The clearance of copper from the plasma of cattle and its excretion in bile during the intravenous infusion of copper sulfate solution. *Proc Nutr Soc* 1982, 41: 81A.
18. Gooneratne R, Christensen D. Gestation age and maternal-fetal liver copper levels in the bovine. *Proc. 5th Int. Symp. Trace Elements in Man and Animal (TEMA 5)* 1989, p: 334-336.
19. Underwood EJ. Copper, molybdenum and sulfur. The Mineral Nutrition of Livestock, 2 ed, Ed. Commonwealth Agric Bureaux 1981; p. 91-111.

20. Suttle NF. Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. London (Inglaterra), 1983; p. 19-25.
21. Mills CF, Dalgarno AC, Wenham G. Biochemical and pathological changes in tissues of Friesian cattle during the experimental induction of copper deficiency. *Br J Nutr* 1976; 35: 309-331.
22. National Research Council. Nutrient requirements of domestic animals, nutrient requirement of beef cattle. 6 th. Ed. National Academic of Science-National Research Council, Washington (USA), 1984.
23. Phillippo M. Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. London (Inglaterra), 1983; p. 51-60.
24. O'Dell BL. The concept of trace element antagonism: The Cu-Mo-S triangle. *J Nutr* 1997; 127: 1045S-1047S.
25. Suttle NF. The interaction between copper, molybdenum, and sulphur in ruminant nutrition. *Annu Rev Nutr* 1991; 11: 121-140.
26. Gooneratne S R, Laarveld B, Chaplin RK, Christensen DA. Profiles of ⁶⁷Cu in blood, bile, urine and faeces from ⁶⁷Cu-primed lambs: effect of ⁹⁹Mo-labelled tetrathiomolibdate on the metabolism of recently stored tissue ⁶⁷Cu. *Br J Nutr* 1989; 61: 355-371.
27. Mason J. The relationship between copper, molybdenum and sulfur in ruminant and non-ruminant animals. A review. *Vet Sci Commun* 1978; 2: 85-94.
28. Viejo RE, Casaro AP. Efectos de la suplementación con cobre sobre la ganancia de peso, cobre hepático y plasmático en terneros. *Rev Arg Prod Anim* 1993; 13: 97-105.
29. Smart ME, Cohen R, Christensen DA, Williams CM. The effects of sulphates removal from the drinking water on the plasma and liver copper and zinc concentration of beef cows and their calves. *Can J Anim Sci* 1986; 66: 669-680.
30. Campbell AG, Coup MR, Bishop WH, Wright DE. Effect of elevated iron on the copper status of grazing cattle. *N Z J Agric Res* 1974; 17: 393-399.
31. Humphries WR, Phillippo M, Yuong BW, Bremner Y. The influence of dietary iron and molybdenum on copper metabolism in calves. *Br J Nutr* 1983; 49: 77-86.
32. Gengelbach GP, Ward JD, Spears JW. Effect of dietary copper, iron, and molybdenum on growth and copper status of beef cows and calves. *J Anim Sci* 1994; 72: 2722-2727.
33. Bremner Y, Phillippo M, Humphries WR, Young BW, Mills CF. Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. London (Inglaterra) 1983; p.136-137.
34. Suttle NF, Abrahams P, Thornton I. The role of a soil x dietary sulphur interaction in the impairment of copper absorption by ingested soil in sheep. *J Agric Sci* 1984; 103: 81-87.
35. Leigh LC. Changes in the ultrastructure of cardiac muscle in steers deprived of copper. *Res Vet Sci* 1975; 18: 282-287.
36. Smith BP, Fisher GL, Poulos PW, Irwin MR. Abnormal bone development and lameness associated with secondary copper deficiency in young cattle. *JAVMA* 1975; 166 (5): 682-688.
37. Suttle NF, Jones DG. Recent developments in trace element metabolism and function: trace elements, disease resistance and immune responsiveness in ruminant. *J Nutr* 1989; 119:1055-1061.
38. Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, Gracia MC, Auza NJ. The effect of copper deficiency on the peripheral blood cells of cattle. *Vet Res Commun* 1998; 22 (1): 47-57.
39. Gengelbach GP, Spear JW. Effects of dietary copper and molybdenum on copper status, cytokine production, and humoral immune response of calves. *J Dairy Sci* 1998; 81 (12): 3286-3292.
40. Phillippo M, Humphries WR, Atkinson T, Henderson GD, Garthwaite PH. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrus cycles in cattle. *J Agric Sci* 1987; 109: 321-336.
41. Igarza L, Agostini M, Becú Villalobos D, Auza, N. Effects of molibdenosis on luteinizing-hormone, follicle-stimulating and estradiol hormones in rats. *Arch Med Vet* 1996; 28: 101-106.
42. Suttle NF. Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Vet Rec* 1986; 119: 148-152.
43. Ammerman CB. Recent development in cobalt and copper in ruminant nutrition: A review. *J Dairy Sci* 1970; 53: 1097-1107.
44. Carrillo BJ, Bingley JB. Técnica de biopsia de hígado y análisis de la muestra. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 1964; 1 (6): 103-118.
45. Kincaid RL. Assessment of trace mineral status of ruminants: A review. *Proceeding of the American Society of Animal Science*. 1999; p. 1-10.
46. Ramírez CE, Tittarelli CM, Mattioli GA, Giuliodori MJ, Puchuri MC. Hipocupremia bovina en 5 partidos de la provincia de Buenos Aires. *Argentina. Vet Arg* 1997; 14 (131): 12-17.
47. Ferrer CG, Ramírez CE, Zaccardi EM. Efectos de la suplementación parenteral de cobre sobre la ganancia diaria de peso en bovinos de diferentes edades. *Rev Arg Prod Anim* 1989; 9 (3): 173-178.
48. Steffan PE, Fiel CA, Odriozola ER, Acuña CM, Rojas Pabelo FM. Evaluación y comparación de dos productos de aplicación parenteral, en la terapéutica de la hipocuprosis de los novillos. *Rev Arg Prod Anim* 1982;

2: 1-10.

49. Boila RJ, Devlin TJ, Drysdale RA, Lillie LE. The severity of hypocupremia in selected herds of beef cattle in northwestern Manitoba. *Can J Anim Sci* 1984; 64: 919-936.

50. Thornton, I. Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. London (Inglaterra) 1983; p. 39-49.

51. Appleton JD. Review of the use of regional geochemical maps for identifying areas where mineral deficiencies or excesses may affect cattle productivity in tropical countries. British Geological Survey Technical Report WC/92/24 1992.

52. Tejada R, McDowell LR, Martin FG, Conrad JH. Evaluation of cattle mineral status in specific regions of Guatemala. *Trop Agric* 1985; 64 (1): 55-60.

53. Thornton I., Atkinson WJ, Webb JS. Geochemical reconnaissance and bovine hypocuprosis in CO. Limerick, Ireland. *Irish J Agric Res* 1966; 5 (2): 280-283.

54. Centre for tropical Veterinary Medicine (CTVM), Edimburgh University. British Geological Survey Technical Report WC/92/60; 1992.

55. Fleming GA. Mineral composition of herbage. Chemistry and biochemistry of herbage. Ed. Academic Press. New York (USA), 1973; p. 529-566.

56. Thornton I., Kershaw, GF, Davies MK. An investigation into copper deficiency in cattle in the Southern Pennines. II. Response to copper supplementation. *J Agric Sci* 1972; 78: 165-171.

57. Boila RJ, Devlin TJ, Wittenberg KM. Geographical variation of the total sulfur content of forages grown in northwestern Manitoba. *Can J Anim Sci* 1987; 67: 867-872.

58. Mattioli GA, Ramírez CE, Giuliadori MJ, Tittarelli CM, Yano H, Matsui T. Characterization of cattle copper deficiency in the Magdalena District. *Livest Prod Sci* 1996; 47: 7-10.

59. Balbuena O, McDowell LR, Luciani CA, Conrad JH, Wilkinson N, Martin FG. Estudios de la nutrición mineral de los bovinos para carne del este de la provincias de Chaco y Formosa (Argentina). 3. Cobre, molibdeno y azufre. *Vet Arg* 1989; 6 (56): 365-374.

LA RABIA URBANA EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA: ORIGEN-EVOLUCIÓN-ACTUALIDAD

CF Amasino ^{1, 2}, CJ Garbi ², MF Amasino ³

¹ Departamento Antirrábico y Vacunas Virales. Laboratorio Central de Salud Pública e Instituto Biológico. Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires.

² Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias Veterinarias.

³ Cátedra de Biología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: La rabia es una enfermedad infecciosa, zoonótica, caracterizada por alteraciones del sistema nervioso, producida por el virus de la rabia, perteneciente al Género Lyssavirus de la Familia Rhabdoviridae. Es habitualmente transmitida por la mordedura de un animal rabioso que elimina el virus por la saliva. La rabia urbana es la que ocurre en las ciudades, siendo el perro el transmisor y afectado más importante, seguido por el gato y el hombre. El presente trabajo presenta un enfoque global sobre la rabia urbana, enfermedad de los animales y el hombre, en el territorio de la provincia de Buenos Aires, Argentina, hasta el año 2001. Esta provincia presentó el mayor foco de rabia urbana que registró el país desde su aparición en 1806 a consecuencia de las actividades de la 1^o invasión inglesa, hasta su erradicación en el año 1984. Durante 1976, el territorio provincial registró 4.759 casos de rabia animal y trece decesos humanos. Se efectúa un encuadre de las situaciones geográficas y políticas de las épocas en que se produjeron acontecimientos importantes y del estado de los conocimientos científicos sobre la enfermedad en esos momentos, que condicionaron y caracterizaron la presentación, manejo y control de esta enfermedad en la provincia.

Palabras clave: Rabia, historia de la rabia, Buenos Aires, La Plata, Instituto Biológico

THE URBAN RABIES IN THE PROVINCE OF BUENOS AIRES, ARGENTINA: ORIGIN-EVOLUTION-PRESENT TIME

ABSTRACT: Rabies is an infectious and zoonotic disease characterized by alterations of the nervous system, produced by the rabies virus, which belongs to the genus Lyssavirus of the Rhabdoviridae family. The disease is habitually transmitted by the bite of an infected animal, which eliminates the virus in its saliva. Urban rabies is the one that occurs in the cities, being the dog the most important affected and transmitter of the disease, followed by cat and man. The present work shows a global focus on rabies, animal and man affecting disease, in the territory of the province of Buenos Aires, Argentina. This province presented the biggest focus of urban rabies ever registered in the Argentinian Republic from the moment of the first appearance of the disease, consigned in 1806 and due to the activities of the 1st English Invasion, to the moment of the eradication of the disease in 1984. The subsequent panorama, until 2001 is also following presented. During 1976, the province's territory registered 4759 cases of animal rabies and 13 human deaths. An alignment of the geographical and political situations of the periods during which important events happened is made. Besides, the state of the scientific knowledge about the disease during these periods, which conditioned and characterized the presentation, handling and control of this disease in the province of Buenos Aires, Argentina, is also analyzed.

Key words: rabies, rage, history of the rage, Buenos Aires province, Biological Institute

Fecha de recepción: 11/12/01

Fecha de aprobación: 10/10/02

Dirección para correspondencia: C.F. Amasino. Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias Veterinarias. CC 296 (B1900AVW). La Plata. Argentina.

E-mail: amasino@fcv.unlp.edu.ar

RESEÑA GEOGRÁFICA DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

La provincia de Buenos Aires es parte integrante de la República Argentina. Es la provincia de mayor extensión territorial del país (307.571 km²) y su territorio es primordialmente llano, con la excepción de los sistemas serranos de Tandilia y Ventania en la parte central y sur de la misma. Limita al Noreste con el Río de La Plata, que la separa de la República Oriental del Uruguay, al Este con el Mar Argentino, al norte con las provincias de Entre Ríos (de la cual la separa el Río Paraná), Santa Fe y Córdoba, al Oeste con Córdoba, La Pampa y Río Negro y al Sur con Río Negro, de la cual la separa el río Negro.

Desde 1882, la ciudad de La Plata es fundada específicamente para ser capital de la provincia. Esto tuvo lugar después que una Ley de 1880 federalizara la capital provincial original, la

ciudad de Buenos Aires, la cual fue cedida por la provincia al sólo efecto de ser capital de la Nación y dejó entonces de pertenecer al territorio provincial.

Es por tal motivo que la provincia debió reorganizar todos sus sistemas gubernamentales centrales a partir de la federalización de la ciudad de Buenos Aires. En los datos y hechos integrantes del presente trabajo, desde esa fecha (1880) sólo se incluyen los registros correspondientes al actual territorio provincial (1, 2).

RABIA: CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

La rabia es una enfermedad infecciosa, transmisible entre los animales y el hombre, lo que la incluye dentro de las zoonosis, caracterizada por la presentación de alteraciones del sistema nervioso de tipo excitativo o paralítico, producida por el virus de la rabia, virus perteneciente al Género *Lyssavirus* de la Familia *Rabdoviridae* (3).

TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD

La rabia se transmite habitualmente por la mordedura de los animales infectados eliminadores del virus. El virus se elimina por la saliva durante varios días (hasta 10) antes del comienzo de los síntomas y durante todo el período de sintomatología clínica.

Otras formas comprobadas menos frecuentes de transmisión son la inhalación de aerosoles ricos en virus (por infección de los bulbos olfatorios) y el transplante de córneas infectadas.

El virus presente en la saliva es inoculado por la mordedura en el tejido subcutáneo y muscular, en el cual puede sufrir una multiplicación y luego avanzar hacia el Sistema Nervioso Central (SNC) siguiendo el trayecto de los nervios periféricos, a una velocidad máxima de 3 mm por hora. Cuando llega al SNC ingresa a las neuronas y comienza su multiplicación en el citoplasma de las mismas. El tiempo que tarda en alcanzar el SNC está condicionado por la cercanía de las mordeduras infectantes al mismo, la ocurrencia de mordeduras múltiples, la profundidad de las mismas, la inervación de la zona, la cantidad de virus inoculada, su patogenicidad y la ausencia de tratamiento inmediato de las heridas.

Cuando el virus alcanza el sistema nervioso central produce una encefalitis con degeneración neuronal y presencia en estas células de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, llamados Corpúsculos de Negri (4). Una vez iniciada la sintomatología



Fig 1: Mapa de la República Argentina mostrando la Provincia de Buenos Aires

Fig. 1: Map of the Republic Argentina showing the Province of Buenos Aires.

matología, es una enfermedad mortal, muriendo los afectados finalmente por un paro respiratorio.

PERÍODO DE INCUBACIÓN

El periodo de incubación de la rabia es característicamente variable y reconoce los extremos de 10 a 365 días. En la gran mayoría de los casos el período habitual de incubación se sitúa entre los 30 y 60 días luego de la mordedura infectante.

La importancia de un período de incubación como el descrito radica en que animales que hayan recibido una mordedura infectante, se mantendrán durante mucho tiempo vivos y sin síntomas, pudiendo ser transportados a grandes distancias y manifestar la enfermedad luego de arribar a otras zonas, regiones o continentes. Para que se instale una cadena epidemiológica que mantenga la infección en una determinada zona, es importante que esos animales tengan hábitos de morder y lleguen a zonas donde haya una adecuada cantidad de animales susceptibles.

SINTOMATOLOGÍA DE LA RABIA

La rabia se puede manifestar en forma furiosa o clásica, en la cual es característica la agresividad, o en la forma muda o paralítica, en la cual predominan desde el principio fenómenos de parálisis.

La rabia furiosa o clásica en los caninos comienza con un cambio de los hábitos del animal, con progresiva ansiedad y excitación. Luego se evidencia erizamiento del pelo, mirada ansiosa con midriasis, ladridos roncós y ataques de furor con agresividad marcada. El animal ataca y muerde espontáneamente, especialmente lo que está en movimiento. Tiende a deambular y escapa de su vivienda, con marcha inicialmente ágil, pero que manifiesta progresivas incoordinaciones y marchas laterales. Se presenta dificultad en la deglución, la saliva con aspecto espumoso se acumula en la boca y escurre de la misma, presentando a veces coloración rojiza por lesiones en la lengua y boca. Posteriormente se observa una marcada incoordinación, caídas repetidas, parálisis final con síntomas de encefalitis y la muerte. En los gatos es frecuente la presentación furiosa de la rabia, con marcada agresividad, resultando peligrosos por su habitual agilidad, la característica de refugiarse sobre o debajo de los muebles y ocasionar lesiones profundas y desgarrantes en la cara, cuello y manos del hombre.

La forma paralítica o muda en el perro comienza también con un período de alteración de

las actitudes normales, se presenta marcha vacilante, lateral y luego el animal permanece quieto, en decúbito ventral, presenta el pelo ligeramente erizado, dilatación pupilar (midriasis), estrabismo divergente, parálisis faríngea y de los músculos masticadores notable, por lo cual presenta la mandíbula péndula, la saliva filante escapa por la boca y realiza movimientos de intento de deglutir que semejan una obstrucción de la garganta. Al progresar la parálisis caen en decúbito lateral y mueren (5).

En el hombre se inicia con un período prodromico. Puede haber dolor en el sitio de la mordedura y hormigueos o parestesia en la zona de exposición. Luego se comprueba fiebre, ansiedad, obnubilación, estupor, agitación, dificultades para la deglución, hemiparesias, delirios, compromiso respiratorio central y otros signos neurológicos. Puede haber intermitencias en la lucidez del paciente (6).

Se presentan contracciones espasmódicas de los músculos faríngeos, que se hacen cada vez más fuertes y dolorosas y que se desencadenan al intentar tomar agua, a la sola vista de la misma o ante la acción de corrientes de aire. Estos espasmos son acompañados de sofocación y a veces de ataques convulsivos. Su aparición en la sintomatología de la rabia humana dio origen al término hidrofobia ("horror al agua").

Se produce luego una parálisis progresiva, con sudoración, decúbito, sialorrea y muerte por paro respiratorio.

CLASIFICACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA RABIA

Epidemiológicamente la rabia se clasifica en tres tipos: urbana o ciudadana, silvestre, salvaje o selvática y desmodina, pareasiente o autóctona sudamericana.

En la rabia urbana, que ocurre en las ciudades, los involucrados son principalmente los perros y en segundo término los gatos. Es el tipo epidemiológico que más exposiciones provoca en el hombre.

En la rabia selvática, silvestre o salvaje, que ocurre en los bosques, zonas rurales, estepas o selvas de acuerdo a la región, los animales involucrados son los zorros, los zorrinos, mapaches, chacales, lobos, coatíes, etc. La exposición humana es cuantitativamente menor.

La rabia desmodina está distribuida principalmente en América del Sur y Central llegando hasta México y los transmisores son tres especies de murciélagos hematófagos: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngii*, aunque las dos últimas no tienen la importancia de la primera (7).

Este tipo de rabia afecta principalmente a los bovinos, produciendo la rabia paresiante ya que comienza la sintomatología con paresias y tambaleo del tren posterior, que luego progresa a parálisis y posterior afección completa del Sistema Nervioso Central, lo que se produce en menor grado en los equinos y ovinos y esporádicamente en el hombre. En algunos casos se comprobaron abundantes exposiciones humanas, favorecidas por hábitos de dormir fuera de las viviendas en zonas calurosas, como en las primeras descripciones de rabia por vampiros en Trinidad (8).

Otros autores, simplifican esta clasificación y hablan de dos ciclos: el urbano y el silvestre (9).

Recientemente está tomando importancia la consideración de un ciclo terrestre (aparición de casos en especies terrestres, tanto urbanas como rurales) y un ciclo aéreo (transmisión entre diversos tipos de murciélagos, tanto urbanos como rurales).

VIRUS DE LA RABIA

El virus de la rabia tiene forma de bala, con un extremo redondeado y el otro recto. Mide 180 nm de largo por 75 nm de ancho. Es un virus con ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple negativa. El RNA se halla rodeado por subunidades proteicas constituyendo una nucleocápside dispuesta en hélice. Esta nucleocápside helicoidal se halla a su vez envuelta por una doble membrana, la envoltura, que no cubre completamente el extremo recto del virión. La superficie externa de la envoltura presenta espículas con aspecto hexagonal, lo que da a la partícula viral apariencia de panal de abejas vista con el microscopio electrónico.

Taxonómicamente está ubicado en el Género *Lyssavirus* de la Familia *Rhabdoviridae*, la cual comprende virus con forma de bacilo, bastón o bala (alargados con ambos o uno sólo de los extremos redondeados).

El género *Lyssavirus* incluye las especies: virus de la rabia (serotipo I); del murciélago de Lagos (serotipo II); Mokola (serotipo III); Duvenhage (serotipo IV) y dos *Lyssavirus* europeos aislados

de murciélagos (EBL1 y EBL2: European Bat *Lyssavirus* 1 y 2).

Los *Lyssavirus* tienen en común entre sí los antígenos internos de la nucleocápside. Se diferencian por los antígenos externos, de envoltura, lo cual puede ponerse en evidencia por pruebas de neutralización cruzada.

VIRUS DE CALLE: Se denomina virus de calle al virus productor de los casos clínicos naturales de rabia, nombre derivado de que se los aislaba de los animales rabiosos de la calle.

Las características del virus de calle son:

1. Es patógeno por vía periférica: inyectado en forma subcutánea o intramuscular o inoculado por una mordedura alcanza el sistema nervioso central (SNC) y provoca encefalitis rábica mortal.

2. Provoca en las neuronas infectadas la aparición de cuerpos de inclusión de Negri.

3. Si se lo inocula por vía intracerebral a ratones adultos, los mata entre 7 y 21 días.

VIRUS FIJO: Es un virus logrado por Pasteur en el laboratorio mediante pasajes intracerebrales del virus de calle. El virus fijo:

1. Es prácticamente apatógeno por vía periférica.

2. No produce en las neuronas cuerpos de inclusión de Negri.

3. Inoculado por vía intracerebral a ratones adultos los mata en 7 días (a los lactantes en 5).

ANTÍGENOS DEL VIRUS

Dentro de los componentes antigénicos del virus de la rabia destacan la glucoproteína (G) o antígeno G, presente en las espículas de la envoltura viral, capaz de inducir protección por anticuerpos neutralizantes en los vacunados y la Nucleoproteína (N) o antígeno N, que se detecta en las pruebas diagnósticas de Inmunofluorescencia y precipitación y tiene una función secundaria en el refuerzo de la inmunidad.

Ambas proteínas (G y N) han podido ser expresadas en una importante variedad de sistemas procarióticos y eucarióticos por manipulación genética, lo que es importante para el desarrollo de vacunas.

Se han preparado conjugados con anticuerpos monoclonales marcados con sustancias fluorescentes contra las proteínas G y N del virus de la rabia. Los anticuerpos monoclonales muestran patrones específicos de reactividad los cuales han sido usados para caracterizar y clasificar virus

rábico y virus relacionados en grupos correspondientes. Se han establecido diferentes paneles de anticuerpos monoclonales que permiten la diferenciación de los aislamientos de virus rábico de especies terrestres y murciélagos, lo que permite caracterizar las mismas y encuadrar su origen (cepas de caninos, de murciélagos, africanas, asiáticas, europeas, americanas, cepas vacunales, etc). Esta posibilidad de establecer el seguimiento de las cepas en la naturaleza se emplea en los estudios epidemiológicos del virus de la rabia.

El uso de paneles específicos de anticuerpos monoclonales ha permitido mapear sitios antigénicos en las proteínas virales, especialmente la G y RNP (ribonucleoproteína) reconocidos por las células B y T virus específicas.

La amplificación del RNA viral por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) seguida por el análisis de las secuencias amplificadas ha permitido estudios más representativos. Estudios de variabilidad de ciertas áreas seleccionadas del genoma entre cepas puede ser llevada a cabo en el RNA amplificado por PCR por análisis de restricción o secuenciamiento directo (10).

RESISTENCIA DEL VIRUS

La envoltura tiene composición lipoglucoproteica. Para ser infeccioso el virión debe estar completo, por lo que cualquier elemento que degrade la envoltura (jabones, detergentes, cetrimida, solventes) evita la infecciosidad.

El virus de la rabia es inactivado en el medio ambiente por la radiación ultravioleta, el calor, la desecación y los solventes de los lípidos. Por tal motivo, la enfermedad en la naturaleza se debe mantener por transmisiones entre animales susceptibles, en las que los enfermos logren transmitir por mordedura el virus a otros susceptibles antes de morir.

IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD

La rabia, en la actualidad ocupa aún grandes extensiones de la Tierra, aunque existen amplias áreas libres de rabia como el continente Antártico, Australia, los territorios insulares como Nueva Zelanda, Japón, Hawaii, Gran Bretaña, Irlanda, Jamaica y Barbados y algunos territorios continentales como los países Escandinavos (excepto la región de frontera de Dinamarca), Bulgaria, España, Portugal y Uruguay. En las zonas en que existe rabia hay habitualmente predominancia de uno de los tipos epidemiológicos. Así, la rabia urbana es importante en Lati-

noamérica, existiendo en Bolivia, Brasil, México, Nicaragua, Paraguay, Perú y Venezuela. También aparece en ciudades de África y Asia.

La rabia desmodina está localizada desde el norte de México hasta el tercio norte de Argentina, causando importantes pérdidas en la ganadería. Casos humanos de rabia por vampiros se han comprobado en Trinidad, Guyana, México, Bolivia, Brasil y Perú.

En cuanto a la rabia silvestre, está muy difundida y varían en importancia ciertas especies transmisoras según el país. En Estados Unidos y Canadá son los zorrinos, mapaches y zorros los transmisores más frecuentes. En Europa el zorro es el responsable más importante de la transmisión, así como el chacal en el área Egipcia y la mangosta en la India (11).

Los casos humanos derivan de la presencia de los casos animales, siendo aún importantes las pérdidas de vidas por rabia. Existe un promedio de 1000 casos de rabia humana por año en el mundo que ocurren en primer lugar en Asia y luego en América y África.

Además de las muertes, son muy importantes los costos ocasionados por tratamientos anti-rábicos de las personas expuestas, gastos de vacunas, pérdida de horas de trabajo y gastos de campañas de prevención, funcionamiento de servicios antirrábicos, difusión, educación para la salud y vacunación.

En lo que respecta a la República Argentina, la rabia urbana que se presentaba en las provincias del centro y norte del país, sufrió un gran retroceso en la década 1980-90 y se logró el control de esta presentación en casi todas las provincias en el período 1990-1999. Así, Tucumán, que mantuvo un promedio cercano a 100 casos animales por año en la década 1980-1990, luego de un caso humano en 1994 intensificó su control y logró la eliminación a fines de 1998. Salta que mantuvo una tendencia similar con promedios de 10 casos anuales, también lo logró, aunque frecuentemente se producen casos importados por su vecindad con Bolivia. Así mismo, Santiago del Estero logró controlar los focos residuales que presentaba. En el resto de las provincias en que la enfermedad estaba presente, se logró su eliminación. El tercio medio y sur del territorio nacional se han mantenido libres de rabia canina.

Un capítulo especial, por su importancia, merece la rabia urbana en la provincia de Buenos Aires. Esta provincia está actualmente libre de

rabia urbana por el virus canino en los animales, siendo el último caso informado en perros del año 1984 y los dos últimos casos humanos de 1981.

Lo trascendental de estos datos estriba en que la provincia de Buenos Aires constituía el foco más importante de rabia urbana del país, con datos que en el año 1976 alcanzaron en el territorio provincial a 4.759 casos en animales, acompañados como consecuencia por trece decesos humanos. Este grave panorama motivó una acción sanitaria intensa, cuyo fruto fue el registro del último caso canino en 1984, permaneciendo libre desde entonces.

La rabia desmodina tiene importancia en las provincias del norte como Misiones, Corrientes, Formosa, Chaco, Salta y Jujuy, especialmente en el ganado bovino. La rabia silvestre no es un problema actual en la República Argentina debido a la escasa densidad poblacional de los animales habitualmente involucrados en su transmisión.

La rabia en murciélagos no hematófagos, cuyas cepas tienen ciertas diferencias con los virus de caninos y no presentan su mismo riesgo epidemiológico, aunque sí individual, está siendo objeto de estudio cada vez más creciente, dado que es la que queda y se evidencia en las zonas que se liberan de la rabia canina. Si bien la rabia humana por exposición causada por murciélagos insectívoros no es común, en Canadá y Estados Unidos se han notificado 13 casos, en Europa 2, en Chile 1 y en Argentina 1.

SITUACIÓN PREVIA AL ORIGEN DE LA RABIA EN LA PROVINCIA

El territorio de la provincia de Buenos Aires, en las épocas previas a la colonización española, presentaba características particulares que lo hacían poco propicio para la difusión de brotes naturales de rabia. Sus grandes extensiones de territorio de tipo llano tenían muy baja densidad de animales potencialmente transmisores. No hay registros ni descripciones que permitan pensar que la enfermedad se había detectado en la zona, ya que los únicos relatos de la época de la conquista hablan solamente de probable rabia autóctona en zonas de Centroamérica y el Caribe.

Con la colonización española se producen dos importantes variaciones:

1. Se puebla la fértil pampa bonaerense con grandes animales como caballos, vacas y otros animales traídos por los conquistadores.

2. Se comenzaron a organizar grandes poblaciones como la ciudad de Buenos Aires (luego

de su segunda fundación por Juan de Garay) y zonas periféricas a las mismas, donde proliferaron los mataderos, los secaderos de cueros, los saladeros, las seberías, etc, y por consiguiente los perros, creándose recién entonces las condiciones para que pudiera originarse un brote de rabia por importación de un caso (12, 13).

Una de estas zonas de gran desarrollo de la industria saladeril y cárnica se situó en la región costero portuaria de entrada al Río de la Plata desde la ensenada de Barragán hacia el norte (14). Estos territorios luego fueron parte del partido de La Plata desde 1882 y en 1957 se dividen quedando tres partidos con sus correspondientes ciudades: La Plata, Berisso y Ensenada (en el cual queda la Ensenada de Barragán y el antiguo fuerte que mandaba Liniers durante la primera invasión inglesa). Esta zona que incluye actualmente los tres partidos, se conoce como Gran La Plata (15).

El período de incubación de la rabia (10 a 365 días) posibilitaba que un animal incubando esta enfermedad viviera los largos períodos de tiempo que tardaban los barcos de esa época en llegar desde Europa o Africa donde la rabia era endémica, hasta las costas de la provincia de Buenos Aires.

Esto recién se produce con las invasiones inglesas al Río de La Plata (1806-1807) las cuales desembarcan en 1806 en Quilmes, luego de haber sido rechazadas por las baterías del fuerte de la Ensenada de Barragán y en 1807 en la Ensenada de Barragán.

LA PRIMERA INVASIÓN INGLESA Y LA RABIA EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

Inglaterra, en guerra con Francia, la cual estaba circunstancialmente aliada a España, tentada por los caudales que venían desde las colonias, comienza tomando 4 fragatas españolas del Río de La Plata, luego toma la colonia holandesa del Cabo de Buena Esperanza y desde ahí proyectan tomar el Virreinato del Río de La Plata, cuya capital era la ciudad de Buenos Aires. Es así como una escuadra de 11 barcos mandada por Home Popham con un ejército de 1600 hombres mandado por Carr Beresford, sale del Cabo, pasa por Santa Helena y viene al Río de La Plata, donde llega entre el 11 y 18 de junio de 1806. El 24 de junio de 1806 la flota amaga un desembarco en Ensenada, pero al ser rechazada por las baterías del Fuerte mandado por Liniers, navegan hacia



Fig 2: Primera invasión inglesa: el 24 de junio de 1806 la flota invasora intercambia cañonazos con el Fuerte Barragán. El 25 desembarcan en Quilmes y marchan hacia Buenos Aires.

Fig.2: First English Invasion: On 24th June of 1806 the English fleet exchanged gunshot with Fort Barragán. On the 25th they disembarked in Quilmes and went towards Buenos Aires.

Quilmes donde desembarcan el 25 de junio de 1806 y marchan hacia Buenos Aires. Luego de tomar la ciudad, son derrotados por Liniers el 12 de agosto de 1806 (16).

En esta primera invasión se desembarcan perros de las fuerzas inglesas incubando la rabia. Estos perros eran usados aparentemente para cacerías deportivas por los soldados.

Estos canes se pueden haber infectado en Europa o más probablemente en el sur de África, en la colonia del Cabo de Buena Esperanza, de donde finalmente parte la primera invasión.

Al desembarcar en una zona donde ya había industrias saladeriles y de mataderos importantes y por consiguiente las concentraciones de perros que rodeaban habitualmente a estas industrias, la enfermedad encuentra las condiciones propicias para transmitirse e instalarse en forma permanente en el territorio provincial.

En relación a este primer brote, Harald N Johnson, en el Capítulo 21 "Rabies" del libro "Viral and Rickettsial Infections of man" consigna "..."; in 1806 an outbreak was observed among hunting dogs imported into La Plata, Argentina." (en 1806 un brote fue observado entre perros de caza importados en La Plata, Argentina) (17, 18) . Este habría sido el origen de la rabia canina en la provincia de Buenos Aires.

Es entonces que la rabia canina urbana iniciada en 1806 en la provincia de Buenos Aires por los perros de la primera invasión inglesa en la zona de La Plata, trajo a la provincia de Buenos Aires un problema que duró casi dos siglos (desde 1806 a 1984). La rabia canina se expandió en un gran brote por la zona de La Plata, progresando luego hacia Buenos Aires. A partir de esa época, y durante 178 años, la enfermedad se mantuvo en forma endémica en el territorio provincial, constituyendo el gran foco de rabia urbana del país.

LA SEGUNDA INVASIÓN INGLESA Y LA RABIA EN LA BANDA ORIENTAL

La segunda invasión inglesa al Virreinato del Río de La Plata vuelve a tener como uno de sus actores a Home Popham que bloquea el río con su escuadra, esta recibe refuerzos del Cabo de Buena Esperanza y de Inglaterra (Fuerzas del general Achmuty) y toman Montevideo. Desde allí Whitelocke, en más de 100 barcos y con aproximadamente 11.000 efectivos, cruza el río y desembarca en la Ensenada de Barragán el 28 de junio de 1807 (19).

Esta segunda invasión, que recorre los mismos puntos de riesgo de rabia que la primera (Europa, el Cabo de Buena Esperanza), es el casi seguro ingreso de la rabia en la Banda oriental (actual Uruguay) durante 1807, registrándose allí casos humanos desde diciembre de 1807 (20).

EVOLUCIÓN DEL PROBLEMA DURANTE LA ORGANIZACIÓN NACIONAL

Una vez instalada la enfermedad en el territorio provincial, que por ese entonces incluía la ciudad de Buenos Aires, los casos de rabia se convierten en una realidad cotidiana de la zona urbana y suburbana que se sitúa entre el sur de la ensenada de Barragán y la ciudad de Buenos Aires, lo que comprende el actual conurbano y Gran La Plata.

Las grandes extensiones que separan esta zona de otras ciudades no permiten que el interior bonaerense se contamine inicialmente con rapidez.

La rabia en esa época, 1806 en adelante, constituye un problema sin solución, al cual solamente se le pueden oponer medidas higiénicas y la práctica de eliminar y evitar a los animales rabiosos. No había aún vacunas contra la rabia y la acción sanitaria era muy limitada.

LA FEDERALIZACIÓN DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Y LA CREACIÓN DE LA CIUDAD DE LA PLATA

Como parte de la puja por el problema de la Capital para la República Argentina y dado que las provincias del interior aceptan como capital a la ciudad de Buenos Aires pero a condición de que no siga siendo parte y capital de la provincia, se decide la federalización de la ciudad en 1880 y la cesión de esta por parte de la provincia (21) y se crea una nueva ciudad para sede del gobierno de la provincia de Buenos Aires, como ciudad capital de la misma (22).

Así el 19 de noviembre de 1882, en las coordenadas 34 ° 55 ' de Latitud sur, 57° 57' de Longitud oeste, se funda la ciudad de La Plata, que dentro de su partido incluye originalmente en la zona ribereña la Ensenada de Barragán (actuales partidos de La Plata, Berisso, Ensenada, Brandsen).

La provincia de Buenos Aires debe entonces crear en su nueva capital los nuevos efectores para sus funciones, dentro de ellos los organismos encargados de las acciones de salud provincial.

LOS DESCUBRIMIENTOS DE PASTEUR Y SU REPERCUSIÓN EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

En Francia, durante 1885, Pasteur aplica su tratamiento antirrábico al joven alsaciano Joseph Meister, el cual sobrevive a las múltiples mordeduras de un animal rabioso convirtiéndose en la primer persona que recibió el tratamiento post exposición. Un segundo tratado, Jupille, también sobrevive y luego lo hace un grupo de campesinos rusos, proyectando mundialmente la fama del método de Pasteur, el cual lo publica en su famoso e histórico trabajo: "Método para prevenir la rabia después de la mordedura" (23). El Dr. Desiderio Davel, científico argentino, es aceptado por Pasteur como discípulo y trae a Buenos Aires el virus fijo de Pasteur pasándolo por conejos en el barco, produciendo y aplicando la vacuna antirrábica ya al año siguiente (1886) en esta ciudad (24). El transporte de virus pasándolo por conejos implicaba que: 1) Se debió prever embarcar y acondicionar un número adecuado de conejos y su alimento, 2) Se embarcaron los conejos originalmente inoculados con el virus fijo por vía intracerebral 3) dado que este virus mata al conejo en 7 días, con una fase previa de parálisis y postración, al cumplirse este plazo, había que aseptizar la piel de los

conejos, extraer el encéfalo en condiciones asépticas, suspenderlo en diluyente realizando una trituración del material nervioso, decantarlo y volver a inocularlo por vía intracerebral a otros conejos, los que a la semana siguiente debían ser cosechados, resuspendiendo y pasando el virus a otro grupo de conejos. Esto implicaba un pasaje semanal de la cepa de virus fijo, evitando que se contamine o se pierda antes de llegar a destino, lo cual constituye un notable ejemplo de organización y dedicación a la tarea emprendida.

Buenos Aires fue la primera ciudad en el mundo fuera del Instituto Pasteur de París en que se produjo la vacuna antirrábica según el método de Pasteur (25).

Tan temprano desarrollo no alcanza para que a nivel epidemiológico la rabia urbana no siga en aumento, lo cual es lamentado en 1940 en un discurso pronunciado por el Dr. José R. Serres el 22 de abril de ese año al inaugurarse un busto de Louis Pasteur en los jardines de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires (26). El Dr. Serres, profesor de esa Facultad, de importante actividad en la prevención y epidemiología de la rabia, (27) participaba activamente en la divulgación y educación para la salud sobre el tema, entendiendo que esto debía hacerse desde los ámbitos educativos y la escuela (28). Le preocupaba ver que el problema de la rabia urbana aumentaba por deficiencias en acciones preventivas, educación sanitaria y legislaciones claras y precisas.

EL DESARROLLO DE ORGANISMOS SANITARIOS PROVINCIALES EN LA NUEVA CAPITAL

En La Plata, al organizarse la nueva capital provincial, se crea un Instituto Antirrábico y un "Conservatorio" de vacuna Antivariólica. Un Instituto de Higiene Experimental que dependía del Consejo Superior de Higiene (Ley del 10 de agosto de 1887) (29) se irá reconvirtiendo para ser finalmente la base del Instituto Biológico de la Provincia de Buenos Aires. Al organizarse el Instituto Biológico, se fueron nucleando en el mismo los efectores que actuaban en la lucha contra las enfermedades infecciosas y en la producción de vacunas, sueros y productos biológicos y luego los laboratorios de las Oficinas Químicas y de Bromatología. El Instituto Antirrábico original pasará a ser parte integrante del Instituto Biológico de la Provincia de Buenos Aires



Fig 3: Laboratorio Central de Salud Pública e Instituto Biológico. La Plata

Fig.3: Central Laboratory of Public Health and Biological Institute. La Plata.

EL MINISTERIO DE SALUD, EL INSTITUTO BIOLÓGICO Y EL DEPARTAMENTO ANTIRRÁBICO

El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de la Provincia de Buenos Aires se crea en 1947 por Ley Provincial N° 5116.

En esta Ley en el Art 34 dice: «El actual Instituto de Investigaciones Patológicas de la Dirección General de Higiene, con la denominación de Instituto Biológico, pasará a depender del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social».

El edificio del Instituto Biológico: Por un Decreto provincial del 11 de febrero de 1948, ...”se autorizó a la Dirección de Arquitectura para llamar a licitación pública para el 27 del mes en curso, las obras de construcción del nuevo edificio destinado al Instituto Biológico de la Provincia, el que será emplazado en las cuatro manzanas com-

prendidas por las calles 24, 26, 9 y 11 de la zona de Tolosa, en las inmediaciones del camino General Belgrano, el que pasará por el ángulo sur de las nuevas instalaciones. El presupuesto oficial de las obras de referencia se eleva a la cantidad de \$ 1.316.647, 45.- El edificio proyectado permitirá futuras ampliaciones en una segunda etapa de su construcción. La parte que ahora se licita comprenderá dos plantas, ubicándose en la baja los laboratorios...” (30).

La relevancia de este tipo de decisiones de inversión estriba en que la provincia toma el camino correcto de construir y equipar laboratorios específicamente diseñados para las actividades de producción de sueros y vacunas y controles de la higiene y salud públicas para la misma, previendo además que en el futuro las actividades se incrementen. Esto permitió que se contara con servicios y equipos permanentes de especialistas en los temas microbiológicos que demandaba la salud pública.

Tanto el Instituto Antirrábico como el Conservatorio de Vacuna Antivariólica son trasladados a una ampliación del nuevo edificio en la década del 50, pasando a formar parte del Instituto Biológico como Departamentos del mismo.

En 1962 se incorpora al Instituto Biológico la Dirección de laboratorios Químicos y se constituye el Instituto Biológico y Laboratorios de Salud Pública por Decreto 924 del Comisionado Federal de la provincia de Buenos Aires.

En 1976 se transforma en una Dirección del Ministerio de Salud pasando a ser el Laboratorio Central de Salud Pública e Instituto Biológico del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires.

EL DEPARTAMENTO ANTIRRÁBICO

El Departamento Antirrábico se organiza con un servicio médico, un servicio veterinario, un laboratorio de diagnóstico y un laboratorio productor de vacuna de uso humano y veterinario. Se producía por ese entonces la vacuna Pasteur y la Semple para uso de toda la provincia.

La vacuna original de Pasteur, que consistía en una suspensión de médula de conejo infectada con virus fijo y sometida a períodos variables de desecación, contenía una importante cantidad de mielina, por lo cual aparecía en algunos tratados una reacción postvacunal desmielinizante caracterizada por paresias, parálisis y eventualmente la muerte. Por otra parte su producción te-

nía mucho de artesanal, ya que las vacunas del método de Pasteur no eran todas iguales. Las primeras que se administraban consistían en la médula de los conejos que habían alcanzado el estado de postración por el virus fijo, sometidas a un período de desecación largo, que prácticamente inactivaba el virus. Las siguientes habían sufrido un período de desecación menor y las últimas eran suspensiones casi frescas de médula infectada que contenían virus activo residual. Esto hacía que cada semana hubiera que preparar vacunas de diferente grado de atenuación para ejecutar los tratamientos.

La vacuna Simple se producía inoculando el virus fijo por vía intracerebral a ovejas (también se puede hacer en conejos o cabras). Estos animales eran adultos y la vacuna contenía una importante cantidad de tejido nervioso (20 %) y se inactivaba por fenol y calor. Si bien era a virus inactivado y se adaptaba a un procesamiento industrial, su duración no superaba los seis meses (31).

En 1967 se comienza a fabricar en forma continua la vacuna Fuenzalida Palacios, la cual por ser potente, inocua y exenta de reacciones, proporcionó el arma con la cual se vencería a la rabia en la provincia (32).

La vacuna Fuenzalida-Palacios (33) contiene virus fijo de cepas CVS, 91 y 51, que se propagan inoculándolas en el cerebro de ratones lactantes de 1 día y se cosechan al 4º día de la inoculación (5º-6º día de vida), eliminándose así la presencia de mielina que en el ratón aparece al 9º día. Se agrega además la centrifugación de la suspensión a 17.000 x g que purifica la suspensión y aún en caso de que hubiera mielina, la eliminaría (34). Además el ratón lactante multiplica muy bien el virus fijo, rindiendo altos títulos (2 % de tejido nervioso en las dosis de 1 ml para uso humano) Esto hace que, actualmente, la vacuna antirrábica sea segura y exenta de efectos indeseables. El virus se inactiva por radiación ultravioleta, que desnaturaliza el ácido nucleico y conserva la envoltura que interesa como antígeno inmunizante. La buena potencia de esta vacuna permitió emplear esquemas reducidos de tratamiento postexposición, actualmente de 9 dosis. La vacuna Fuenzalida Palacios para uso veterinario se manifestó muy eficaz en las campañas realizadas en la provincia de Buenos Aires y con ella se llegó a dominar la rabia animal.

Durante el año 1974 el Departamento Antirrábico incorpora el uso de la luz azul para el diag-

nóstico de rabia por inmunofluorescencia reemplazando la iluminación ultravioleta (35).

Al haberse extendido la epizootia rábica por el cinturón urbano que rodeaba a Buenos Aires se decide la creación en la década del 70 dentro de la Dirección de Medicina preventiva del Ministerio de Salud de un organismo programador de las campañas de vacunación provinciales y que coordine la acción municipal al respecto, encargándose de la distribución de la vacuna producida por el Departamento Antirrábico. Este nuevo efector se denominó Zoonosis Urbanas y su sede se ubicó en la ciudad de Avellaneda, lindante con la ciudad de Buenos Aires.

Los factores que favorecen la difusión de la rabia urbana por toda la zona que rodea a la Capital Federal reconocen varios aspectos, pero la base fundamental fue el creciente y luego explosivo aumento poblacional en la periferia de la ciudad de Buenos Aires. La economía argentina desembocaba en el puerto de Buenos Aires. Allí confluía la red ferroviaria y se empezaron a acumular industrias concentradoras (mercados de hacienda y frigoríficos exportadores, embarques de granos, industrias del cuero, etc), que ofrecían ocupación a una importante cantidad de empleados. Pero es durante la Segunda Guerra Mundial y los años siguientes cuando se conjugan una expansión económica con una fuerte radicación de industrias en la zona del llamado Gran Buenos Aires (no sólo frigoríficas sino textiles, químicas, petroleras, metalúrgicas, vidrieras, de electricidad, mercantiles y de exportación, navales, automotrices, de indumentaria, etc. que acarrear un flujo poblacional desde el interior y el campo hacia los alrededores de la gran ciudad, sumados a que parte de los inmigrantes se instalaron cerca de esta zona al llegar. Esto ocasionó que en estas zonas periféricas, en muchos casos sin adecuada planificación, proliferaran focos poblacionales de trabajadores recientemente instalados. Estas familias tenían animales domésticos, especialmente perros. La abundancia y el descontrol sanitario de estos actuaron a favor de la expansión de la rabia urbana.

Se hacía necesaria una acción que contemplara la idiosincrasia de la población, la cual rechazaba los planes de eliminación de animales, que reforzara las acciones locales municipales con un apoyo provincial fuerte, que se normatizara en el tema y que se usaran elementos preventivos de alta calidad. El cumplimiento gradual de estas etapas permitió el éxito de las campañas.

Tabla 1. **Casos de rabia urbana canina en la Provincia de Buenos Aires.** Acumulados años 1971/80 — 1981/84— 1985/93—1994 al 1997

Table 1. Cases of canine urban rabies in the province of Buenos Aires. Accumulated years 1971/80 — 1981/84— 1985/93—1994 al 1997

Años	1971/80	1981/84	1985/93	1994	1995	1996	1997
Prov. De Buenos Aires	12.655	236	0	0	0	0	0

LA LEY DE PROFILAXIS DE LA RABIA DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

El año 1973 resulta de gran importancia al sancionarse en la legislatura bonaerense la Ley 8056/73 de Profilaxis de la Rabia, dando un adecuado y acertado marco legal a la actividad. Su Decreto Reglamentario 4669 la complementa adecuadamente y esta herramienta legal resultó de incalculable valor para toda la acción antirrábica.

Durante el año 1976 se produce el más espectacular pico de casos de rabia en la provincia de Buenos Aires (4.759 casos animales y 13 humanos) Tabla 1.

EL PROYECTO RABIA CERO Y LA ERRADICACIÓN DE LA RABIA URBANA DE LA PROVINCIA

Con la campaña antirrábica de vacunación anual canina y el operativo Pasteur que reforzaba la misma en las zonas más peligrosas en las cuales se usaban las vacunas de mayor potencia, se comienza a partir del año 1977 a lograr una disminución de casos casi geométrica: cada año se producía la mitad aproximadamente de los del período anterior.

A esto se llega también gradualmente. El Centro Panamericano de Zoonosis comenzó a preconizar la implementación de la prueba de potencia NIH, en la que se establece la potencia relativa de las vacunas probadas en comparación con la potencia de una vacuna patrón denominada vacuna de referencia. Se inoculaban lotes de ratones con diluciones de la vacuna a probar y diluciones de la vacuna de referencia y luego se desafiaba a todos los ratones por vía intracerebral con una cantidad fija de virus de desafío (cepa CVS) cuyo título se comprueba con una titulación paralela. Se anotan los ratones muertos en cada dilución de ambas vacunas, acumulando estos valores y evaluándolos estadísticamente con el método de Reed y Muench. De esta comparación de dosis efectivas 50 % de ambas vacunas surgía el

valor de potencia relativa de la vacuna probada con respecto a la de referencia. Este valor debía ser de 0,3 como mínimo o la vacuna era desaprobada. Pero si este valor de la vacuna probada era superior, “no debe diluirse el lote final ni debe reducirse el volumen de la dosis inmunitaria” (36). O sea que la Organización Mundial de la Salud prohibía expresamente la dilución de la vacuna, aunque sus resultados fueran varias veces superiores al mínimo requerido para su aprobación. En la práctica, una vacuna de potencia 10, 20 o más veces mayor que el mínimo requerido es ideal para ser usada en las zonas donde el virus está circulando porque hay casos, donde los perros a vacunar están parasitados, mal alimentados o son llevados una sola vez a vacunarse.

Con la implementación de esta prueba a toda la producción del Laboratorio Central de Salud Pública desde 1980, la Campaña provincial pudo derivar las mejores vacunas a los focos más problemáticos.

Actualmente estos valores mínimos de potencia para este tipo de vacunas se han aumentado a 1 UI para las vacunas de uso veterinario y a 1,3 UI para las de uso humano.

Al bajar la casuística en los animales, la rabia humana se hace más rara y se registran en 1981 los dos últimos casos dentro de la provincia. En 1984 se llega al último caso canino. Se detectan posteriormente algunos escasos aislamientos en murciélagos insectívoros (37).

LA PRUEBA DE LA VACUNA RECOMBINANTE VACCINIA-RABIA EN LA CIUDAD DE AZUL

Durante 1986 se realizan pruebas en el campo experimental del entonces Centro Panamericano de Zoonosis en Azul de una vacuna recombinante desarrollada por el Laboratorio Merieux, la cual se aplica a bovinos que eran ordeñados y explotados normalmente, ejerciéndose un monitoreo sanitario sobre los animales y el personal

que los trabajaba (38). Dado que dicho experimento, en los principios de los estudios de recombinantes, requería de condiciones de seguridad estrictas y por ser un virus variólico modificado se comportaba potencialmente como un agente exótico, debería haberse solicitado en primer término el permiso del Servicio Nacional de Sanidad Animal para que en primera instancia autorice el experimento. Este trámite no se hizo, lo cual ocasionó un importante problema de tipo legal sanitario, ya que un organismo internacional apareció transgrediendo las regulaciones sanitarias del país (39). El experimento abortó y luego el Centro Panamericano de Zoonosis fue reconvertido.

Para apreciar la verdadera importancia de esta prueba, hay que tener en cuenta de que se trataba una vacuna recombinante a virus activo genéticamente modificado.

Por técnicas de clonado y secuenciamiento del ácido nucleico se había llegado a la determinación de la organización del genoma del virus rábico. Se habían determinado los genes que codificaban las proteínas estructurales del virus y se trabajaba especialmente en insertar el gen que codificaba la glucoproteína (o antígeno G) del virus en otros microorganismos más fáciles de multiplicar, por ejemplo bacterias. Si la bacteria expresaba la proteína inmunizante de la rabia en su superficie, bastaría con multiplicar esta bacteria modificada y luego inactivarla para tener una vacuna fácil de producir.

Así, el gen de la glucoproteína se insertó en *Escherichia coli* y al ser inoculada esta bacteria modificada e inactivada se logró inducir anticuerpos contra la glucoproteína rábica. Como se lograba una cantidad pequeña de glucoproteína con respecto al total de cada bacteria, se buscaron soportes más pequeños y así se insertó el gen de la glucoproteína en virus de la vaccinia (40) y virus del papiloma bovino. Esta expresión de genes permitió la formulación de vacunas recombinantes. La modificación del virus pox vaccinia se quería probar sin inactivar el virus soporte, para permitir que este use su potencial infeccioso para multiplicarse en sujetos susceptibles y así inmunizarlos con la glucoproteína de rabia que llevaba codificada. Esto tenía la utilidad de poder distribuirse con cebos apetecibles para especies silvestres transmisoras de la rabia, como los zorros, zorrinos, mapaches, etc. y así inmunizarlos.

Como no se sabía si la modificación realizada podía alterar alguna otra propiedad del virus soporte, como por ejemplo brindarle neurotropis-

mo al virus vaccinia, había que probar a campo el producto. Esto debió hacerse en un ambiente controlado para evitar posibles escapes si el virus resultaba peligroso (p. ej. en lazaretos descontaminables, ubicados en zonas aisladas).

Luego de pasar otras pruebas posteriores, este tipo de vacuna (VRG (vaccinia+rabies glycoprotein) se emplea actualmente para inmunizar fauna silvestre contra la rabia, respetando determinados requisitos y normas de aplicación (41).

ACTIVIDAD ANTIRRÁBICA EN LA PROVINCIA LIBRE DE LA ENFERMEDAD

Durante 1982 el Departamento Antirrábico del Laboratorio Central de Salud Pública inicia la producción de cultivos celulares para desarrollar posteriormente la producción de vacuna antirrábica en células para uso veterinario (42).

La producción de estas vacunas empleando virus multiplicado en cultivos celulares, lo que se dio en llamar vacunas de segunda generación a diferencia de las que lo multiplicaban en encéfalo de animales que se agruparon como primera generación, estuvo motivada por la necesidad de aumentar la disponibilidad en cantidad de dosis, sumando una nueva línea de producción a la ya existente. Dado que la línea de células de riñón de hámster BHK 21 C13 (Baby Hamster Kidney 21 clon 13) ya había sido utilizada en el país en la producción de vacuna antirrábica uso veterinario por el Centro Panamericano de Zoonosis (43), se comenzó a trabajar con esta técnica empleando la cepa de virus rábico PV-BHK. La puesta en funcionamiento de la División Cultivos Celulares en el Departamento Antirrábico significó una importante inversión ya que hubo que incorporar sistemas de filtrado de medios, sistemas de rotación de frascos, agitadores de células, etc. necesarios para esta tecnología de producción. En la década del 90 se realizan las pruebas de control de calidad de las primeras vacunas antirrábicas para uso veterinario producidas a nivel estatal multiplicando el virus en células BHK. La aplicación del primer lote de esta vacuna se realizó en el centro antirrábico de Lanús. Esta vacuna se manifestó práctica en la vacunación en servicio por demanda espontánea y por estar presentada en dosis de 1 ml y sin agregado de fenol como conservante, se prefirió para su uso en gatos pequeños.

Desde esa fecha se entregaron a la campaña provincial cantidades crecientes de este tipo

de vacuna, llegando en el año 2001 a alcanzar las 100.000 dosis anuales.

El estado provincial provee a la campaña antirrábica provincial de 96.000 dosis de vacuna antirrábica uso humano y una cantidad variable de acuerdo a las posibilidades de producción y los planes a ejecutar de entre 450.000 y 750.000 dosis de vacuna de uso veterinario anuales, de las cuales el 80 % son CRL (Fuenzalida-Palacios) y el 20 % BHK. Estas vacunas son producidas en el Laboratorio Central de Salud Pública e Instituto Biológico de La Plata y se entregan a Zoonosis Urbanas de Avellaneda, que las emplea en las campañas de vacunación y realiza la distribución a los servicios antirrábicos y centros de zoonosis de los municipios de toda la provincia

El monitoreo del estado sanitario con respecto a rabia en la provincia lo centraliza la Dirección de Medicina Preventiva del Ministerio de Salud. Los servicios antirrábicos y de zoonosis comunican a la División Zoonosis Urbanas mensualmente una estadística de sus acciones (controles de animales, vacunaciones de animales, tratamientos antirrábicos de personas, diagnósticos de laboratorio efectuados y sus resultados, etc) y esta información centralizada pasa a la citada Dirección de Medicina Preventiva, que a su vez informa al Ministerio de Salud de la Nación.

Al llegarse a un mejor estado sanitario con respecto a la rabia, comienzan a evidenciarse otras preocupaciones que hasta ese momento habían sido menores. Así pasan a primer plano el problema que representaban los animales dentro de las áreas urbanas, la actividad de diversas asociaciones protectoras de animales con nuevas ideas, opiniones y metodologías de acuerdo a sus ideales, la persistencia del problema de la mordedura de animales, que sigue existiendo y aún aumenta proporcionalmente a la población y a la relación perro/hombre en las ciudades, la aparición por moda de nuevas razas de perros, exóticos hasta ese momento, en algunos casos de gran tamaño y de cualidades de agresividad mayores, el creciente grado de abandono en la vía pública de animales por problemas económicos y por no haber previsto sus propietarios la futura evolución de la mascota (44), el abandono por parte de muchos municipios del patentamiento y control de los animales callejeros, el no retiro de perros y gatos de los antirrábicos municipales y la encrucijada de éstos entre la prohibición de liberarlos y la creciente reacción ante la posibilidad de eliminarlos, entre otras.

En algunos casos la capacidad de las asociaciones protectoras de adoptar los perros y gatos que luego de los controles no fueran retirados por los propietarios permitió un canal de colocación de estos animales. Este sistema fue utilizado por el Departamento Antirrábico del Instituto Biológico de la Provincia de Buenos Aires mediante convenios celebrados con las asociaciones protectoras de La Plata. Al ir surgiendo nuevas entidades protectoras, comenzaron a participar en la problemática en la medida de sus posibilidades. En varios municipios de la provincia se han integrado convenios similares con posterioridad.

En otros municipios esto no se ha logrado. Es así que ante la conflictiva problemática de lo relacionado a este manejo, el Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires crea en 1994 por la Resolución Ministerial N° 1.752 /94 la Comisión Técnica Asesora sobre el Manejo de Poblaciones Animales en Áreas Urbanas, que se reúne inicialmente en Buenos Aires el 27 de octubre de 1994, funcionando hasta agosto de 1995, momento en el cual es reconvertida y pasa a formarse la Comisión Técnica Asesora Permanente en Normas de Procedimiento para el Manejo y Control de Poblaciones de Animales en Centros Urbanos de la Provincia de Buenos Aires y Actividades Zoonóticas, por Resolución del 22/8/95 del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires. Estas comisiones incluyen representantes del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, del Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación, de las Facultades de Ciencias Veterinarias de las Universidades Nacionales de La Plata, Buenos Aires y del Centro, del Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis, del Instituto Pasteur de la Municipalidad de Buenos Aires, del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires, de la Asociación Argentina de Zoonosis y de la Sociedad Argentina Protectora de los Animales. Se hace patente la necesidad de caracterizar el problema de la relación cuantitativa hombre/perro en diversas zonas de las ciudades de la Provincia y también la caracterización de las exposiciones a personas por mordeduras de animales, por lo cual se realizan trabajos sobre esta temática (45).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Mundial de Protección Animal (World Society for the Protection of Animals-WSPA), publican un documento emanado de su comité de expertos durante 1990 "Guía para el manejo de la población de perros" (46) del cual surge el concepto de la llamada "Tenencia responsable" de las mascotas que implica la necesaria responsabili-

dad que asume una persona al adoptar una mascota en cuanto a proporcionarle alimento, contención, afecto, cuidado a su salud y alojamiento durante toda la vida de la mascota, o sea previendo su futura evolución.

PROYECCIONES

La evolución histórica de la rabia en la provincia de Buenos Aires en los casi dos siglos en los que la enfermedad se mantuvo como endemia provincial, ha estado relacionada a importantes acontecimientos de índole política y ha mostrado etapas de variable evolución en su control. Los mejores resultados comienzan a notarse a partir de 1980 después del peor pico de la enfermedad ocurrido durante 1976. Esto es posibilitado entre otras cosas por la decisión de lograr el control, por el uso adecuado de los conocimientos sobre el tema previa adecuación a la realidad provincial, por actividad técnica e investigativa propia, desde el diseño de las campañas hasta la producción provincial de vacunas de alta calidad, la vigilancia epidemiológica y la educación para la salud, todo lo cual estuvo posibilitado por el mantenimiento de los funcionarios de todos los niveles expertos en el tema más allá de los cambios políticos.

Existen aún algunos desafíos que lograr. El primero de ellos es que la rabia no vuelva a reaparecer en el territorio provincial, para lo cual se deben mantener coberturas racionales de vacunación, realizar educación sobre la enfermedad, actualizar los métodos de control de fronteras, ejercer un ajustado control municipal con identificación de los animales y sus propietarios, evitar la proliferación de animales callejeros transmisores sin control, apoyar la actividad de las asociaciones protectoras, fomentar la tenencia responsable de las mascotas, efectuar estudios ecológicos y una constante investigación aplicada sobre el tema. De esa forma estaremos seguros que la rabia no volverá al territorio provincial y seguirá siendo uno de los ejemplos de cómo una acción sanitaria organizada, multidisciplinaria y constante logra los mejores resultados esperables con el rédito de dejar desarrollo, tecnología y bienestar con el mejor aprovechamiento de la inversión económica para el mejoramiento de la salud humana y animal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rossi F. Geografía de la República Argentina. Primera parte. Editorial Stella. Buenos Aires. (Argentina). 1971; p.352-365, 484.
2. Gallo E. La Federalización de Buenos Aires. Historia

Visual de la Argentina. Biblioteca Diario Clarín. Buenos Aires. (Argentina) 1999; p. 894-904.

3. Acha PN, Szyfres B. Rabia. En: Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Segunda edición (reimpresión 1988). Publicación Científica N° 503 OPS-OMS. (USA). 1986; p. 502-526.
4. Davis B, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg H. Rabdovirus. En: Tratado de Microbiología. 3a. Edición. Salvat Editores. (España). 1985; Cap. 61. p. 952.
5. Amasino CF. Rabia. En Enfermedades Infecciosas de los Animales. 1° Edición. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires (Argentina) 1991; p. 74-75.
6. Guarnera EA. Guía para el tratamiento de la rabia en el hombre.. Publicación especial N° 11. Programa de Salud Pública Veterinaria. Centro Panamericano de Zoonosis. OPS-OMS. Martínez. (Argentina). 1991; p.66.
7. De Diego AI. Guía Para el estudio de las Enfermedades Infecciosas de los animales. Primera Edición del Autor. Buenos Aires. (Argentina). 1974; p. 572-576.
8. Hurst and Pawan (1931) Pawan (1936) Trinidad Rabies. En: Van Rooyen, C.E. and Rhodes, A. J. Virus Diseases of man. Oxford University Press. London. (UK). 1940 p 651-653.
9. Favi M, Yung V, Pavletic B, Ramírez E, De Mattos C, De Mattos C. Rol de los murciélagos insectívoros en la transmisión de la rabia en Chile. Med Vet 1999. XXXI, (3): 157-165.
10. Amasino CF. Virus de la Rabia. En: Basualdo-Cotode Torres. Microbiología Biomédica. 1° Edición. Editorial Atlante. Buenos Aires (Argentina). 1996; p. 816-817.
11. Kaplan MM, Koprowski H. Rabies. Sci Am 1980; 242:120-134.
12. Games AB, Arena de Tejedor F, Barreneche O. Primer Congreso Nacional de Historia de los Puertos Argentinos. Tomo II. Junta de Estudios Históricos del Puerto de Nuestra Señora Santa María del Buen Ayre. Buenos Aires (Argentina). 1987; p. 55-60 y 31-37.
13. Barba FE. La expansión ganadera y las invasiones inglesas y sus consecuencias económicas. En La Provincia de los bonaerenses 1997. Fascículos 1-2
14. Folletos del Museo Fuerte Barragán. Municipalidad de Ensenada. 1995
15. La Plata. Argentina. Dirección Gral. De Prensa y Comunicación. Edición Municipalidad de La Plata. 1998; p. 31.
16. Rosa JM. Historia Argentina. Tomo 2. Editorial Oriente. Buenos Aires. Argentina. 1974; p.18-41.
17. Johnson, Harald N "Rabies" En T. Rivers & F. Horsfall.. "Viral and Rickettsial Infections of man", Capítulo 21. J.B. Lippincott Company. (USA) 1959; p. 406.
18. Gallardo G. Difusión de un antiguo flagelo Diario La Nación. Buenos Aires, 5 de mayo de 1963.

19. Uruguay. Texto del decorado de la Fortaleza Gral Artigas del Cerro de Montevideo sobre las invasiones inglesas. Registrado en enero de 2001. (Durante una visita de los autores al citado museo).
20. Archivo de la Academia Nacional de Medicina Bs As R Argentina. Protomédico Cristóbal Martín de Montúfar, Casos de rabia humana en Montevideo. 18 de mayo de 1808. Citado por Quiroga, Marcial I. Los orígenes de la Rabia en el Plata. Bol Acad Nac de Medicina. 1974; 52, 1er sem: 103-110.
21. Levene R. La cuestión capital. Cap XXXV y La fundación de La Plata Cap XXXVI.. Lecciones de Historia Argentina Ed Lajouane. Buenos Aires. (Argentina). 1951; p.426-432.
22. Perez J. Roca y la federalización de Buenos Aires. El comité. La Historia Popular. Centro Editor de América Latina. Buenos Aires (Argentina). 1970; p.42-81.
23. Pasteur L. Méthode pour prévenir la rage après morsure. Comp rend Acad Sci. 1885; 101: 765-772.
24. Cien años de vacunación antirrábica: Temas de interés general. Rev Veterinaria Argentina. 1986; III (28): 729.
25. de Torres RA. Evolución de las ideas básicas en el desarrollo de la microbiología. En: Basualdo, Coto, de Torres. Microbiología Biomédica. 1996. Editorial Atlante. Buenos Aires (Argentina). 1996; p.10.
26. Serres JR. Discurso. Pronunciado el 22 de abril de 1940, al inaugurarse el Busto de Louis Pasteur en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires. Publicación especial de la Fac. de Agronomía y Veterinaria Imprenta de la Universidad de Bs As. 1946. p.15.
27. Serres JR. Rabia. Su profilaxis en la República Argentina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. 1957; p.1-34.
28. Serres JR. La Rabia. Cartilla de divulgación Científica. Consejo Nacional de Justicia e Instrucción Pública. (Argentina). 1939.
29. Pasado, presente y futuro del Laboratorio Central de Salud Pública. Cien años de labor creadora. Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires. La Plata (Argentina). 1987; p. 9.
30. Diario El Día La Plata. Hace 50 años El edificio del Instituto Biológico Reproducción de un artículo del 12 de febrero de 1948. La Plata. 12 de febrero de 1998.
31. Seligmannn EB. Vacuna de tipo Simple. En: Kaplan MM y Koprowski H. La Rabia. Técnicas de Laboratorio. OMS. Ginebra (Suiza). 1976; p.202-209.
32. Amasino CF, Maio TA, Giménez J, Sganzzetta M. Efectividad e inocuidad de la vacuna antirrábica Fuenzalida -Palacios para uso humano evaluada retrospectivamente en un año pico de rabia. Medicina Social 1989. (2) p.61-63.
33. Fuenzalida E. Vacuna de encéfalo de ratón lactante. En Kaplan, M.M. y Koprowski, H. La Rabia. Técnicas de Laboratorio. OMS. Ginebra (Suiza). 1976; p. 229-233.
34. Larghi OP. et al Laboratory suckling-mouse brain rabies vaccine. Part III. Preservation of vaccine potency after elimination of murine brain myelin by centrifugation. Annales del Institut Pasteur. Microbiologie. 1976. 127 B: 567-572.
35. Zannoli VH, García C, Fernández R. El uso de la luz azul en el diagnóstico de la rabia por inmunofluorescencia. Bioq Clínica 1974 8, 2: 131-137.
36. Seligmann EB. Prueba de Potencia NIH. En 1976. Kaplan, M.M. y Koprowski, H. La Rabia. Técnicas de Laboratorio. OMS. Ginebra (Suiza). 1976; p. 294-302.
37. Amasino CF, Avolio J, Fava F, Fernández R, Pereira D. Rabia en murciélagos insectívoros. Nuevos diagnósticos efectuados en el laboratorio central de salud pública de la provincia de buenos aires. Veterinaria Argentina. 1986. III (28): 735-739.
38. Rosemberg L. Cuando el ingenio de la bioingeniería da rabia y La biotecnología necesita una legislación muy clara. Diario La Razón. Edición nacional. Buenos Aires. 23-24 de sept. de 1986.
39. Prohiben la experimentación de una vacuna. Diario La Nación. Noticias agropecuarias. Sept. 1986.
40. Dellepiane NI, Díaz AM. La Rabia. Situación epidemiológica en las Américas. Vacunas e Inmunidad. Revista Argentina de Microbiología. 1987. 19 (3): 132.
41. Rupprecht CE, Hanlon CA, Koprowski H. General considerations in the use of recombinant rabies vaccines for oral immunization of wildlife. En: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. Fourth edition. World Health Organization. Geneva (Switzerland) 1996; p.341-345.
42. Amasino CF, Citate JD, Rodríguez AN, Garbi CJ, Salas H. Estudios comparativos de multiplicación del virus rábico en células BHK y métodos de inactivación para su uso en producción de vacunas. Veterinaria Argentina, 1994. 11 (104): 238-241.
43. Larghi OP, Savy VL, Nebel AE, Rodriguez A. Ethylenimine-Inactivated rabies vaccine of tissue culture origin. J of Clin Microbiol 1976, 3, (1):26-32.
44. Amasino CF, González OE, Garbi CJ, Zapata JR, Losso CR, Villat MC, Coll Cárdenas FJ, Travería G. Algunos aspectos sobre la problemática de las poblaciones animales de las áreas urbanas. Boletín de la Asociación Argentina de Zoonosis. 1997. (7). p. 7-8.
45. Amasino CF, González OE, Urrutia MI, Fuentes LS. Caracterización de las exposiciones por mordeduras de animales en el partido de La Plata y alrededores. Analecta Veterinaria. 1998. 18 (1-2): 21-28.
46. WSPA-OMS: Guidelines for dog population management. Geneva. (Suiza). WHO/ZOON/90.165 1990; p.1-117.

CRIBADO ANTIHELMÍNTICO PRIMARIO: SISTEMAS PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD NEMATOCIDA *IN VITRO*

MM Martínez Grueiro

Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense de Madrid. España.

RESUMEN: Los nematodos parásitos causan enfermedades importantes al hombre y a los animales domésticos. El control de estas infecciones se apoya fundamentalmente en el tratamiento con antihelmínticos; lamentablemente, se han ido desarrollando resistencias frente a las distintas clases de antihelmínticos de amplio espectro y existe una clara necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas. La investigación farmacológica tiene indudablemente un requerimiento básico: disponibilidad de sistemas de valoración rápidos, sencillos y económicos. En esta revisión examinaremos los métodos que se han propuesto para la evaluación *in vitro* de actividad nematocida. En ellos se utilizan nematodos de vida libre y nematodos parásitos (estadios de vida libre y de vida parasitaria). La actividad se valora determinando el efecto de los productos objeto de estudio sobre el desarrollo, la viabilidad o la motilidad de distintos estadios, o bien a través de parámetros bioquímicos. Estos métodos varían en su sensibilidad, capacidad de selección, rapidez, coste y facilidad de ejecución pero en muchos casos pueden constituirse en sistemas adecuados para la preselección, previa al cribado primario en modelos animales, de antihelmínticos potenciales.

Palabras clave: cribado antihelmíntico, nematocida, «*in vitro*»

PRIMARY ANTHELMINTIC SCREENING: SYSTEMS FOR THE EVALUATION OF *IN VITRO* ANTHELMINTIC ACTIVITY

ABSTRACT: Nematode parasites cause serious infectious diseases in humans and domestic animals. Control of these infections relies mostly on chemotherapeutics, but resistance has developed against most of these broad-spectrum drugs in many parasite species. Discovery and development of new agents effective against the nematodes of major economic or medical importance is necessary now. An important basic requirement for the discovery of chemotherapeutic drugs is the testing facilities. In this paper, *in vitro* techniques used for the detection and measurement of anthelmintic activity are reviewed. The primary systems employed for this purpose utilize free-living nematodes and free-living and parasitic stages of parasitic nematodes. Interpretation of nematocidal activity in these assays commonly relied on the detection of drug-induced effects on nematode development, viability, motility or biochemical parameters. Such screens vary in their sensitivity, selectivity, cost, rapidity and ease of execution, but afford useful and economical means for the initial selection of new compounds for further more detailed evaluation in animal models.

Key Word: antihelmintic screening, nematocide, "*in vitro*"

Fecha de recepción: 07/03/02

Fecha de aprobación: 05/04/02

Dirección para correspondencia: Martínez Grueiro, M.M. Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España.

E-mail: mgrueiro@farm.ucm.es

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de las helmintosis que afectan al hombre y a los animales domésticos puede plantearse hoy desde nuevas perspectivas (1, 2, 3), pero la mayor parte de los antiparasitarios actuales tuvieron su origen en el cribado empírico masivo de productos de síntesis o de origen natural, y en la explotación racional de sus resultados. Esta vía ha sido y sigue siendo uno de los caminos fundamentales para la búsqueda de nuevos medicamentos, pero sólo será viable si se dispone de sistemas de ensayo simples y económicos que permitan valorar un gran número de compuestos, operando con cantidades mínimas de producto, y que nos ofrezcan la mayor sensibilidad y especificidad posible. Los sistemas *in vitro* tratan de responder a esta necesidad; sus limitaciones son obvias pero sus ventajas nada desdeñables, y por ello se convierten habitualmente en el primer paso de lo que, en el mejor de los casos, será una larga serie de pruebas que nos conducirá a un nuevo agente terapéutico.

En esta revisión examinaremos los distintos sistemas que se han propuesto para la valoración *in vitro* de actividad nematocida (o para la detección de antihelmínticos de amplio espectro), entendiendo que estas pruebas constituyen el primer nivel de cribado y que los productos que lo superen serán sujeto siempre de ensayos *in vivo* (cribado primario *in vivo*). Las pruebas *in vitro* se realizan con nematodos de vida libre y nematodos parásitos; los primeros pretenden ser, en palabras de Tiner (4), un "simulador aceptable" del parásito *in vitro*. Entre los segundos se incluyen especies "diana", parásitos del hombre o de los animales que constituyen el objetivo final de los potenciales antiparasitarios, y especies próximas, parásitos propios de los animales de experimentación más económicos, cuyos ciclos biológicos pueden mantenerse en el laboratorio.

NEMATODOS DE VIDA LIBRE

El uso de nematodos de vida libre en ensayos farmacológicos es muy antiguo y coexiste en sus orígenes con el de otros organismos no parásitos o ectoparásitos, tales como oligoquetos o hirudíneos (5); estos últimos pronto serán desestimados pues están muy lejos de poder representar a las especies que se desea combatir. Los nematodos de vida libre, sin embargo, seguirán utilizándose hasta nuestros días. La facilidad de su cultivo, ya sea en condiciones monoxénicas o axénicas, y sus cortos ciclos biológicos, posibilitan la obtención de un gran número de individuos; so-

bre ellos o sobre su desarrollo se evaluará la actividad nematocida. El valor de estos sistemas como indicadores de actividad antiparasitaria es discutible, pero persisten como métodos sensibles, sencillos, rápidos y económicos para la preselección de antihelmínticos o nematocidas potenciales.

Una de las primeras especies utilizadas fue *Rhabditis pseudoelongata* (syn. *Rhabditis macrocerca*), un rhabditido saprozoico que se aísla de heces de conejos silvestres (6, 7, 8, 9). Tras los primeros trabajos publicados, y a la vista de la escasa sensibilidad del modelo, se abandonó su uso; no obstante, en 1981 es utilizado de nuevo por Brienne *et al.* (10) para la valoración de una serie de compuestos análogos al tetramisol. Las experiencias de estos investigadores ponen de manifiesto la gran sensibilidad de *R. pseudoelongata* al levamisol y tetramisol; su concentración letal 50 (CL₅₀) se estimó en 0,25 y 0,4-0,5 µg/ml respectivamente. La respuesta ante otros antihelmínticos no es tan satisfactoria; tiabendazol y befenio presentan una CL₅₀ de 50 µg/ml, mebendazol 100 µg/ml y flubendazol, piperacina y pirvinio superiores a 100 µg/ml. Este modelo sería nuevamente utilizado por investigadores franceses para valorar productos de síntesis análogos al levamisol (11, 12), derivados amidínicos azolados (13) y arsenicales trivalentes (14). El procedimiento, en líneas generales, consiste en incubar los nematodos (larvas y adultos), durante 2 horas (a veces 24 horas), en oscuridad, a 25-27 °C, en la presencia de los compuestos objeto de estudio; al cabo de este tiempo se determina el porcentaje de mortalidad para cada concentración ensayada y se calcula la CL₅₀.

Otras especies como *Rhabditis strongyloides* (4, 15), *Rhabditis pellio* (4), *Acroboloides obtusicaudatus* (16), *Rhabditis oxycerca* (17,18) y *Panagrellus redivivus* (17, 18, 19), también se han empleado ocasionalmente en la valoración de actividad nematocida.

En 1952 se propuso la utilización de *Turbatrix aceti*, "la anguila del vinagre", como modelo experimental para el cribado antihelmíntico (20); en la literatura hemos encontrado muy pocas referencias a su uso (21, 22). Vanfleteren y Roets (23) determinaron el efecto de algunos antihelmínticos sobre el crecimiento de poblaciones de *T. aceti* y *Caenorhabditis briggsae* en cultivo axénico. Según estos autores, ascaridol, befenio, d-tubocurarina y piperacina no afectan a estos nematodos; fenotiacina y hexilresorcinol inducen una inhibición moderada, y pirvinio, ditiазanina y tiabendazol son muy eficaces. *C. briggsae* ya

había sido utilizado en los años 50 y 60; habiéndose observado mayor sensibilidad al valorar el efecto sobre el crecimiento de la población (24). En 1965, Tiner (4) afirmó que *C. briggsae*, al igual que *Rhabditis strongyloides* y *Rhabditis pellio*, no constituían sistemas válidos para estudiar actividad nematocida, pues estos nematodos crecían y se reproducían en presencia de fenotiacina. Con *C. briggsae*, Fiakpiu (25) estudió el mecanismo de acción de la piperacina.

Entre los nematodos de vida libre, utilizados en estudios de quimioterapia experimental, ocupa un lugar privilegiado *Caenorhabditis elegans*. Este pequeño nematodo, cuyo hábitat natural es el suelo (vive en la fina película de agua que rodea las partículas de tierra), posee una serie de atributos (anatomía muy simple, corto ciclo biológico, facilidad de cultivo, pequeño genoma, etc) que lo convierten en un excelente modelo experimental para el estudio de diversos problemas biológicos. En este contexto, su utilización en estudios farmacológicos es sólo una de sus múltiples facetas y no la de mayor relevancia. Son Platzer, Eby y Friedman (26) quienes proponen su uso como modelo para la búsqueda de nuevos antihelmínticos y para el estudio del mecanismo de acción de los derivados bencimidazólicos, tras comprobar que los bencimidazoles (mebendazol, cambendazol, oxibendazol, parabendazol, fenbendazol y tiabendazol) inhiben su crecimiento. Simpkin y Coles (27) sistematizan el uso de *C. elegans* como modelo de cribado; establecen un método y determinan la sensibilidad de este nematodo a distintos antihelmínticos, así como su capacidad de selección en el cribado. Las pruebas se realizan en placas de 24 pocillos; los vermes (10-20/pocillo) procedentes de un cultivo de 4-8 días se incuban a 20 °C, durante 7 días en presencia de los fármacos. El medio de cultivo se compone de un tampón, un cultivo de *Escherichia coli*, ampicilina y nistatina (la ampicilina inhibe la multiplicación bacteriana, reduciendo las probabilidades de que los productos a valorar sean metabolizados). Transcurrido el periodo de incubación se procede a la observación y comparación de los pocillos con y sin fármaco (n=2). Se distinguen dos grupos de vermes, inmaduros y portadores de huevos. La dosis activa mínima detectable (DMD) se define como la dosis más baja, activa en uno de los grupos o dudosa en los dos, según el siguiente baremo:

- Activo: presencia de un número de vermes igual o inferior al inicial
- Dudoso: población ligeramente superior
- Inactivo: gran incremento en el número de vermes

El modelo reconoce la actividad de todos los antihelmínticos de amplio espectro y es especialmente sensible a la avermectina B1a.

Haber *et al.* (28), Conder *et al.* (29) y Dutton *et al.* (30) utilizan el método de Simpkin y Coles (27); en el primero de estos trabajos, la eficacia se valora, por observación microscópica, asignando valores de 0 a 5 en función del número de supervivientes (5, ninguno; 4, de 1 a 5; 3, de 6 a 10; 2, de 11 a 20; 1, de 21 a 50, 0 >50).

En nuestro laboratorio, *C. elegans* se mantiene desde 1983, mediante resiembras sucesivas y criopreservación en nitrógeno líquido. Siguiendo los métodos descritos por Brenner (31), los nematodos se cultivan a 20±1 °C, en placas de Petri sobre agar NG ("nematode growth") previamente sembrado con *E. coli* (cepa OP50, deficiente en uracilo). Para el cribado primario hemos utilizado el sistema descrito por Simpkin y Coles (27) con algunas modificaciones (32); básicamente, se determina el efecto de los productos, sobre el desarrollo y la capacidad reproductiva, cuantificando los niveles de población alcanzados, a partir de un pequeño número de vermes en el mismo estado de desarrollo, en los pocillos testigo y problema (n=8), tras los siete días de incubación, y estableciendo los correspondientes porcentajes de reducción. La primera modificación supone la utilización de una población sincrónica, larvas de segundo o tercer estadio que se obtienen siguiendo el método de Hirsh, Oppenheim y Klass (33). La segunda modificación -la sustitución de la observación directa por el recuento en cámara McMaster- fue también realizada por Coles (34) y otros autores, si bien, coincidimos con Coles (35) en que puede prescindirse de ella, si se desea afrontar el cribado de un gran número de compuestos.

C. elegans es muy sensible a los derivados bencimidazólicos, aunque los huevos de este nematodo parecen ser menos sensibles que los de los nematodos parásitos (36). En nuestros ensayos, al realizar el examen microscópico de las poblaciones expuestas a estos fármacos (durante el proceso de recuento), observamos que las larvas más jóvenes exhibían su motilidad característica mientras que los últimos estados larvarios y especialmente los adultos no se movían y cuando lo hacían era de forma espasmódica e irregular (37). Spence *et al.* (38), autores de un detallado estudio que recoge los efectos del mebendazol, sobre el crecimiento, desarrollo y capacidad reproductiva de *C. elegans*, registraron un comportamiento similar: el movimiento de las L₁ y L₂, cultivadas en

presencia de mebendazol (6,25 µg/ml), era normal; la parálisis comenzaba a evidenciarse en el estadio de L₃ y era severa desde el estadio de L₄. Recientemente también se ha señalado que las L₁ de *C. elegans* son menos sensibles a la inmovilización por clorpromacina que los adultos (39).

Simpkin y Coles (27) recomendaron que el cribado de nuevos compuestos se iniciase con dosis de 50 µg/ml. Ellos valoraron 445 compuestos, ensayados previamente en ratón; entre los productos que el sistema reconoció como activos (62), se encontraban todos los que habían mostrado actividad *in vivo* sobre nematodos. No detectaron por tanto "falsos negativos", pero cabe suponer que si obtuvieron "falsos positivos". Se ha estimado que el 10 % de los productos valorados en este sistema (50 µg/ml) resultan activos (40, 41); Jenkins (40) considera que esto supone un nivel de preselección aceptable, aunque critica el modelo por su escasa sensibilidad al pirantel (DMD 50 µg/ml) y al tiofanato (DMD 250 µg/ml). La capacidad de selección de *C. elegans* no es obviamente la ideal, al igual que los demás sistemas *in vitro* será sensible a compuestos con actividad biocida (35) pero, como señala Coles (42), su bajo coste y el hecho de que no requiere animales de experimentación probablemente justifican su uso continuado como sistema de preselección, previo al cribado primario *in vivo*.

Nosotros habitualmente iniciamos el cribado, en el caso de productos de síntesis, con concentraciones de 100 µg/ml; si 50 µg/ml representa el límite de eficacia de un antihelmítico como pirantel nos pareció preferible partir de una concentración mayor, aunque no mucho mayor puesto que esto incrementaría el número de falsos positivos ya de por sí elevado. Por otra parte, observamos que el pirantel a 25 µg/ml no afecta a la capacidad reproductiva de los vermes pero sí reduce considerablemente su motilidad. Este hecho nos sugirió la conveniencia de tener en cuenta, a la hora de evaluar nuevos compuestos, su repercusión sobre la motilidad (37); al menos en una ocasión, nos hemos encontrado ante un producto que redujo la motilidad sin inhibir apenas el crecimiento de la población y que mostró posteriormente actividad nematocida *in vivo* (43).

La motilidad se ha empleado como criterio único de valoración en ensayos más simples realizados con *C. elegans*. Básicamente, en estas pruebas ("motility assays"), los nematodos recogidos de las placas de cultivo, tras varios lavados, se ponen en contacto con los productos (en tubos o placas, en el tampón de lavado) durante 2, 16, 18

ó 24 horas. Finalmente, se examinan al microscopio y se determinan las concentraciones que inmovilizan al 50, 90 o 95 % de los vermes (44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 y 52, entre otros). En un trabajo reciente se utilizan el método de cultivo de 7 días (27) y el de motilidad de 2 horas (46), observándose, como cabía esperar, que el primero es más sensible (53).

C. elegans es también un modelo experimental útil en estudios toxicológicos; en este campo, se han utilizado distintos criterios de valoración, fundamentalmente letalidad (54), reproducción (55) y "comportamiento" (56, 57). Este último parámetro, evaluado a través de un sistema informatizado de análisis de imágenes, no se ha probado todavía con un rango amplio de productos, pero los resultados obtenidos hasta el momento denotan una gran sensibilidad, equiparable a la que ofrece la valoración de la capacidad reproductiva. Evidentemente, este sistema exige unos recursos técnicos considerables, pero el software ya ha sido desarrollado, y podría suponer una alternativa muy satisfactoria para la evaluación de actividad antihelmítica.

Una variante un tanto particular de los sistemas desarrollados con *C. elegans* para detectar actividad nematocida la constituye el denominado "water agar assay", diseñado específicamente para detectar hongos capaces de destruir nematodos (48). En él, pequeñas piezas de agar (10 mm Ø) de los cultivos del hongo y del nematodo se colocan en posiciones opuestas sobre placas de agar-agua. Las placas se examinan diariamente; a los 3-7 días, aquellos hongos que manifiestan efectos nematocidas (muchos nematodos inmóviles o muertos en las proximidades del micelio) se seleccionan para estudios posteriores. Mayer, Anke y Sterner (58) en lugar de una porción del medio con nematodos colocan, en la misma posición, una suspensión de larvas (1000 larvas/200 µl). En este último trabajo, y en otros que se han mencionado, el cribado está orientado hacia la búsqueda de productos activos frente a nematodos parásitos de plantas.

Las posibilidades de *C. elegans* como modelo experimental, en el campo de la quimioterapia antihelmítica, no se restringen a su utilización como sistema de cribado, también es un organismo apto para el estudio de los mecanismos de acción y de resistencia; la bibliografía en esta área es muy extensa e inabordable en esta revisión.

Una de las propuestas más recientes, en relación al uso de nematodos de vida libre como

sistemas de cribado primario, se debe a Yanagida *et al.* (59). Estos investigadores aislaron los nematodos del suelo del Campus de la Universidad de Toho (Japón); fueron identificados como miembros de la Clase Secernentea, Orden Rhabditida, Familia Diplogastridae. Yanagida *et al.* (59), tras establecer las condiciones para su cultivo, desarrollaron un sistema para valorar actividad nematocida. En sus pruebas, las larvas de tercer estadio se incuban a 28 °C, durante 4 horas, con y sin los productos objeto de estudio, y tras este periodo se determinan los porcentajes de letalidad y se calcula la concentración mínima letal. Se trata además de correlacionar la forma que adoptan las larvas con el mecanismo de acción de los fármacos de referencia. Las concentraciones mínimas letales de algunos de los antiparasitarios probados son las siguientes: levamisol 8 µM, metrifonato 16 µM, avermectina 150 µM, citrato de piperacina 630 µM, albendazol 310 µM, tiabendazol 200 µM, clorhidrato de quinina 310 µM, pamoato de pirantel > 100 µM, dietilcarbamacina 30 mM. Este método se ha utilizado para valorar la actividad nematocida de 22 picrodendrinas (60) y 38 quasinoideos (61), y para realizar los correspondientes estudios de relación estructura-actividad. No disponemos de datos sobre la actividad *in vivo* de estos compuestos.

Finalmente, en este apartado incluiremos una última especie muy diferente a las anteriores, ya que no es un organismo de vida libre sino un fitoparásito, nos referimos a *Bursaphelenchus xylophilus* (*syn. B. lignicolus*); su inclusión se justifica por el hecho de que su ciclo biológico, al igual que el de los nematodos de vida libre, se mantiene íntegramente *in vitro*. Este nematodo (*Aphelenchida*) es parásito de coníferas y produce una enfermedad muy grave en los árboles; su valor potencial como modelo experimental se ve por tanto incrementado al tratarse de una especie patógena y consecuentemente "diana" *per se* de los hipotéticos agentes farmacológicos que puedan seleccionarse con él.

En el laboratorio, *B. xylophilus* crece sobre cultivos de *Botrytis cinerea* en agar Czapek-Dox o patata-glucosada. Se han descrito distintos procedimientos para la valoración de actividad nematocida; Kimura *et al.* (62) y Otaguro *et al.* (63) evalúan el efecto paralizante o letal de los compuestos, determinando la capacidad de los nematodos para atravesar papel japonés (papel para escribir tipo Kokuyo, Tai-19). En el último trabajo citado, los nematodos se mantienen en contacto con los productos durante 18 horas, en pequeños tubos de vidrio, tapados con el papel japonés. Al

cabo de este tiempo, los tubos se invierten sobre los pocillos de una placa de 24 pocillos en los que se ha dispuesto una solución de estreptomina. Tras una incubación adicional de 3 horas a 27 °C, se examinan los pocillos a fin de estimar la mortalidad, aplicando la siguiente ecuación: mortalidad (%) = {1 - [A + (B x 0,5) + (C x 0,25) / D]} x 100, donde A, B, y C son el número de gusanos que exhiben una motilidad normal, moderada o escasa respectivamente, y D es el número de gusanos vivos en el control. En estas condiciones, la CI₅₀ de la avermectina B1a es 0,1 µg/ml.

Alen *et al.* (64, 65) siguen el método de Kawazu *et al.* (66) con algunas modificaciones. En una placa de Petri (4 cm Ø), en la que se ha cultivado el hongo (a 21 °C durante 4 días), se coloca una bolita de algodón (5 mm Ø) con el producto a ensayar (máximo 20 mg); en el algodón se inyecta la suspensión de nematodos (0,1 ml/1500 vermes) y la placa se incuba a 26 °C, 4 días. Si los nematodos no consumen el micelio, el producto se considera activo; en caso contrario, inactivo. La dosis mínima eficaz será la dosis menor que inhibe el consumo del micelio.

Otros investigadores trabajan con dos especies de *Bursaphelenchus*: *B. xylophilus* y *B. mucronatus*; sobre ambas se determina el efecto paralizante o letal de los productos, tras 24 horas de incubación a 25 °C, por observación visual (si permanecen inmóviles y no responden al contacto se consideran muertos). Con la primera especie, también se realizan pruebas de comportamiento que nos recuerdan los antibiogramas clásicos. En el centro de una placa de Petri, con agar, se dispone una gota de una suspensión de L₄ y adultos (40 µl/10.000 vermes); cuando se seca, se colocan a su alrededor (equidistantes del centro y del margen de la placa) 4 discos de papel de filtro a los que se incorporó previamente el producto en estudio (en uno de ellos el disolvente). Tras 0,5, 1 ó 2 horas a temperatura ambiente, se examinan las placas para observar si se produce un efecto "tóxico" -nematodos muertos o inmóviles alrededor del disco- o "repelente" - los nematodos se distribuyen por toda la placa, salvo en los márgenes del disco (52).

NEMATODOS PARÁSITOS

Los nematodos parásitos, especialmente aquellos que son el objetivo final de la quimioterapia, representan *a priori* el sistema más adecuado para la evaluación *in vitro* de actividad nematocida; sin embargo, la especificidad de hospedador de muchas de estas especies hace imposible o difícil su utilización, ya que no pueden mantenerse

en animales de experimentación o requieren hospedadores muy costosos. Por otra parte, ninguno de ellos puede cultivarse íntegramente *in vitro*. Estos problemas han determinado el uso alternativo de especies propias de los animales de laboratorio, particularmente de los más económicos, el ratón y la rata.

Para la valoración de actividad antihelmíntica se han utilizado muy a menudo los estadios de vida libre de los nematodos parásitos, especialmente del Orden Strongylida. Las razones son obvias; el desarrollo de estos estadios *in vitro* es fácil (no ocurre así con los estadios parásitos) y, además, pueden obtenerse en número elevado, sin necesidad de sacrificar a sus hospedadores. Estos sistemas aportan una gran economía de medios y, en general, niveles de sensibilidad aceptables; en su contra, cabe decir que, al igual que los modelos desarrollados con nematodos de vida libre, seleccionan una mayor proporción de falsos positivos que los sistemas que emplean estadios de vida parasitaria.

Entre los primeros trabajos publicados, se encuentran los realizados por Shorb y Habermann (67), con larvas de tricostrongídeos de oveja, Levine (68), con larvas de estrongídeos de caballo, Deschiens (69), con larvas de *Haemonchus contortus*, Tiner (70), con los estadios de vida libre de *Obeliscooides cuniculi* y *Trichostrongylus calcaratus*, Leland y Bogue (71), con huevos y larvas de *Strongyloides ransomi*, y Parnell (72), con larvas de estrongídeos y tricostrongídeos. El examen de estos primeros trabajos y de los publicados posteriormente nos muestra que los esfuerzos se han orientado en tres direcciones; básicamente, se ha tratado de determinar el efecto de los compuestos objeto de estudio sobre el desarrollo de los huevos (embrionamiento y eclosión), sobre determinados estadios larvarios o sobre el desarrollo desde huevo a larva de tercer estadio (L₃).

La actividad ovicida de los bencimidazoles es bien conocida (73, 74, 75) y las pruebas que evalúan el efecto de estos fármacos sobre el desarrollo de los huevos (76, 77, 78, 79) se contemplan fundamentalmente como sistemas para la valoración *in vitro* de la resistencia a estos antihelmínticos. La resistencia al levamisol también se estima de modo similar, basándose en la capacidad de este fármaco para inhibir la eclosión (80). El valor de estas pruebas como sistemas de preselección de antihelmínticos potenciales es muy limitado; los ensayos realizados con fármacos de referencia denotan un espectro de sensibilidad

muy reducido. Coles y McNeillie (81) estudiaron el efecto de varios antihelmínticos sobre el desarrollo de los huevos de *Nematodirus spathiger*. Los huevos se incuban en presencia del producto, durante 3 días a 27 °C, y se determina el porcentaje de embrionamiento. Los bencimidazoles (tiabendazol, cambendazol, parabendazol, oxiabendazol, albendazol, mebendazol y fembendazol) muestran una gran actividad, apreciable a concentraciones de 0,5 p.p.m. ; por el contrario, tetramisol, levamisol, pirantel, morantel, pamoato de pirvinio, yoduro de estilbacio y tiofanato no inhiben el embrionamiento de los huevos. El cribado de 2.000 compuestos, elegidos al azar, proporcionó relativamente pocos "activos" (63 compuestos). Nosotros hemos determinado el efecto de 14 antihelmínticos sobre el desarrollo de los huevos de *Heligmosomoides polygyrus* (a 20 °C embrionan en 24 horas y eclosionan a las 40 horas de incubación). Observamos que sólo los bencimidazoles (y no todos ellos) inhiben el embrionamiento y la eclosión, mientras que el levamisol tan solo inhibe la eclosión; otros antihelmínticos de amplio espectro tan relevantes como la ivermectina no muestran actividad (82). A pesar de ello, entendemos que estas pruebas, rápidas y sencillas, pueden complementar otros estudios *in vitro* y ofrecer información adicional; nosotros las hemos utilizado ocasionalmente, con otros modelos, en la valoración de actividad nematocida (83, 84).

Otros autores utilizan en sus ensayos un estado larvario determinado, muy a menudo L₃ de tricostrongiloideos; éstas ofrecen una ventaja adicional, sobre otros estadios de vida libre, que es la posibilidad de conservación durante periodos de tiempo prolongados. Schulz, en 1974 (85), comunicó que compuestos con actividad antihelmíntica reconocida no afectaban a las larvas de *Oesophagostomum* sp. *in vitro*, indicando que este modelo no era apto para las pruebas de cribado. Boisvenue *et al.* (86) valoran la actividad de 25 antihelmínticos frente a L₃ desenvainadas de *Haemonchus contortus*. El criterio de actividad aplicado es la pérdida de motilidad o muerte de las larvas, tras su incubación durante 24 horas con el fármaco. La subjetividad de la interpretación es minimizada, según estos autores, por la gran motilidad que caracteriza a estas larvas y por el hecho de que las observaciones las realiza siempre la misma persona. El sistema es particularmente sensible a la ivermectina y al levamisol, pero otros antihelmínticos, entre ellos los bencimidazoles, se muestran inactivos. Boisvenue *et al.* criban un total de 5.280 compuestos; aproximadamente, un 5% denotan actividad a la concentración de 100 µg/ml (86).

La evaluación de actividad antihelmíntica a través de la apreciación visual directa, por un observador, de motilidad o viabilidad ha sido criticada por su dificultad y subjetividad, pero es uno de los criterios de uso más generalizado. Lo emplean, por ejemplo, Hood *et al.* (87) y Blanchflower *et al.* (88) en las pruebas *in vitro* con L₃ de *H. contortus* para el estudio de una nueva serie de milbemicinas, y de paraherquamida y otros metabolitos de *Penicillium* sp., respectivamente. Estos ensayos se realizan en placas de microtitulación, en cuyos pocillos se disponen los extractos disueltos en metanol hasta su evaporación. Se añaden a continuación las larvas y, tras una noche de incubación a 4 °C, las placas se dejan a temperatura ambiente y se examina, visualmente, la motilidad de las larvas. Del mismo modo se actúa en el sistema desarrollado por Gill *et al.* (89), con L₃ de *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, y *Ostertagia circumcincta*, para la valoración de resistencias y que se ha utilizado en la evaluación de antihelmínticos potenciales, paraherquamida (90) y bafilolidas (91) entre otros. En él, las L₃ se disponen en los pocillos de una placa (placas de 96 pocillos) en los que se ha colocado el producto en solución y una matriz de agar al 2 %. Las placas se mantienen a 25 °C, en oscuridad, y se exponen a la luz durante 20 minutos cada 24 horas para inducir la motilidad. A las 72 horas, se determina visualmente el número de larvas mótils (se consideran como tales sólo aquellas que muestran el movimiento sinusoidal normal) y no mótils, y se calcula la concentración requerida para paralizar al 50 % de las larvas.

Los intentos de objetivar la valoración del efecto de los fármacos sobre la motilidad de las larvas pasan por el uso de fotodetectores (sistemas automatizados de medida) y el desarrollo de sistemas que evalúan la capacidad migratoria de las larvas. Bennett y Pax (92) diseñaron un instrumento (Micromotility Meter™, B&P Instruments, Mason, USA) para cuantificar la motilidad de larvas y adultos, de nematodos parásitos o de vida libre. Con este aparato se ha evaluado el efecto de distintos antihelmínticos sobre L₃ envainadas de *H. contortus* (93, 94), *T. colubriformis* (95) y *Strongylus edentatus* (96). En estas condiciones la sensibilidad de los modelos se incrementa significativamente; en las experiencias de Boisvenue *et al.* (86), antes mencionadas, el albendazol (100 µg/ml) no producía efectos apreciables sobre la motilidad de las larvas de *H. contortus*; Folz *et al.* (93, 94), con el nuevo sistema, registran reducciones del 58 % y 91 % en el índice de motilidad. La mayor sensibilidad del sistema automatizado también se evidencia en la respuesta ante otros fár-

macos cuyos efectos son evidentes en observación directa; Geary *et al.* (97) señalaron que las concentraciones de ivermectina requeridas para afectar a la motilidad de adultos de *H. contortus* ($\geq 10^{-8}$ M) eran mucho más bajas que las necesarias para apreciar pérdida de motilidad visualmente (10^{-6} M).

La capacidad migratoria de las larvas -medida de su motilidad-, tras la exposición a sustancias con potencial actividad antiparasitaria, se puede estimar mediante el uso de geles de agar (98, 99) o de pequeños tamices de nylon (100, 101). En el primer caso, las larvas se ponen en contacto con el producto a valorar, y tras 2 ó 3 horas de incubación a 37 °C se incorpora al tubo agar (1,4%) a 45 °C; la mezcla se coloca en un tamiz que se sitúa sobre una pequeña placa de Petri que contiene el producto en estudio a la misma concentración. Tras un nuevo periodo de incubación, 16 horas o más, ahora a temperatura ambiente, los tamices se retiran y se cuenta el número de larvas que han abandonado el gel de agar. En los ensayos realizados con larvas desenvainadas de *T. colubriformis*, ivermectina, levamisol y morantel, a concentraciones entre 1 y 10 µg/ml, y tiabendazol, a concentraciones superiores a 10 µg/ml, inhiben la migración. Con este sistema, Douch y Morum (99) determinaron la CE₅₀ (concentración requerida para inhibir al 50 % de las larvas) del levamisol frente a L₃ envainadas y desenvainadas de siete especies de tricostrongílidos de oveja, observando sólo diferencias significativas entre el uso de unas u otras en el caso de *N. spathiger*. En este sentido, tal vez convenga señalar que se han observado diferencias acusadas entre el efecto del levamisol y la ivermectina sobre la motilidad de larvas envainadas y desenvainadas de *H. contortus*, siendo estas últimas menos sensibles; si esto se debe a la presencia de la vaina o al tratamiento que se aplica para desenvainarlas no se ha elucidado (39), pero como indican Conder y Johnson (103), cuando se realizan estudios *in vitro* con larvas desenvainadas, debe tenerse en cuenta que los procedimientos de desenvainamiento pueden afectar a la viabilidad de las larvas.

Wagland *et al.* (100) y Rabel, McGregor y Douch (101) valoran la motilidad de las larvas determinando su capacidad para atravesar pequeños tamices de nylon con luz de malla adecuada (tubos de vidrio o plástico en cuyo extremo se dispone una malla de nylon; la abertura de malla se elige a tenor del tamaño de la larva). Las larvas se incuban con el producto objeto de estudio durante 2 horas y a continuación se transfieren (con la solución en la que se encuentran) a los tamices

que se han colocado en los pocillos de una placa de cultivo (placas de 48 pocillos). Tras 14-16 horas de incubación, los tamices se retiran, se añade lugol a los pocillos y se cuentan las larvas (la lectura, si se desea, puede diferirse). Las pruebas realizadas con L₃ desenvainadas de *T. colubriformis* revelan que ivermectina, levamisol, morantel y piperacina inhiben la migración larvaria, mientras que el tiabendazol tiene un efecto mínimo a concentraciones inferiores a 100 µg/ml. Este sistema ha sido utilizado por Molan *et al.* (104, 105, 106) para valorar el efecto de taninos condensados y lactonas, extraídos de distintos forrajes, sobre L₁ y L₃ de *Dictyocaulus viviparus*, y L₃ de *Ostertagia*, *Oesophagostomum*, *Cooperia*, *Trichostrongylus* y *Strongyloides*.

Algunos autores sostienen que la viabilidad de las larvas infectantes tratadas *in vitro* debe estimarse a través de la inoculación a hospedadores sensibles o bien mediante un sistema de cultivo, capaz de soportar el desarrollo de los estados parasitarios (107). La primera vía supone la utilización de animales de laboratorio, al igual que en una prueba *in vivo*, pero preserva una de las ventajas más destacable de los sistemas *in vitro*, que es la posibilidad de operar con cantidades muy pequeñas de producto, puesto que el tratamiento se realiza *in vitro*. Bhopale y Bhatnagar (108) evaluaron el efecto de diversos antihelmínticos sobre la capacidad infectante de L₃ de *Ancylostoma caninum* (inoculación a ratón); los derivados bencimidazólicos no mostraron actividad larvicida. Nuestra experiencia en este contexto se limita al uso de L₃ de *H. polygyrus*; cuando éstas se incuban durante 4 días a temperatura ambiente en presencia de tiabendazol, parbendazol o mebendazol (100 µg/ml), su capacidad infectante se reduce en un 40 %, 38 % y 0, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento con pirantel, levamisol o ivermectina (concentraciones iguales o inferiores a 1 µg/ml) reduce drásticamente su viabilidad (109).

En general, y tal como hemos ido viendo, los sistemas desarrollados con larvas de tercer estadio de trichostrongiloideos pecan de escasa o nula sensibilidad a los bencimidazoles; aunque sí parecen representar muy satisfactoriamente una de las dianas (o conjunto de dianas) más importantes de la quimioterapia antihelmíntica, el sistema nervioso o la coordinación neuromuscular. De este marco general, habría que excluir el sistema desarrollado por Bories *et al.* (110) con larvas infectantes de *Nippostrongylus brasiliensis*, que es muy sensible a los derivados bencimidazólicos. En este caso, las L₃ se incuban en condiciones axénicas,

en medio RPMI con suero fetal (10 %) y antibióticos, a 37 °C y en una atmósfera con un 10 % de CO₂. Las larvas se mantienen en contacto con los productos objeto de estudio durante 24/96 horas y se examina, tras estos periodos, su motilidad. La CE₅₀ (concentración que paraliza al 50 % de las larvas), a las 96 horas, de albendazol, mebendazol, flubendazol y tiabendazol es inferior a 0,04 µM. El modelo es comparativamente menos sensible a los antihelmínticos de amplio espectro que actúan a nivel neuromuscular, levamisol (CE₅₀ 0,07 µM), ivermectina (CE₅₀ 0,22 µM) y morantel (CE₅₀ 3,98 µM). Este método ha sido reiteradamente utilizado por investigadores franceses, en la evaluación de la actividad antiparasitaria de nuevos productos de síntesis (11, 14, 111, 112, 113).

Otros investigadores, interesados fundamentalmente en la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de las nematodosis tisulares, han optado por el uso de las larvas de segundo estadio (L₂) de *Toxocara canis*. En sus primeros trabajos (114, 115, 116), el efecto de los productos sobre las larvas se valora visualmente, a través de la aplicación de un baremo que puntúa su estado de 0 (larva muerta) a 3 (la larva mueve todo el cuerpo); se calculan unos "índice de motilidad" y la "motilidad relativa" (relación entre los índices de motilidad de larvas testigo y tratadas). Posteriormente, ante la dificultad de determinar si las larvas están vivas o muertas, realizan una prueba adicional, una tinción con violeta de genciana para estimar la viabilidad larvaria (117, 118). Cualquiera de estos procedimientos es laborioso al exigir el examen microscópico de las larvas. Finalmente, recurrirán a un método colorimétrico basado en la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), y consecuente producción de cristales de formazán que se correlaciona linealmente con el número de larvas vivas. Los cristales se disuelven en DMSO (dimetilsulfóxido), sin o con un tampón glicina pH 10,5, y la absorbancia de la solución resultante se mide a 540 nm; comparando las absorbancias correspondientes a larvas testigo y tratadas (porcentajes de reducción) se establecen los "índices de citotoxicidad" (119). El sistema, según sus autores, es adecuado para medir actividad larvicida aunque requiere un número mayor de larvas que los métodos anteriores; previamente se había empleado para valorar la viabilidad de otros nematodos - filarias - (120, 121, 122, 123, 124), un grupo muy peculiar que no se contempla en esta revisión.

Las L₂ de *Ascaris suum* también se han utilizado para la valoración *in vitro* de actividad anti-

helmíntica. Grunberg y Cleeland (125) las incuban en medio 199, a 37 °C durante 3 días, en presencia de algunos antihelmínticos de los que determinan la concentración mínima letal (motilidad como criterio de viabilidad); la del tiabendazol se estima superior a 10 mg/ml. Un modelo mucho más sensible será propuesto posteriormente por Rew, Urban y Douvres (126). Las L₂ de *A. suum* se cultivan en condiciones que permiten su desarrollo hasta L₃ "jóvenes" (10 días), y se determina el efecto de los fármacos sobre su supervivencia, motilidad y muda. El tiabendazol y otros antihelmínticos se muestran activos a la concentración de 0,01 µg/ml. Los autores, sin embargo, consideran que su prueba puede ser poco selectiva; los isómeros D y L del tetramisol, y el albendazol y su sulfona, denotan en ella la misma actividad.

Entre los modelos desarrollados con los estadios de vida libre de los nematodos parásitos, aquellos que determinan el efecto de los productos sobre el desarrollo desde huevo a L₃ son los que muestran un espectro de sensibilidad más amplio. Tiner (70) empleó los estadios de vida libre de *O. cuniculi* y *T. calcaratus*. Los huevos, aislados de heces de conejos infectados, se incubaban en agua con *Escherichia coli* y en presencia del producto a valorar, y se determinaba si éste afectaba a los huevos o a las larvas; si era inactivo, se producía la eclosión de los huevos y el desarrollo de las larvas hasta el estadio infectante. Como señala Jenkins (40), el valor de esta prueba es difícil de determinar porque se evaluaron muy pocos compuestos; lo mismo sucede con otro método muy similar, descrito por Phillipson (127), en el que se utilizan los estadios de vida libre de *Nippostrongylus brasiliensis*.

Ibarra y Jenkins (128) estudian la respuesta de los estadios de vida libre de *N. brasiliensis*, *H. polygyrus*, *H. contortus*, *T. colubriformis* y *O. ostertagi* ante una gran variedad de agentes antiparasitarios. Los huevos se incuban en una suspensión fecal (ajustada colorimétricamente) durante 4 días a 25 °C. Los productos que inducen efectos ovicidas o larvicidas, o bien que inhiben o retardan el desarrollo de las larvas en relación a los testigos se consideran activos; en cada caso se determina la CE₅₀, concentración aproximada requerida para afectar al 50 % de los vermes. Los cinco tricostrongílidos evidencian la actividad de los antihelmínticos de amplio espectro a concentraciones muy inferiores a 10 µg/ml. Los productos más activos son la ivermectina y algunos bencimidazoles; los menos activos fenotiacina y febantel. La especie más sensible, particularmente a los bencimidazoles, parece ser *O. ostertagi*, y

la más resistente *H. polygyrus*. De 22 antihelmínticos de espectro reducido, sólo el 10 % muestra actividad a concentraciones iguales o inferiores a 10 µg/ml. De 15 agentes antiprotozoos, tan solo uno, la pentamidina, fue activo a esa concentración frente a *N. brasiliensis* y *H. contortus*. Los estadios de vida libre de *N. brasiliensis* se eligieron para el cribado de 1.400 compuestos, obteniéndose un 10 % de productos activos a concentraciones iguales o inferiores a 10 µg/ml (según Jenkins (40) con los estadios de vida parasitaria de este mismo nematodo se obtiene un 1,5 %). Ibarra y Jenkins concluyen que estos modelos generan "falsos positivos", también es posible que produzcan "falsos negativos", pero a pesar de ello son adecuados para la selección inicial de nuevos compuestos con potencial actividad antihelmíntica (128).

Los estadios de vida libre de *H. contortus* se han utilizado para detectar y valorar actividad nematocida, en un programa de cribado farmacológico de productos de origen marino. En él se han estudiado más de 1.000 esponjas y otros organismos, y se han obtenido varios productos activos (129, 130); entre ellos, tres nuevos metabolitos, anfíactamas, que exhiben una notable actividad *in vitro* (DL₉₉ 7,5, 8,5 y 0,3 µg/ml) comparable a la de los antihelmínticos de referencia (131). No disponemos de datos sobre su actividad *in vivo*.

Finalmente, al igual que los ensayos de motilidad de L₃, las pruebas sobre el desarrollo desde huevo a L₃ de las especies de interés veterinario ("LDA, larval developmental assay") tienen una aplicación fundamental en el estudio y valoración de resistencias. Para evaluar el efecto de los distintos antihelmínticos sobre el desarrollo larvario se han propuesto cuatro procedimientos (132, 133, 134, 135), entre los que existen pequeñas diferencias (uso de medio líquido o agar, fuente de nutrientes, temperatura, adición de los fármacos antes o después de la eclosión, etc); cualquiera de ellos puede utilizarse como sistema de preselección de antihelmínticos potenciales. El método de Lacey *et al.* (134), conjuntamente con el sistema de L₃ de Gill *et al.* (89) antes mencionado, se ha empleado en la valoración de paraherquamida (93) y bafilolidas (91); estos estudios ponen de nuevo de manifiesto las diferencias de sensibilidad entre los distintos modelos. La paraherquamida no afecta al desarrollo larvario pero inhibe la motilidad; los bafilolidas, por el contrario, son efectivos en el primer sistema y tienen menor poder paralizante. La aportación más reciente en relación a este tipo de ensayos consiste en la utilización de un siste-

ma automatizado, "CPR: computerized pixel counter" (136), que permite cuantificar la motilidad de las larvas (137).

Los métodos para la evaluación de actividad nematocida que utilizan estadios de vida parasitaria se conciben *a priori* como los más satisfactorios, puesto que contra estos estadios se dirigirán los antihelmínticos potenciales que buscamos. El desarrollo de estas pruebas, sin embargo, se ha visto limitado por las dificultades inherentes al cultivo de los metazoos parásitos, dificultad y complejidad en muchos casos incompatible con las exigencias de un cribado masivo. Por otra parte, la obtención de estos estadios requiere el sacrificio de sus hospedadores y por ello, normalmente, se recurrirá al uso de especies que pueden mantenerse en animales de experimentación; *N. brasiliensis* (rata), *H. polygyrus* (ratón) y *T. colubriformis* (gerbo) son probablemente las más utilizadas.

En los sistemas que emplean estos tricostrongílidos se valora el efecto de los productos objeto de estudio sobre el desarrollo de las larvas de cuarto estadio (L_4) o sobre la viabilidad de los adultos. El periodo de desarrollo L_4 - adulto se eligió tras observar la carencia de eficacia de los bencimidazoles y probencimidazoles frente a los adultos en medios de mantenimiento (81), y a la luz del trabajo de Leland *et al.* (138), con los estadios parasitarios de *Cooperia punctata*, que puso de manifiesto que, bajo condiciones que posibilitasen el crecimiento y desarrollo de los vermes, podía evidenciarse su actividad (40).

Jenkins, Armitage y Carrington (139) y Jenkins y Carrington (140) utilizan los estados parasitarios de *N. brasiliensis*; en el primer trabajo, las L_4 , obtenidas de ratas experimentalmente infectadas, se cultivan en un medio no totalmente definido (medio NB) a 37 °C y en oscuridad, durante 7 días. La actividad de los productos se valora examinando sus efectos sobre el desarrollo y la motilidad, fundamentalmente sobre la muda de L_4 a adulto, parámetro, este último, que permite, según los autores, la interpretación objetiva de la prueba. En estas condiciones, ivermectina (< 0,01 µg/ml), morantel (0,5 µg/ml), levamisol (0,5 µg/ml), tiofanato (0,5 µg/ml) y los nueve bencimidazoles probados (entre 0,01 µg/ml y 0,1 µg/ml) muestran una gran actividad (entre paréntesis se indica la concentración mínima inhibitoria). Cuando este sistema se aplicó al cribado, se obtuvieron, como ya hemos comentado, muchos menos "falsos positivos" que con los estadios de vida libre de este mismo nematodo (40). El medio NB,

por otra parte, se puede sustituir por un medio comercial, de composición definida (CbMM, medio de mantenimiento de *Caenorhabditis briggsae*), siempre y cuando el periodo de prueba se reduzca a 5 días (140).

Bennett y Pax (92) comparan las concentraciones de albendazol, levamisol, morantel e ivermectina necesarias para inhibir la muda de las L_4 de *N. brasiliensis* (valoradas por recuento de las vainas, tras 7 días de incubación en medio RPMI con suero) con las que se requieren para inhibir la motilidad (determinada a las 48 horas de incubación, con el equipo "micromotility meter" por ellos desarrollado), y afirman que este último procedimiento es ligeramente más sensible.

Otros investigadores han utilizado las L_4 de *N. brasiliensis* en un ensayo más simple, determinando la concentración del producto necesaria para matar al 50 % de los vermes, tras un periodo de incubación de 5 días (141, 142).

Entre 1984 y 1990, dentro de un programa de colaboración entre la Universidad de California (Santa Cruz) y Syntex, se cribaron 457 extractos y 89 productos puros, procedentes de esponjas y otros invertebrados marinos, frente a los estadios parasitarios de *N. brasiliensis* con el método de Jenkins, Armitage y Carrington (139). A la concentración de 50 µg/ml, el 3,9 % de los extractos y el 22 % de los productos puros seleccionados se mostraron muy activos (eficacia superior al 95 %); el 5 % y 20 %, respectivamente, moderadamente activos (50 %-95 % de eficacia). Los resultados de los ensayos *in vivo* subsiguientes (modelo murino de coinfección con *H. polygyrus* e *Hymenolepis nana*) revelaron que uno de estos productos (no se pudieron valorar todos) - bengamida F - era activo (143), curiosamente, frente a *H. nana*.

Con los estadios parasitarios de *H. polygyrus* (144) y *T. colubriformis* - una especie "diana" - (145) se han desarrollado sistemas similares. Las L_4 de estos nematodos, aisladas de hospedadores experimentalmente infectados (ratón y gerbo, respectivamente), se incubaban en medio NB (sin lisado de eritrocitos, para *T. colubriformis*) durante 7 días para su desarrollo y muda. Las condiciones de cultivo parecen ser, sin embargo, menos satisfactorias para estas especies que para *N. brasiliensis* pues sólo se consigue un 65 % y 50 % de muda, frente al 90 % de *Nippostrongylus*. La respuesta de ambos modelos ante los antihelmínticos de amplio espectro denota una gran sensibilidad. En cada caso se estima la CE_{50} (concentra-

ción requerida para producir efectos adversos discernibles - parálisis/muerte - en el 50 % de las larvas) y la CI_{50} (concentración necesaria para inhibir la muda del 50 % de las larvas en relación a los testigos); los valores de ambos índices son similares (ligeramente inferiores las CI_{50}) aunque se observa una gran diferencia entre la CE_{50} (79,7 μ M) y la CI_{50} (0,01 μ M) de la ivermectina frente a *T. colubriformis*. Antihelmínticos de espectro reducido como nitroxinil, hexaclorofeno, rafoxamida o closantel, que sí afectaban a *N. brasiliensis*, no son efectivos en estos sistemas que podrían ser, por tanto, más específicos para la detección de antihelmínticos de amplio espectro.

La evaluación de la actividad, a través del examen de las larvas y de la muda (contando el número de vainas) requiere una observación microscópica detallada y es una tarea delicada, larga y tediosa. Este inconveniente puede subsanarse utilizando otros parámetros, de determinación más simple, que reflejen el estado de los vermes. En el modelo L_4 - adulto de *T. colubriformis* se ha comprobado que la lectura de los resultados puede agilizarse extraordinariamente (reduciéndose el tiempo necesario en más de un 95 %) si se realiza observando si se produce o no "agregación". Los adultos de *T. colubriformis* tienden a agregarse en los medios de cultivo; la ausencia de este comportamiento (probablemente como consecuencia de la inhibición del desarrollo y de la muda) denota actividad. Con este criterio, la respuesta del modelo sigue siendo igualmente satisfactoria; las concentraciones mínimas, de los antihelmínticos de amplio espectro, necesarias para inhibir completamente la agregación son iguales o inferiores a 1 μ M (146).

Otra alternativa es la utilización de un parámetro bioquímico -la secreción de acetilcolinesterasa (AChE) - (147). Rapson, Chilwan y Jenkins (148) demuestran que las L_4 y los preadultos de *N. brasiliensis*, cultivados en un medio complejo sin suero, secretan AChE a lo largo de todo el periodo de incubación (4 días); todos los antihelmínticos de amplio espectro, con independencia de su mecanismo de acción, reducen drásticamente dicha secreción ($CI_{50} < 5 \mu$ M). La determinación de actividad acetilcolinesterasa en el medio de cultivo (método de Ellman *et al.* (149) permite estimar la actividad de un modo objetivo, sencillo y rápido. A estas ventajas se suma el acortamiento del periodo de prueba (4 días versus 7 días) y la posibilidad de diferir las determinaciones (los medios pueden conservarse a -20 °C sin pérdida de actividad enzimática).

En lo que se refiere al uso de los adultos de nematodos tricostrongílidos (al que ya se ha aludido) en pruebas de cribado, su gran inconveniente fue en principio su falta de sensibilidad. Cuando se valoraba visualmente el efecto de los productos sobre la viabilidad/motilidad de los adultos de *H. polygyrus* (125) o *N. brasiliensis* (81, 150) en medios de mantenimiento, algunos antihelmínticos, notablemente bencimidazoles y probencimidazoles, no manifestaban actividad. Tampoco se registran efectos inhibitorios sobre la motilidad de adultos de *H. contortus*, con los bencimidazoles, utilizando el sistema de medida automatizado de Bennett y Pax (92) (151, 152).

La aplicación de otro criterio de valoración posibilitará la utilización de estos sistemas. Todos los antihelmínticos de amplio espectro revelan su actividad, frente a adultos de *N. brasiliensis*, cuando se determina su efecto sobre la secreción de AChE (153). El salto cualitativo que supone el uso de este parámetro bioquímico se ve claramente en los resultados obtenidos por estos autores; por ejemplo, las concentraciones de mebendazol, tiofanato e ivermectina necesarias para producir efectos adversos, visualmente perceptibles, sobre los adultos de *Nippostrongylus* (CE_{50}), tras 4 días de incubación, son superiores a 100 μ M, las que se precisan para inhibir la secreción de AChE (CI_{50}) son 0,026 μ M, 0,82 μ M y 0,00024 μ M, respectivamente. Los valores de la CI_{50} del levamisol y morantel son también bajos aunque superiores a los de la CE_{50} (4,6 μ M y 12,7 μ M frente a 2,4 μ M y 7,6 μ M). Nosotros hemos puesto a punto recientemente un sistema similar con adultos de *H. polygyrus* (154); en él, tras un periodo de incubación de 24 horas en medio RPMI, los bencimidazoles probados, así como levamisol, ivermectina y morantel inhiben la secreción de AChE a concentraciones (CI_{50}) iguales o inferiores a 3 μ M. Entre los dos modelos existen pequeñas diferencias de sensibilidad, atribuibles a diferencias metodológicas y a diferencias inherentes a los propios parásitos, pero creemos que ambos pueden ser útiles para la selección primaria de antihelmínticos potenciales. Disponemos de poca información sobre su capacidad selectiva en el cribado, pero, en nuestro caso, los primeros datos (142 y observaciones no publicadas) sugieren que este método proporciona, como cabía esperar, menos "falsos positivos" que *Caenorhabditis elegans*.

En 1985, tras estudiar el efecto de varios antihelmínticos sobre la ingestión (medida a través de la captación de un fluorocromo) y oviposición de *T. colubriformis*, Bottjer y Bone (155) proponen el uso de estos parámetros como indicado-

res de actividad antihelmíntica (ambos involucran motilidad pero permiten una cuantificación más objetiva, sin equipos especiales, que la motilidad corporal). Desconocemos si este sistema, aparentemente poco sensible a los derivados bencimidazólicos, se ha utilizado en pruebas de cribado pero, ciertamente el bombeamiento faríngeo como diapausa farmacológica de la ivermectina ha despertado un gran interés.

Dejando ya a un lado los modelos desarrollados con estadios parasitarios de tricostrongílidos, y obviando la mención de procedimientos puntuales con estos u otros nematodos, vamos ahora a examinar otros sistemas de cribado, que optan por la utilización de *Trichinella* spp. o *Ascaris suum*.

La primera propuesta se orienta hacia la búsqueda de compuestos eficaces frente a los estadios tisulares de *Trichinella spiralis* (156). Las L₁ de este nematodo, obtenidas de ratones experimentalmente infectados, se incuban en medio NB (139) a 37 °C, en presencia de distintos antihelmínticos, durante 4 días (en este medio se afirma que permanecen móviles y aparentemente en buen estado durante 7 días). La actividad se evalúa visualmente, comparando el estado de las larvas testigo (que al cuarto día muestran un movimiento sinusoidal típico, "estado serpentina") y tratadas (motilidad y estado). Las concentraciones mínimas necesarias para modificar significativamente el estado de las larvas (CMI) son muy bajas para los bencimidazoles (entre 0,001 y 0,05 µg/ml) y organofosforados (1 µg/ml) ensayados. Levamisol (CMI 10 µg/ml), metiridina (CMI 20 µg/ml) y pirantel (CMI 50 µg/ml) son menos eficaces. Según sus autores, si el cribado se realiza exigiendo actividad a concentraciones iguales o inferiores a 10 µg/ml, el sistema no detecta compuestos que actúan sólo sobre la fase intestinal de la infección, pero han comprobado que sí es muy selectivo (no produce "falsos positivos").

Gómez Barrio, Bolás Fernández y Martínez Fernández (157) se plantean el desarrollo de un sistema similar con *Trichinella pseudospiralis* pero, cuando incuban las larvas en medio NB, observan una elevada mortalidad (62 % a los 4 días) y pérdida de su capacidad infectante (a las 48 horas). Ello les lleva a buscar otro medio y condiciones que posibiliten el contacto *in vitro* con larvas en "buen estado" y aseguren la objetividad de las determinaciones. Las larvas se mantendrán finalmente en medio HBSS-199, en presencia o ausencia de los fármacos durante 48 horas (en contenedores gaseados con CO₂), y su viabilidad se

determinará por inoculación a ratón, estimando la reducción en el número de adultos intestinales que induce el tratamiento *in vitro*. Siguiendo estas pautas, valoran el efecto de cinco bencimidazoles, un probencimidazol, levamisol e ivermectina sobre L₁ de *T. pseudospiralis* y *T. spiralis*. En términos generales, ambas triquinas responden de un modo similar, mostrándose particularmente sensibles a los carbamatos de bencimidazol y a la ivermectina; levamisol, tiabendazol y especialmente el probencimidazol febantel son menos eficaces (158). Herrero *et al.* (159) utilizan este sistema para valorar nuevos productos de síntesis. Otros autores cultivan las larvas de *T. spiralis* en medio RPMI (37 °C, 5 % CO₂) durante 3 días, en presencia y ausencia de los productos objeto de estudio (cambiando diariamente el medio) y, finalmente, determinan la viabilidad larvaria mediante un método colorimétrico basado en la reducción de MTT (160).

Las L₃ de *A. suum* (obtenidas de conejos experimentalmente infectados) han sido sujeto de otros ensayos. Rew, Urban y Douvres (126) las exponen a distintos antihelmínticos, bajo condiciones de cultivo que permiten su desarrollo y muda (en presencia y ausencia de suero). La actividad, tras 7 días de incubación, se determina examinando la supervivencia, motilidad y muda a L₄. Albendazol (0,01 µg/ml), mebendazol (0,01 µg/ml), tiabendazol (0,1 µg/ml), albendazol sulfóxido (0,1 µg/ml) y albendazol sulfona (1 µg/ml) inhiben el desarrollo de L₃ a L₄ aunque, a estas concentraciones las larvas permanecen vivas. L-tetramisol y morantel inhiben la muda y reducen la supervivencia a concentraciones superiores o iguales a 1 µg/ml. La ivermectina bloquea el desarrollo a 1 µg/ml; se observa además que su actividad se reduce en presencia de suero. Los autores proponen el uso de este sistema para el cribado y para la detección de antihelmínticos residuales en los tejidos animales destinados al consumo. Según Bennett y Pax (97), las concentraciones de albendazol (0,01 µg/ml), levamisol (1 µg/ml) e ivermectina (1 µg/ml) necesarias para inhibir la muda de las L₃ de *A. suum* (medio RPMI con un 10% de suero, 7 días de incubación) son iguales a las necesarias para inhibir la motilidad (valorada al segundo día de incubación), cuando ésta se evalúa a través del "micromotility meter" que han desarrollado. De morantel se requiere una concentración mayor para inhibir la motilidad (1 µg/ml frente a 0,1 µg/ml).

Como conclusión, queremos resaltar que todos los sistemas que hemos ido examinando a lo largo de esta revisión configuran un amplio abanico de posibilidades para la evaluación inicial *in*

vitro de productos de síntesis o de origen natural, y la preselección, previa al cribado primario *in vivo*, de antihelmínticos potenciales. Todos ellos tienen ventajas e inconvenientes, y cada investigador debe elegir el modelo (o modelos) que estime más adecuado; los factores a considerar, como hemos visto, son múltiples:

- elección de la especie (determinada fundamentalmente por su disponibilidad, que va ligada a su facilidad de mantenimiento en el laboratorio, exigencia o no de hospedadores experimentales y tipo de hospedador preciso).

- elección del estadio o fase de desarrollo (su obtención puede requerir o no el sacrificio de animales de experimentación, y su manipulación y condiciones de cultivo, tiempo y medios, ser más o menos complejas).

- criterio de actividad (considerando sobre todo la sencillez y objetividad de su evaluación).

Todos estos factores condicionan la sensibilidad y la capacidad selectiva del modelo (además de sus costes) y todos buscamos el mejor equilibrio posible entre ellos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thompson DP, Klein RD, Geary TG. Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery. *Parasitology* 1997; 113: S217-S238
2. Gutteridge WE. Designer drugs: pipe-dreams or realities?. *Parasitology* 1997; 114: S145-S151
3. Geary TG, Thompson DP, Klein RD. Mechanism-based screening: discovery of the next generation of anthelmintics depends upon more basic research. *Int J Parasitol* 1999; 29: 105-112
4. Tiner JD. Effects of phenothiazine on nematodes *in vitro*: criteria for selection of organisms in preliminary anthelmintic screen tests. *Am J Vet Res* 1965; 26: 1204-1211
5. Cavier R. Chemotherapy of intestinal nematodes. En: "Chemotherapy of Helminthiasis", vol. 1. Editado por R. Cavier y F. Hawking. Pergamon Press, 1973; p. 217-403
6. Deschiens R. Etude d'un test de détermination des propriétés anthelminthiques des dérivés triphénylméthaniques. *Compt Rend Soc Biol* 1944; 138: 201-202
7. Deschiens R. L'action anthelminthique des médicaments. *Bull Soc Pathol Exo* 1944; 37: 111-125
8. Gaulin J. Etude critiques des méthodes biologiques d'essai des anthelminthiques. Thèse Doct. Pharmacie (París) 1954, No. 220
9. Cavier R, Gaulin J. Un nouvel anthelminthique: le dilaurate de diethylene-diamine. *Bull Soc Pathol Exot*

1955; 48: 393-396

10. Brienne MJ, Jacques J, Gayral P, Dusset F. "Modèles ouverts" du tétramisole et de l'iso-tétramisole. Préparation et activité sur les nématodes. *Eur J Med Chem* 1981; 16: 363-366

11. Amarouch H, Loiseau PR, Bacha C, Caujolle R, Payard M, Loiseau PM, Bories C, Gayral P. Imidazo(2,1-b)thiazoles: analogues of levamisole. *Eur J Med Chem - Chim Thérap* 1987; 22: 463-466

12. Loiseau PR, Bonnafous M, Caujolle R, Payard M, Loiseau PM, Bories C, Gayral P. Synthesis and anthelmintic evaluation of 2-amidino-1,3,4-oxa and 1,3,4-thiadiazoles, structurally related to tetramisole. *Il Farmaco* 1990; 45: 953-963

13. Danan A, Charon D, Kirkiacharian S, Bories C, Loiseau PM. Synthesis and antiparasitic activities of amidinic azolated derivatives. *Il Farmaco* 1997; 52: 227-229

14. Loiseau PM, Lubert P, Wolf JG. Synthesis and *in vitro* anthelmintic properties of some new dithiaarsanes. *Arzneim Forsch* 1999; 49: 944-950

15. Kadlubowski R, Rebizak L. Investigations of compounds with potential antiparasitic action. V. Antihistaminics. *Wiad Parazytol* 1980; 1: 59-64

16. Moral Rama A. Técnicas para el control sistemático de antihelmínticos. Nematodos gastrointestinales. Prueba de una serie de indol-hidracinas. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Madrid. 1967

17. Krizkova L, Balanova J, Balan J. Incidence of antiprotozoal and antivermal activities in imperfect fungi collected in the People's Republic of Mongolia. *Biol Brat C Vseob Biol* 1979; 34: 241-245

18. Krizkova L, Dobias J, Podova M, Nemeč P. Nematocidal effects of entomophilic and entomophagous fungi. *Folia Microbiol* 1979; 24: 171-175

19. Nair MG, Putnam AR, Mishra SK, Mulks MH, Taft WH, Keller JE, Miller JR, Zhu PP, Meinhart JD, Lynn DG. Faeriefungin: a new broad spectrum antibiotic from *Streptomyces griseus* var. *autotrophicus*. *J Nat Prod* 1989; 52:797-809

20. Peters BG. Toxicity tests with the vinegar eelworm. I. Counting and culturing. *J Helminthol* 1952; 26: 97-110

21. Mackie A, Parnell IW. A comparison of the results of four *in vitro* anthelmintics testing techniques. *J Pharm Pharmacol* 1955; 7: 416-420

22. Bacikova D, Betina V, Nemeč P. Anthelmintic activity of antibiotics. *Nature*, 1965; 4991: 1371-1372

23. Vanfleteren JR, Roets DE. The influence of some anthelmintic drugs on the population growth of the free-living nematodes *Caenorhabditis briggsae* and *Turbatrix acetii* (Nematoda: Rhabditida). *Nematologica* 1972; 18: 325-328

24. Tiner JB, Rangaswami G. Effect of mycothricin complex on the nematode *Rhabditis briggsae*. *Proc*

- Helminthol Soc Wash 1957; 24: 70-71
25. Fiakpui EZ. Some effects of piperazine and methyridine on the free living nematode *Caenorhabditis briggsae* (Rhabditidae). *Nematologica* 1967; 13: 241-255
 26. Platzer EG, Eby JE, Friedman PA. Growth inhibition of *Caenorhabditis elegans* with benzimidazoles. *J Nematol* 1977; 9: 280
 27. Simpkin KG, Coles GC. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. *J Chem Techn Biotech* 1981; 31: 66-69
 28. Haber C L, Heckaman C L, Li G P, Thompson DP, Whaley HA, Wiley VH. Development of a mechanism of action-based screen for anthelmintic microbial metabolites with avermectinlike activity and isolation of milbemycin-producing *Streptomyces* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1811-1817
 29. Conder GA, Johnson SS, Guimond PM, Geary TG, Lee BL, Winterrowd CA, Lee BH, Dirom PJ. Utility of a *Haemonchus contortus*/jird (*Meriones unguiculatus*) model for studying resistance to levamisole. *J Parasitol* 1991; 77: 83-86
 30. Dutton CJ, Gibson SP, Goudie AC, Holdom KS, Pacey MS, Ruddock JC, Bu'lock JD, Richards MK. Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. *J Antibiot* 1991; 44: 357-365
 31. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974; 77: 71-94
 32. Martínez -Grueiro MM. *Caenorhabditis elegans*: un nuevo modelo para el cribado farmacológico antihelmíntico. Tesina de Licenciatura 1984. Universidad Complutense. Madrid.
 33. Hirsh D, Oppenheim D, Klass M. Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Develop Biol* 1976; 49: 200-219
 34. Coles GC. Anthelmintic activity of triclabendazole. *J Helminthol* 1986; 60: 210-212
 35. Coles GC. Models of infection for intestinal worms. En: "Experimental Models in Antimicrobial Chemotherapy", Vol. 3 Academic Press, Londres, 1986; p. 333-351
 36. Fasiuddin A, Campbell WC. *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) is much more sensitive than *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae) to the ovicidal action of thiabendazole. *J Parasitol* 2000; 86: 628-630
 37. Martínez-Grueiro MM, Martínez-Fernández AR. Actividad de algunos antihelmínticos convencionales sobre *Caenorhabditis elegans*. *Rev Ibér Parasitol* 1988; 48: 221-226
 38. Spence AM, Malone KMB, Novak MMA, Woods RA. The effects of mebendazole on the growth and development of *Caenorhabditis elegans*. *Can J Zool* 1982; 60: 2616-2623
 39. Patel MT, Campbell WC. Inhibitory effect of chlorpromazine on nematode eggs and larvae. *J Parasitol* 1998; 84: 191-192
 40. Jenkins DC. *In vitro* screening test for anthelmintics. En: "Animals Models in Parasitology", ed. Owen DG, McMillan Press Ltd., Londres, 1982; p. 173-186
 41. Düwel D. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene Series A 1987; 267: 291
 42. Coles GC. Recent advances in laboratory models for evaluation of helminth chemotherapy. *Br Vet J* 1990; 146: 113-119
 43. Martínez-Grueiro MM, Cremades-Redondo M, Torres-Guijarro A, Álvarez-Builla Gómez J, Novella-Robisco JL. Estudio de la actividad antihelmíntica de sales de 1-(1-arylvinil)piridinio. *Rev Ibér Parasitol* 1987; Vol. Ext.: 239-244
 44. Ondeyka JG, Goegelman RT, Schaeffer JM, Kelemen L, Zitano L. Novel antinematodal and antiparasitic agents from *Penicillium charlesii*. I. Fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot* 1990; 43: 1375-1379
 45. Singh SB, Smith JL, Sabnis GS, Dombrowski AW, Schaeffer JM, Goetz MA, Bills GF. Structure and conformation of ophiobolin K y 6-epiophiobolin K from *Aspergillus ustus* as a nematocidal agent. *Tetrahedron* 1991; 47: 6931-6938
 46. Rasoanaivo P, Ratsimamanga-Urveg S. Biological evaluation of plants with reference to the Malagasy flora. *Napreca. Madagascar* 1993; 72-83: 9-43
 47. Stadler M, Anke H, Sterner O. New nematocidal and antimicrobial compounds from the basidiomycete *Cheimonophyllum candidissimum* (Bert & Curt.) Sing. I. Producing organism, fermentation, isolation, and biological activities. *J Antibiot* 1994; 47: 1284-1289
 48. Stadler M, Mayer A, Anke H, Sterner O. Fatty acids and other compounds with nematocidal activity from cultures of Basidiomycetes. *Planta Med* 1994; 60: 128-132
 49. Schaeffer JM, Blizzard TA, Ondeyka J, Goegelman R, Sinclair PJ, Mrozik H. [3H]Paraherquamide binding to *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 679-684
 50. Schaeffer JM, Bergstrom AR, Frazier EG, Underwood D. Nematocidal activity of MK-801 analogs and related drugs. Structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 411-418
 51. Arena JP, Liu KK, Paress PS, Frazier EG, Cully DF, Mrozik H, Schaeffer JM. The mechanism of action of avermectins in *Caenorhabditis elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chloride current, membrane binding, and biological activity. *J Parasitol* 1995; 81: 286-294
 52. Hu K, Li J, Webster JM. Nematocidal metabolites produced by *Photobacterium luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1999; 1: 457-469
 53. McGaw LJ, Jäger AK, Van Staden J. Antibacterial,

- anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2000; 72: 247-263
54. Williams PL, Dusenbery DB. Using *Caenorhabditis elegans* to predict mammalian acute lethality to metallic salts. *Toxicol Ind Health* 1988; 4: 469-478
55. Middenford PL, Dusenbery DB. Fluoroacetic acid is a potent and specific inhibitor of reproduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Nematol* 1993; 25: 573-577
56. Dhawan R, Dusenbery DB, Williams PL. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health* 1999; 58: 451-462
57. Dhawan R, Dusenbery DB, Williams PL. A comparison of metal-induced lethality and behavioral responses in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem* 2000; 19: 3061-3067
58. Mayer A, Anke H, Sterner O. Screening of higher fungi for the production of nematocidal compounds using *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood as test organism. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 1996; 61/3a: 839-847
59. Yanagida J, Matsushashi R, Watanabe I, Satou T, Koike K, Nikaido T, Akao S. A new subculture and nematocidal assay using a species of Diplogastridae. *Chem Pharm Bull* 1998; 46: 1261-1264
60. Watanabe I, Koike K, Satou T, Nikaido T. Nematocidal activity of picrodendrins against a species of Diplogastridae. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 1310-1313
61. Watanabe I, Koike K, Satou T, Nikaido T. Nematocidal activity of quassinoids against a species of Diplogastridae. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 723-726
62. Kimura Y, Mori M, Hyeon S, Suzuki A, Mitsui Y. A rapid and simple method for assay of nematocidal activity and its application to measuring the activities of dicarboxylic esters. *Agric Biol Chem* 1981; 45: 249-251
63. Ootoguro K, Liu Z-X, Fukuda K, Li Y, Iwai Y, Tanaka H, Omura S. Screening for new nematocidal substances of microbial origin by a new method using the pine wood nematode. *J Antibiot* 1988; XLI: 573-575
64. Alen Y, Nakajima S, Nitoda T, Baba N, Kanzaki H, Kawazu K. Antinematodal activity of some rainforest plants against the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Z Naturforschung* 2000; 55c: 295-299
65. Alen Y, Nakajima S, Nitoda T, Baba N, Kanzaki H, Kawazu K. Two antinematodal phenolics from *Knema hookeriana*, a sumatran rainforest plant. *Z Naturforschung* 2000; 55c: 300-303
66. Kawazu K, Nishii Y, Ishii K, Tada M. Convenient screening method for nematocidal activity. *Agric Biol Chem* 1980; 44: 631-635
67. Shorb DA, Haberman RT. Effect of phenothiazine on the development of roundworm larvae in the feces. *Vet Med* 1940; 35: 454-457
68. Levine ND. The use of horse strogyle larvae in screening compounds for anthelmintic activity. *Trans Illinois St Acad Sci* 1950; 43: 233-236
69. Deschiens R. Sur un test d'activité anthelminthique des médicaments. *Bull Acad Nat Med* 1954; 138: 184-185
70. Tiner JD. A preliminary *in vitro* test for anthelmintic activity. *Exp Parasitol* 1958; 7: 232-235
71. Leland SE, Bogue JH. Laboratory tests on the anthelmintic activity of thiabendazole against the free-living stages of *Strongyloides ransomi*. *J Parasitol* 1964; 50: 61
72. Parnell IW. A modified technique for preliminary screening of compounds for anthelmintic activity against eggs and larvae of bursate nematodes of sheep. *J Helminthol* 1964; 38: 47-56
73. Egerton JR. The ovicidal and larvicidal effect of thiabendazole on various helminth species. *Texas Rep Biol. Med* 1969; 27: 561-580
74. Hoff DR, Fisher MH, Bochis RJ, Lusi A, Waksmunski F, Egerton JR, Yakstis JJ, Cuckler AC, Campbell WC. A new broad-spectrum anthelmintic: 2-(4-thiazolyl)-5-isopropoxycarbonylamino-benzimidazole. *Experientia* 1970; 26: 550-551
75. Lacey E, Brady RL, Prichard RK, Watson TR. Comparison of inhibition of polymerisation of mammalian tubulin and helminth ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Vet Parasitol* 1987; 23: 105-119
76. Le Jambre LF. Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 1976; 2: 385-391
77. Coles GC, Simpkin KG. Resistance of nematode eggs to the ovicidal activity of benzimidazoles. *Res Vet Sci* 1977; 22: 386-387
78. Hall CA, Campbell NJ, Richardson NJ. Levels of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* recorded from an egg hatch test procedure. *Res Vet Sci* 1978; 25: 360-363
79. Whitlock HV, Kelly JD, Porter CJ, Griffin DL, Martin ICA. *In vitro* field screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. *Vet Parasitol* 1980; 7: 215-232
80. Dobson RJ, Donald AD, Waller PJ, Sonowdn KL. An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostongyloid nematode parasites. *Vet Parasitol* 1986; 19: 77-84
81. Coles GC, McNeillie RM. The response of nematodes *in vivo* and *in vitro* to some anthelmintics. *J Helminthol* 1977; 51: 323-326
82. Martínez-Grueiro MM, Martínez-Fernández AR, Cremades-Redondo M. Efecto *in vitro* de algunos anti-helmínticos sobre el desarrollo de los huevos de *Heligmosomoides polygyrus*. *Rev Ibér Parasitol* 1988; 48: 335-341
83. Cuadro A, Pérez-Butragueño J, Pastor Maeso M,

- Álvarez-Builla J, Martínez- Grueiro MM, Martínez - Fernández AR. Styryl and azastyryl 1,3-benzazoles with anthelmintic activity. *Il Farmaco* 1992; 47: 477-488
84. Ochoa C, Rodríguez J, López -García ML, Martínez AR, Martínez MM. Anthelmintic activity of 6,7-diarylpteridines. *Arzneim Forsch* 1996; 46: 643-648
85. Schulz HP. An *in vitro* model for studying anthelmintic compounds (Abstract). Third International Congress of Parasitology, Munich. Proceedings 1974; vol 1, p. 469
86. Boisvenue RJ, Brandt MC, Galloway RB, Hendrix JC. *In vitro* activity of various anthelmintic compounds against *Haemonchus contortus* larvae. *Vet Parasitol* 1983; 13: 341-347
87. Hood JD, Banks RM, Brewer MD, Fish JP, Manger BR, Poulton ME. A novel series of milbemycin antibiotics from *Streptomyces* strain E225. I. Discovery, fermentation and anthelmintic activity. *J Antibiot* 1989; 42: 1593-1598
88. Blanchflower SE, Banks RM, Everett JR, Manger BR, Reading C. New paraherquamide antibiotics with anthelmintic activity. *J Antibiot* 1991; 44: 492-497
89. Gill JH, Redwin JM, Wyk JAVan, Lacey E. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 1991; 21: 771-776
90. Gill JH, Lacey E. *In vitro* activity of paraherquamide against the free-living stages of *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta*. *Int J Parasitol* 1993; 23: 375-381
91. Lacey E, Gill JH, Power ML, Richards RW , O'Shea MG, Rothschild JM. Bafilolides, potent inhibitors of the motility and development of the free-living stages of parasitic nematodes. *Int J Parasitol* 1995; 25: 349-357
92. Bennett JL, Pax RA. Micromotility meter: an instrument to evaluate the action of drugs on motility of larval and adult nematodes. *Parasitology* 1986; 93: 341-346
93. Folz SD, Pax R.A, Thomas EM, Bennett JL, Lee BL, Conder GA. Detecting *in vitro* anthelmintic effects with a micromotility meter. *Vet Parasitol* 1987; 24: 241-250
94. Folz SD, Pax RA, Thomas EM, Bennett JL, Lee BL, Conder GA. Motility response of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* larvae to several anthelmintics. *Proc Helminthol Soc Washington* 1987; 54: 249-253
95. Folz SD, Pax RA, Thomas EM, Bennett JL, Lee BL, Conder GA. Development and validation of an *in vitro* *Trichostrongylus colubriformis* motility assay. *Int J Parasitol* 1987; 17: 1441-1444
96. Folz SD, Pax RA, Thomas EM, Bennett JL, Lee BL, Conder GA. Development of a novel *in vitro* equine anthelmintic assay. *J Vet Pharmacol Therap* 1988; 11: 177-182
97. Geary TG, Sims SM, Thomas EM, Vanover L, Davis JP, Winterrowd CA, Klein RD, Ho NFH, Thompson DP. *Haemonchus contortus*: ivermectine induced paralysis of the pharynx. *Exp Parasitol* 1993; 77: 88-96
98. Douch PGC, Harrison GBL, Buchanan LL, Greer KS. *In vitro* bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralysing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. *Int J Parasitol* 1983; 13: 207-212
99. Douch PGC, Morum PE. The effects of anthelmintics on ovine larval nematode parasite migration. *Int J Parasitol* 1994; 24: 321-326
100. Wagland BM, Jones WO, Hribar L, Bendixsen T, Emery DL. A new simplified assay for larval migration inhibition. *Int J Parasitol* 1992; 22: 1183-1185
101. Rabel B, McGregor R, Douch PGC. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *Int J Parasitol* 1994; 24: 671-676
102. Patel MT, Campbell WC. Enhanced ability of third-stage larvae of *Haemonchus contortus* to withstand drug exposure following chemically induced exsheathment. *J Parasitol* 1997; 83: 971-973
103. Conder GA, Johnson SS. Viability of infective larvae of *Haemonchus contortus*, *Ostertagia ostertagi*, and *Trichostrongylus colubriformis* following exsheathment by various techniques. *J Parasitol* 1996; 82: 100-102
104. Molan AL, Duncan A, Barry TN, McNabb WC. Effects of condensed tannins and sesquiterpene lactones extracted from chicory on the viability of deer lungworm larvae. *Proc New Zealand Soc Anim Prod* 2000; 60: 26-29
105. Molan AL, Hoskin SO, Barry TN, McNabb WC. Effects of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. *Vet Rec* 2000; 147: 44-48
106. Molan AL, Waghorn GC, Min BR, McNabb WC. Effects of condensed tannins extracted from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitol* 2000; 47: 39-44
107. Leland SE. Methods of testing protozoacides and anthelmintics. En: "Disinfection, sterilization and preservation", ed. S.S. Block, Philadelphia, USA, 1983; p.1009-1011
108. Bhopale GM, Bhatnagar BS. Evaluation of the efficacy of various anthelmintics against *Ancylostoma caninum* larvae *in vitro*. *Indian Vet J* 1984; 61: 103-106
109. Martínez-Grueiro MM, Martínez- Fernández A R, Cremades-Redondo M. Viabilidad de L3 de *Heligmosomoides polygyrus* postratamiento *in vitro* con diferentes antihelmínticos. *Rev Ibér Parasitol* 1988; 48: 411-415
110. Bories C, Loiseau P, Legrand T, Gayral P. Utilisation de larves infectantes de *Nippostrongylus brasiliensis* en milieu axénique pour l'étude de substances nematocides. *Bull Soc Franç Parasitol* 1987; 5: 75-80
111. Gbadamassi M, Barascut JL, Imbach JL, Gayral P. Nouveaux anti-parasitaires dans la série du

benzimidazole: synthèse d'hétéroarylamino-2 benzimidazoles et évaluation de leur activité biologique. Eur J Med Chem 1988; 23: 225-232

112. Besanty P, Mayrargue J, Moussa GE, Shaaban ME, Gayral P, Miocque M. Synthèse de benzo et dibenzothiazépinés nitrés à visée anti-parasitaire. Eur J Med Chem 1988; 23: 403-405

113. Loiseau PM, Rekik L, Madaule Y, Gayral P, Wolf JG. Design, synthesis and biological study of new anti-parasitic spiroarsoranes. Arzneim Forsch 1993; 43: 1004-1009

114. Kiuchi F, Miyashita N, Tsuda Y, Kondo K, Yoshimura H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. I. Identification of larvicidal principles in Betel Nuts. Chem Pharm Bull 1987; 35: 2880-2886

115. Kiuchi F, Nakamura N, Tsuda Y, Kondo K, Yoshimura H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. II. Larvicidal principles in Kaempferia rhizoma. Chem Pharm Bull 1988; 36: 412-415

116. Kiuchi F, Nishizawa S, Kawanishi H, Kinoshita S, Ohsima H, Uchitani A, Sekino N, Ishida M, Kondo K, Tsuda Y. Nematocidal activity of long alkyl chain amides, amines, and their derivatives on dog round-worm larvae. Chem Pharm Bull 1992; 40: 3234-3244

117. Akao N, Fukunaga M, Kondo K, Tsuda Y. *In vitro* assessment of morbidity of *Toxocara canis* larvae using a dye exclusion assay. Jpn J Parasitol 1992; 41: 519-526

118. Sugimoto N, Goto Y, Akao N, Kiuchi F, Kondo K, Tsuda Y. Mobility inhibition and nematocidal activity of asarone and related phenylpropanoids on second-stage larvae of *Toxocara canis*. Biol Pharm Bull 1995; 18: 605-609

119. Akao N, Sugimoto N, Thu AM, Kondo K, Tsuda Y, Fujita K. A tetrazorium dye (MTT) assay for testing larval viability using second-stage larvae of *Toxocara canis*. Jpn J Parasitol 1995; 44: 1-5

120. Comley JC, Rees MJ, O'Dowd AB. The application of biochemical criteria to the assessment of macrofilarial viability. Trop Med Parasitol 1988; 39: 456-459

121. Comley JC, Rees MJ, Turner CH, Jenkins DC. Colorimetric quantitation of filarial viability. Int J Parasitol 1989; 19: 77-83

122. Towson S, Shay KE, Dobinson AR, Connelly C, Comley JC, Zea FG. *Onchocerca gutturosa* and *O. volvulus*: studies on the viability and drugs responses of cryopreserved adult worms *in vitro*. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1989; 83: 664-669

123. Towson S, Dobinson AR, Townsend J, Siemienska J, Zea FG. The effects of ivermectin used in combination with other known antiparasitic drugs on adult *Onchocerca gutturosa* and *O. volvulus in vitro*. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1990; 84: 411-416

124. Towson S, Tagboto SK. The effects of ivermectin on the viability of *Onchocerca linealis* microfilariae *in vitro* and on their subsequent development in the black-fly vector, *Simulium ornatum*. Trop Med Parasitol 1991; 42: 31-37

125. Grunberg E, Cleeland R. Anthelmintic activity of 1,4 bis(2-diethylaminoethoxy)anthraquinone duhydrochloride in experimentally infected animals and *in vitro*. J Parasitol 1967; 53: 786-792

126. Rew RS, Urban JF, Douvres FW. Screen for anthelmintics, using larvae of *Ascaris suum*. Am J Vet Res 1986; 47: 869-873

127. Phillipson RF. Life cycle and chemotherapeutic studies on *Nippostrongylus brasiliensis*. PhD Thesis 1966. University of London.

128. Ibarra OF, Jenkins DC. The relevance of *in vitro* anthelmintic screening tests employing the free-living stages of trichostrongylid nematodes. J Helminthol 1984; 58: 107-112

129. Capon RJ, Barrow RA, Rochfort S, Jobling M, Skene C, Lacey E, Gill J, Friedel T, Wadsworth D. Marine nematocides: tetrahydrofurans from a southern Australian brown alga, *Notheia anomala*. Tetrahedron 1998; 54: 2227-2242

130. Capon RJ, Skene C, Lacey E, Gill JH, Wadsworth D, Friedel T. Geodin A magnesium salt: a novel nematocide from a southern Australian marine sponge. J Nat Prod 1999; 62: 1256-1259

131. Ovenden SPB, Capon RJ, Lacey E, Gill JH, Friedel T, Wadsworth D. Amphilactams A-D: novel nematocides from southern Australian marine sponges of the genus *Amphimedon*. J Org Chem 1999; 64: 1140-1144

132. Coles GC, Tritschler JP, Giordano DJ, Laste NJ, Schmidt AL. Larval development test for detection of resistant nematodes. Res Vet Sci 1988; 45: 50-53

133. Taylor MA. A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. Res Vet Sci 1990; 49: 198-202

134. Lacey E, Redwin JM, Gill J, Demargheriti VM, Waller PJ. A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. En: "Resistance of parasites to antiparasitic drugs", Boray, J.C.; Martin, P.J.; Roush, T.H., Rahway NJ, USA: MSD AGVET, 1990; p. 177-184

135. Hubert J, Kerboeuf DA. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. Vet Rec 1992; 130: 442-446

136. Solomon F, Michael B, Hamelin M, Smith M. The wiggleometer. Measuring larval movement in 96-well format. J Assoc Lab Automat 2000; 5: 79-84

137. Michael B, Meinke PT, Shoop W. Comparison of ivermectin, doramectin, selamectin, and eleven intermediates in a nematode larval development assay. J Parasitol 2001; 87: 692-696

138. Leland SE, Ridley RK, Slonka GF, Zimmerman GL. Detection of activity for various anthelmintics

- against *in vitro* produced *Cooperia punctata*. Am J Vet Res 1975; 36: 449-456
139. Jenkins DC, Armitage R, Carrington TS. A new primary screening test for anthelmintics utilizing the parasitic stages of *Nippostrongylus brasiliensis*, *in vitro*. Z Parasitenk 1980; 63: 261-269
140. Jenkins DC, Carrington TS. An *in vitro* screen for anthelmintics employing *Nippostrongylus brasiliensis* in a defined medium. Vet Parasitol 1982; 11: 223-230
141. Gordon S, Costa L, Incerti M, Manta E, Saldaña J, Domínguez L, Mariezcurrena R, Suescun L. Synthesis and *in vitro* anthelmintic activity against *Nippostrongylus brasiliensis* of new 2-amino-4-hydroxy-*valerolactam* derivatives. Il Farmaco 1998; 52: 603-608
142. Ochoa C, Rodríguez M, Domínguez L, Saldaña J, Di Maio R, Alonso-Villalobos P, Martínez-Grueiro MM. Nematocide activity of 6,7-diarylpteridines. J Helminthol 1999; 73: 333-336
143. Crews P, Hunter LM. The search for antiparasitic agents from marine animals. En: "Marine Biotechnology", vol. 1: "Pharmaceutical and Bioactive Natural Products", editado por D.H. Attaway y O.R. Zaborsky. Plenum Press, New York, 1993; p. 343-389
144. Jenkins DC, Ibarra DF. *Nematospiroides dubius*: response of the late four-stage larvae to anthelmintics *in vitro*. Z Parasitenk 1984; 70: 395-402
145. Rapson EB, Jenkins DC, Topley P. *Trichostrongylus colubriformis*: *in vitro* culture of parasitic stages and their use for the evaluation of anthelmintics. Res Vet Sci 1985; 39:90-94
146. Jenkins DC, Rapson EB, Topley P. The aggregation response of *Trichostrongylus colubriformis*: a basis for the rapid interpretation of *in vitro* anthelmintic screens. Parasitology 1986; 93: 531-537
147. Rapson EB, Jenkins DC. Acetylcholinesterase: a biochemical parameter for the interpretation of *in vitro* anthelmintic screens. Parasitology 1984; 89:ixxi
148. Rapson EB, Chilwan AS, Jenkins DC. Acetylcholinesterase secretion -a parameter for the interpretation of *in vitro* anthelmintic screens. Parasitology 1986; 92: 425-430
149. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new y rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961; 7: 88-95
150. Katiyar JC, Sen, AB. A new technique for rapid screening of potential nematocidal compounds. Indian J Pharm 1969; 31: 132-134
151. Ho NFH, Sims SM, Vidmar TJ, Day JS, Barsuhn CL, Thomas EM, Geary TG, Thompson DP. Theoretical perspectives on anthelmintic drug discovery: interplay of transport kinetics, physicochemical properties, and *in vitro* activity of anthelmintic drugs. J Pharm. Sci 1994; 83: 1052-1059
152. Conder GA, Johnson SS, Nowakowski DS, Blake TE, Dutton FE, Nelson SJ, Thomas EM, Davis J.P, Thompson DP. Anthelmintic profile of the cyclodepsipeptide PF1022A in *in vitro* and *in vivo* models. J Antibiot 1995; 48: 820-823
153. Rapson EB, Jenkins DC, Chilwan AS. Improved detection of anthelmintic activity in an *in vitro* screen utilizing adult *Nippostrongylus brasiliensis*. Parasitol Res 1987; 73:190-191
154. Alonso-Villalobos P, Martínez-Grueiro MM. The *in vitro* secretion of acetylcholinesterase by adult stages of *Heligmosomoides polygyrus*: the effects of broad-spectrum anthelmintics. J Vet Med B 2000; 47: 1-8
155. Bottjer KP, Bone LW. *Trichostrongylus colubriformis*: effect of anthelmintic on ingestion and oviposition. Int J Parasitol 1985; 15: 501-503
156. Jenkins DC, Carrington TS. An *in vitro* screening test for compounds active against the parenteral stages of *Trichinella spiralis*. Tropenmed Parasit 1981; 32: 31-34
157. Gómez- Barrio A, Bolás-Fernández F, Martínez-Fernández AR. *Trichinella pseudospiralis* as a model for the *in vitro* screening of anthelmintics. Wiad Parazytol 1986; 3: 303-311
158. Gómez-Barrio A, Bolás-Fernández F, Martínez-Fernández AR. Evaluación de un método diseñado para la utilización de *Trichinella* en el cribado farmacológico *in vitro*. Rev Ibér Parasitol 1986; 46: 311-315
159. Herrero A, Ochoa C, Pérez C, Rodríguez-Caabeiro F, Jiménez A, De Armas C, Criado A, Font M. Anthelmintic activity of pyrazinotiadiazine dioxide derivatives. Arzneim Forsch 1993; 43: 163-166
160. Navarrete-Vázquez G, Cedillo R, Hernández-Campos A, Yépez L, Hernández-Luis F, Valdez J, Morales R, Cortés R, Hernández M, Castillo R. Synthesis and antiparasitic activity of 2-(trifluoromethyl)-benzimidazole derivatives. Bioorg Med Chem. Lett 2001;11: 187-190

ENDOCARDITIS VERRUCOSA VENTRICULAR IZQUIERDA

D Arias¹, M Tortora¹, A Cruz¹, L Klima², R Rodríguez², A Massone³, N Stanchi⁴

¹Servicio de Cardiología, ²Servicio de Diagnóstico por Imágenes ³
Cátedra de Patología Especial, ⁴Cátedra de Microbiología
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: La endocarditis bacteriana es una entidad poco frecuente en caninos o subdiagnosticada. Un canino Rottweiler hembra de 3 años de edad fue derivado con signos compatibles de Insuficiencia Cardíaca Congestiva. El animal presentaba intolerancia al ejercicio, disnea y tos. La evolución del cuadro fue de 5 días con antecedentes de tos paroxística principalmente nocturna. La auscultación reveló un soplo de 6/6 en ambos precordios, ruidos hipofonéticos y ritmo irregular. A la palpación el choque cardíaco estaba disminuido. El clínico actuante no refirió otra signología previa. Se indicó: radiografía torácica, electrocardiograma (ECG) y ecocardiograma. La radiología torácica evidenció cardiomegalia moderada a predominio izquierdo, signos de congestión pulmonar. El ECG, reveló ritmo irregular con presencia de contracciones prematuras ventriculares (CPV) unifocales aisladas, una frecuencia cardíaca de 160 a 170 latidos por minuto. Ecocardiográficamente se observó una masa intraventricular izquierda que ocupaba casi dos tercios del lumen ventricular, adherida al ápice y a la pared libre del ventrículo izquierdo (VI) en su tercio distal y una porción libre de tipo verrucosa proyectada hacia la base del lumen ventricular. El paciente murió 48 h luego de la consulta. Realizada la necropsia se constató una masa intraventricular izquierda sólida, irregular, lobulada, que estaba adherida e infiltraba la pared libre (PL) y el tabique interventricular (TIV) izquierdo y se continuaba en dos lóbulos de unos 5 x 2 cm y 3 x 2 cm cada uno. Histopatológicamente se confirmó una endocarditis verrucosa organizada.

LEFT VEGETANS VALVULAR ENDOCARDITIS

ABSTRACT: Bacterial endocarditis is a not very frequent entity or is under diagnosed in canine. A 3 years old female Rottweiler was derived with compatible signs of Heart Congestive Insufficiency. The animal presented intolerance to the exercise, disnea and cough. The evolution was of 5 days with antecedents of paroxistic cough mainly at night. The auscultation revealed a blow of 6/6 in both precordials, hypophrenic noises, irregular rhythm with an increased heart beat. The doctor didn't refer other previous signology. It was indicated; thorax x-rays, electrocardiogram (ECG) and ecocardiogram. The thorax radiology evidenced moderate cardiomegaly to left prevalence, and signs of lung congestion. The ECG, revealed irregular rhythm with presence of ventricular premature contractions (CPV) isolated unifocals, a heart frequency of 160 at 170 beat per minute. Echocardiographically it was observed an intraventricular left mass that occupied two thirds of the ventricular lumen almost, stuck to the apex and the wall free of the left ventricle (VI) in its third distal, and a portion free of type verrucose projected toward the base of the ventricular lumen. The patient died 48 h after the consultation. The autopsy was carried out and we verifies a mass accustomed to left intraventricular, irregular that was stuck and infiltrated the free wall (PL) and the left interventricular septum (TIV) and continued in two lobes of about 5 x 2 cm and 3 x 2 cm each one. Histopathologically it was confirmed a vegetans valvular endocarditis.

Fecha de recepción: 19/07/01

Fecha de aprobación: 18/07/02

Dirección para correspondencia: Daniel Arias, Servicio de Cardiología, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: dliarias@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

La endocarditis bacteriana es una entidad poco frecuente en caninos o por lo menos subdiagnosticada (1, 2, 3, 4). El asiento valvular es el más frecuente, principalmente las válvulas mitral y aórtica, pudiendo extenderse a cuerdas tendinosas, senos de Vasalva, endocardio mural o miocardio adyacente (1, 5, 3, 4, 6). Los signos de insuficiencia cardíaca clínica se desarrollan cuando se produce, destrucción valvular, ruptura de cuerdas tendinosas u obstrucción del tracto de salida (4, 7). La lesión miocárdica también produce deterioro del funcionamiento cardíaco (8). De las lesiones vegetativas pueden producirse embolizaciones (6), pero es esta una complicación poco frecuente en el perro. El diagnóstico de la enfermedad es dificultoso por la inespecificidad signológica y por lo aleatorio de los resultados de los métodos complementarios de diagnóstico (9), fundamentalmente los hemocultivos (1, 3, 4, 7). Quizás el método que logra un mejor acercamiento diagnóstico sea la ecocardiografía a partir de la ecoestructura valvular o de la cinética valvular alterada (4, 5, 6, 7, 10). El ECG puede ser normal, pueden aparecer signos inespecíficos como disturbios conductivos o signos de hipoxia miocárdica (5, 8). El objetivo de este trabajo es la descripción de un caso de endocarditis bacteriana verrucosa organizada.

INFORME DEL CASO

Un canino Rottweiler hembra de 3 años de edad fue derivada con signos compatibles de Insuficiencia Cardíaca Congestiva. El animal presentaba intolerancia al ejercicio, disnea y tos. La evolución del cuadro fue de 5 días con antecedentes de tos paroxística, principalmente nocturna. El clínico actuante no refirió otra signología previa. La auscultación reveló un soplo de 6/6 en ambos precordios, ruidos hipofonéticos y ritmo irregular. A la palpación el choque cardíaco estaba disminuido. Realizado el diagnóstico presuntivo de Insuficiencia Cardíaca Congestiva se indicó: hemocultivo, radiografía torácica, electrocardiograma y ecocardiograma.

RESULTADOS

Las placas de tórax mostraron cardiomegalia moderada a predominio izquierdo, signos de congestión pulmonar. El electrocardiograma reveló ritmo irregular con presencia de contracciones prematuras ventriculares (CPV) unifocales aisladas, frecuencia cardíaca de 160 a 170 latidos por minuto. El ecocardiograma reveló una masa intraventricular izquierda que ocupaba casi dos tercios del lumen ventricular, adherida al ápice y a



Figura 1. Ecocardiograma en ventana paraesternal derecha, eje corto, plano 3, donde se observó una masa de ecogenicidad mixta y ecoestructura heterogénea que ocupó gran parte de la luz del ventrículo izquierdo.

Figure 1 Ecocardiograma in right paraesternal window, short axis, plane 3, where it was observed a mass of mixed ecogenicity and heterogeneous ecoestructure that occupied great part of the light of the left ventricle.

la pared libre del ventrículo izquierdo (VI) en su tercio distal y una porción libre de tipo verrucosa proyectada hacia la base del lumen ventricular (Figura 1). Los hemocultivos fueron negativos. Al rechazar los propietarios un tratamiento de tipo invasivo, se instauró tratamiento de sostén y el paciente murió 48 h después. Se realizó la necropsia y se constató una masa intraventricular izquierda sólida, irregular, lobulada, que estaba adherida e infiltraba a la pared libre (PL) y el tabique interventricular (TIV) izquierdo y se continuaba en dos lóbulos de unos 5 x 2 cm y 3 x 2 cm cada uno (Figura 2). Se remitió el órgano para su estudio histopatológico y se confirmó una endocarditis verrucosa organizada.

DISCUSIÓN

A pesar que los tumores cardíacos de localización en (VI) son infrecuentes (1, 11) el diagnóstico presuntivo más consistente fue el de neoplasia cardíaca ya que las características ecocardiográficas, la falta de signología previa, la gravedad del cuadro, la negatividad de los hemocultivos y la edad del paciente hacían poco probable la posibilidad de una endocarditis bacteriana. Sin embargo, la histopatología confirmó la misma con asiento principalmente mural y no valvular que es el asiento común. Esto amerita una exhaustiva

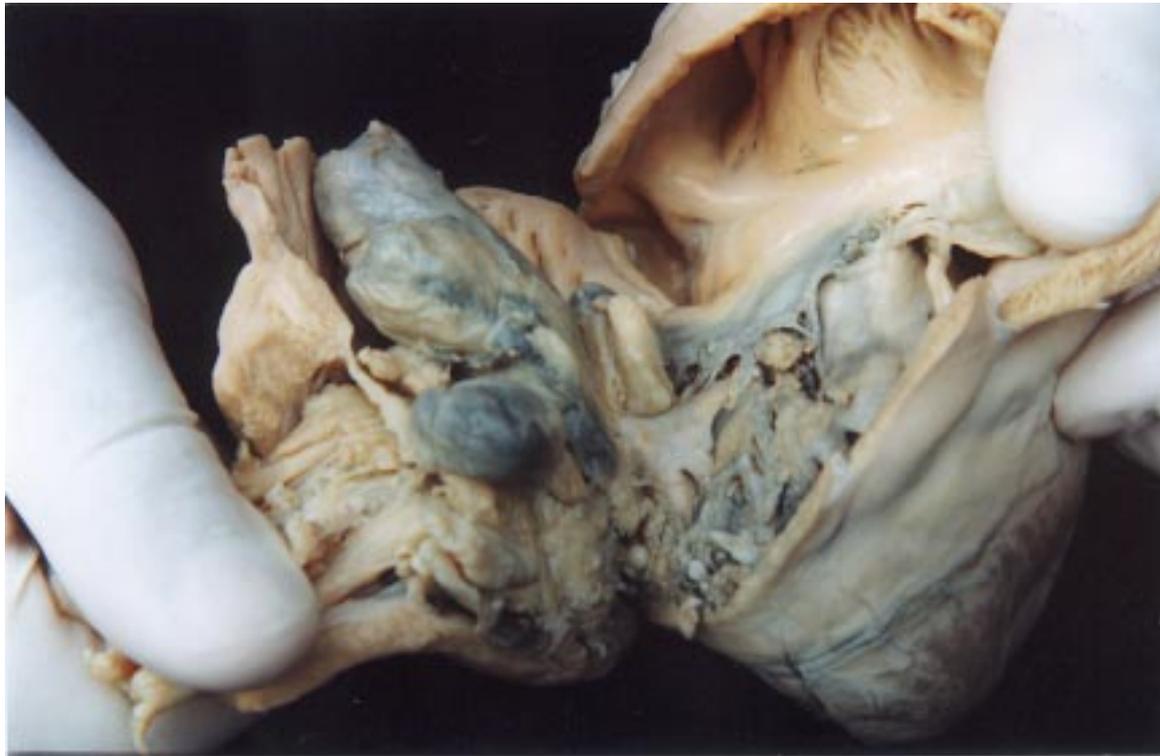


Foto 1. Corte de ventrículo izquierdo. Se observa una masa de aspecto fibrinoso adherida a la pared libre y comprometiendo el tabique interventricular.

Photo 1. Left ventricle. A mass of fibrinosis aspect is observed stuck to the free wall and compromise the interventricular septum.

investigación clínica así como la correcta selección de los métodos complementarios de diagnóstico para optimizar tiempo y recursos materiales. En este caso fue la ecocardiografía la que permitió confirmar la presencia de una masa intracardiaca.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Editorial Intermédica. 1997.
2. Subiros I. Ecocardiografía: casuística. Selecciones Veterinarias 1997; 7 (5): 476-485.
3. Breitschwerdt EB, Kordik DL, Malarkey DE, Keene B, Hadfield TL, Wilson K. Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. J Clin Microbiol 1995; 33 (1): 154-160.
4. Breitschwerdt EB, Atkins CE, Brown TT, Kordick DL, Snyder PS. *Berkhoffi* and related members of the Alpha subdivision of the *Proteobacteria* in dogs with cardiac arrhythmia, endocarditis or myocarditis. J Clin Microbiol 1999; 37 (11): 3618-3626
5. Miller MS, Tilley LP. Manual of Canine and Feline Cardiology. W.B. Saunders Company. 1995.
6. Sohiaux J, Franck M. Echocardiographic appearance of flail aortic valve in a dog with infective endocarditis. Clinique Veterinaire de Flachat; Villeurlane, France.
7. Elwood MA, Cobb RL, Sttepien. Clinical and echocardiographic findings in 10 dogs with vegetative bacterial endocarditis. J of Small Animal Practice. 1993; 34: 420-427.
8. Boswood A. Resolution of dysrhythmias and conduction abnormalities following treatment for bacterial endocarditis in a dog. J Small Anim Practice. 1996; 37 (7): 327-332.
9. Thrall DE. Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology. Third Edition. W.B. Saunders Company. 1998
10. Smith AN, Finn-Bodner ST, Dillon AR. Left ventricular outflow tract to left atrial fistula associated with endocarditis in a dog. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 2000; 36 (2): 133-136.
11. Campbell MD, Gelberg HB. Endocardial ossifying myxoma of the right atrium in a cat. Vet. Pathol. 2000; 37 (5): 460-462.

ACCIÓN DE FINASTERIDE SOBRE EL VOLUMEN PROSTÁTICO EN CANINOS CON HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

MA Stornelli¹, MC Stornelli², RR Rodriguez³,
C Scodellaro⁴, CA Savignone⁵

^{1,2}Cátedra de Reproducción Animal. ^{1,2,4,5}Servicio Central de Laboratorio

³Servicio de diagnóstico por imágenes.

Resumen: Se administró 0,1 mg/kg día de Finasteride, inhibidor selectivo de la 5 α reductasa, vía oral a caninos machos adultos con diferentes grados de hiperplasia prostática benigna. Se evaluó, mediante ecografía, el efecto de la droga sobre el tamaño prostático. Finasteride provocó importante disminución del tamaño glandular y no se asoció a efectos tóxicos colaterales. La dosis utilizada fue 10 veces inferior a la utilizada por otros autores, sin embargo se lograron resultados similares a los obtenidos por los mismos. Considerando la reducción del costo del tratamiento y la ausencia de efectos tóxicos colaterales al utilizar la dosis mencionada, Finasteride sería una excelente opción para el tratamiento a largo plazo de pacientes con hiperplasia prostática benigna

Palabra clave: Próstata, canino, Finasteride.

EFFECT OF FINASTERIDE ON PROSTATIC VOLUME IN CANINE PROSTATIC HYPERTROPHY

Abstract: Mature dogs received Finasteride, a selective 5 α reductase, orally 0.1 mg/kg/day for 10 weeks. The effect of Finasteride administration on prostatic size was evaluated using ultrasonography. Finasteride induced a marked decreasing the size of the prostate and was not associated with any side effects. Dose used was smaller than others authors, however the results were similar. In relation with small cost and absence side effects, Finasteride appears to be an alternative therapy in dogs with benign prostatic hypertrophy.

Key words: Prostate, canine, Finasteride

Fecha de recepción: 15/02/02

Fecha de aprobación: 18/07/02

Dirección para correspondencia: M.A. Stornelli, Cátedra de Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: astornel@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La próstata, única glándula accesoria del aparato genital en los caninos, es asiento de diversos procesos de enfermedad en perros enteros de mediana edad y gerontes (1, 2).

Dentro de estos procesos, la hiperplasia prostática benigna (HPB), es de aparición frecuente pudiendo ocasionar disminución de la eficiencia reproductiva, medorrea sanguinolenta independiente de la micción, dizquecia, disuria y actuar como factor predisponente para la ocurrencia de prostatitis bacteriana e infecciones urinarias recidivantes (3, 4, 5).

La HPB puede presentarse en perros enteros de 1 o 2 años de edad pero se observa más frecuentemente en animales de entre 6 y 9 años, alcanzando una incidencia del 95 % en machos no castrados (4, 6). En los perros con HPB el tamaño de la glándula aumenta 2 a 6,5 veces (7, 8). Esta entidad es frecuente también en el hombre, en el cual el aumento de tamaño se produce principalmente a expensas del estroma, a diferencia del perro en el cual involucra principalmente a las células epiteliales glandulares (9, 10).

Hasta el momento la causa de la HPB no ha sido definida con exactitud, pero se sabe que la edad, así como las hormonas testiculares y por lo tanto la presencia de testículos endocrinológicamente funcionales son prerrequisitos importantes en el desarrollo de la fisiopatología de esta alteración (11).

La Dihidrotestosterona (DHT), metabolito activo de la testosterona, es considerada el principal andrógeno asociado a la patogénesis de la HPB. La testosterona circulante es convertida dentro de las células epiteliales prostáticas en DHT por acción de la 5α reductasa. La DHT se une a los receptores nucleares de las células epiteliales prostáticas con mayor afinidad que la testosterona y regula el crecimiento de la glándula (7,12).

La castración es el tratamiento de elección para machos no utilizados en programas reproductivos. Diversas estrategias terapéuticas para inhibir la producción de andrógenos o su acción sobre la próstata han sido evaluados en humanos y caninos, sin embargo los fármacos utilizados han comprometido la libido y/o la capacidad funcional testicular con lo cual serían de escasa utilidad en un macho reproductor (7).

Finasteride es un inhibidor específico de la 5α reductasa e impide la conversión de la testos-

terona en DHT, no posee propiedades androgénicas, estrogénicas ni progestágenas, ni afinidad por los receptores androgénicos (13, 14, 15). En humanos se ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la HPB sin alterar la libido (10).

El objetivo de este estudio fue evaluar la acción de Finasteride sobre el volumen prostático en perros con HPB y su efecto sobre hígado y riñón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales:

Se utilizaron 8 caninos machos de entre 4 y 10 años de edad, enteros, con función renal y hepática normal y con diferentes grados de HPB al comienzo del estudio. Los animales utilizados no habían recibido ningún tipo de tratamiento durante los últimos dos meses. Durante la experiencia los animales comieron alimento balanceado de calidad premium y fueron sometidos a un régimen de luz natural.

Tratamientos

A tres de los caninos de entre 4 y 8 años se les administró por vía oral un placebo (5 mg de fécula de maíz), durante 10 semanas. Estos animales fueron usados como grupo control. A los cinco animales restantes de entre 5 y 10 años se les administró Finasteride 0,1 mg/kg durante el mismo lapso.

Evaluación del efecto de la droga sobre hígado y riñón

El efecto de Finasteride sobre hígado y riñón fue evaluado mediante mediciones séricas de uremia, creatininemia, Alanino amino transferasa, Aspartato amino transferasa y Fosfatasa Alcalina pre tratamiento y cada 15 días durante el transcurso del estudio. Las determinaciones bioquímicas fueron realizadas mediante método colorimétrico.

Evaluación del tamaño prostático

Los cambios de tamaño prostático fueron monitoreados mediante ultrasonografía trans abdominal con un equipo Ecozón y un transductor sectorial de 5 megahertz aplicando el método de Atalan (16). La evaluación prostática fue realizada pre tratamiento y cada 15 días durante el transcurso del estudio.

Se realizó la medición de ambos lóbulos prostáticos: largo sagital (máximo largo prostático), ancho transversal (máximo ancho prostático) sagital profundo (máxima altura prostática). El volumen prostático fue calculado usando la fórmula: volumen ($v \text{ cm}^3$)= ancho transversal (a cm) x largo sagital (l cm) x altura sagital (h cm) (8).

Análisis estadístico

Con los valores de volumen prostático obtenidos se calcularon los porcentajes de reducción del volumen y a ellos se les aplicó ANOVA de una vía mediante el uso del programa Graphpad Instat.

RESULTADOS

Finasteride fue bien tolerado por todos los animales y no se observó ningún efecto secundario.

Evaluación de la funcionalidad hepática y renal

Los parámetros bioquímicos (metabolitos y enzimas) estudiados se encontraron dentro de los valores normales y no se observaron variaciones significativas durante el transcurso del estudio.

Evaluación ultrasonográfica de la próstata

Si bien previo al comienzo del presente estudio no existían diferencias significativas entre los dos grupos, grandes diferencias individuales fueron observadas en el tamaño prostático de los animales utilizados. Algunos de ellos presentaban un importante agrandamiento prostático mientras que otros evidenciaron solo un ligero aumento de la glándula. En el grupo control, el volumen prostático osciló entre 3.000 y 10.000 mm^3 , mientras que en el grupo tratado el mismo se encontró entre 5.000 y 13.000 mm^3 .

Si bien no se evidenciaron diferencias significativas entre los 2 grupos (control y tratado) al inicio del tratamiento, los animales del grupo tratado fueron experimentando una reducción gradual de volumen de la glándula mostrando una diferencia significativa ($P < 0,001$) con respecto al grupo control a partir del mes de tratamiento (Gráfico 1).

Al final del tratamiento el volumen prostático de los perros del grupo tratado fue de entre un 25,5 y un 52,7 % (media 40 %) con respecto al inicial.

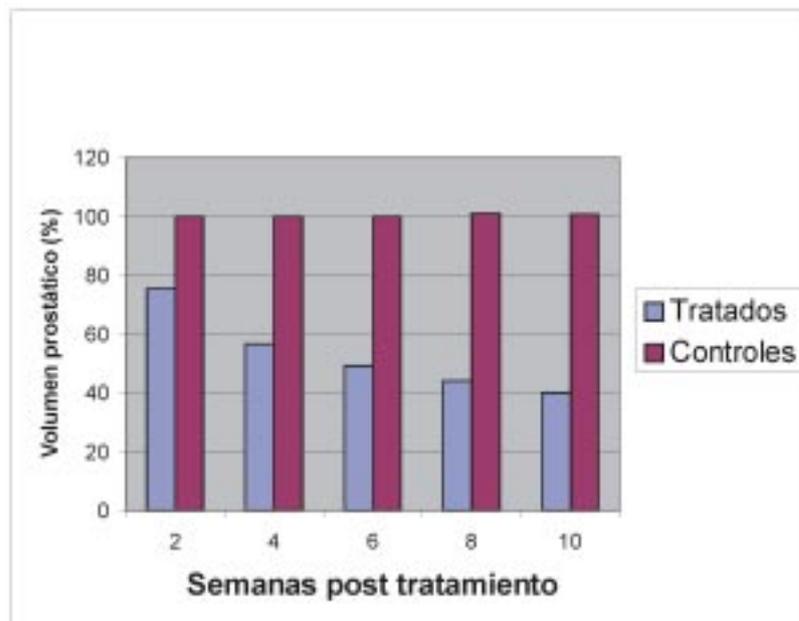


Gráfico I Modificación del volumen prostático en perros con hiperplasia prostática benigna tratados con Finasteride y en el grupo control

Figure I. Changes in prostatic volume in dogs with prostatic hypertrophy Finasteride treated and in control group.

DISCUSIÓN

Los inhibidores de la 5 α reductasa impiden la transformación de testosterona en DHT, provocando una reducción sérica de la misma sin afectar las concentraciones de testosterona circulante (4). Así los eventos mediados por la testosterona (libido, producción espermática y fertilidad) no se verían afectados, mientras que podría obtenerse una reducción del volumen prostático gracias a la reducción sérica de los niveles circulantes de DHT, considerada el principal andrógeno asociado a la patogénesis de la HPB como mencionamos anteriormente.

En nuestro trabajo pudo observarse una reducción sustancial del volumen prostático en los perros del grupo tratado, mientras que en los perros del grupo control no se observó modificación en el volumen de la glándula. Es evidente que en los perros tratados Finasteride logró reducción del tamaño glandular a dosis de 0,1 mg/kg. Si bien el efecto observado sobre la próstata fue similar al observado por Iguer_Ouada (8), la dosis usada por él (1mg/kg) fue ampliamente superior a la nuestra. Nuestros resultados se correlacionan con los hallazgos de Kamolpatana (15), quien encontró que 0,1 mg/kg de Finasteride producía una disminución significativa de la concentración de DHT sérica. La dosis usada por nosotros disminuye considerablemente el costo del tratamiento y produce resultados satisfactorios sobre la reducción de tamaño prostático. Si bien es probable que el efecto sobre la libido y la fertilidad sea comparable con los resultados obtenidos por Iguer_Ouada (8), se necesitan más estudios para comprobar este hecho con dosis de 0,1mg/Kg.

La evaluación de la funcionalidad renal y hepática realizada durante el transcurso del tratamiento demostraron la ausencia de efectos tóxicos de Finasteride sobre hígado y riñón, estos hallazgos se correlacionan con lo observado por Iguer_Ouada (8) y lo estudiado por Carlin (10) con relación al metabolismo de la droga. Sin embargo se necesitan realizar evaluaciones de la funcionalidad renal y hepática durante períodos más extensos para determinar la inocuidad de la droga en tratamientos prolongados. El Finasteride puede ser una alternativa para el tratamiento a largo plazo de la HPB en perros, de la misma manera que ocurre en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1.Krawiec DR, Heflin D. Reports of retrospective studies: study of prostatic disease in dogs: 177 cases (1981-1986). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 1119-1122.

2.Kirk RW. *Current Veterinary Therapy XIII: Small Animal Practice*. Ed. Saunders. Philadelphia (United States), 2000; p. 1226-1227.

3.Jhonston SD, Kuztritz MVR, Olson P. *Canine and feline theriogenology*. Ed. Saunders. Philadelphia (United States), 2001; p. 287-306.

4.Kirk RW. *Current Veterinary Therapy XII: Small Animal Practice*. Ed. Saunders. Philadelphia (United States), 1995; p. 1904-1907.

5.Simpson G, England GC, Harvey M. *Small animal reproduction and neonatology*. Ed. Cheltenham: BSAVA, 1998, p. 105-111.

6.Feldman E, Nelson R. *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 2nd ed.,. Philadelphia: W. B. Saunders. 1996; p. 741-768.

7.Cohen. SM, Werrmann. JG, Rasmusson GH, Tanaka WK, Malatesta PF, Prahallada S, Jacobs JG, Harris G, Nett TM Comparison of the effects of new specific Azateroid inhibitors of steroid 5 α reductase on canine hyperplastic prostate: suppression of prostatic DHT correlated with prostate regression. *The prostate*. 1995; 26: 55-71.

8.Iguer Ouada M, Verstegen JP. Effect of Finasteride (Proscar MSD) on seminal composition, prostate function and fertility in male dogs. *Journal of reproduction supplement* 1997; 51: 139-149.

9.Laroque PA, Prahallada S, Gordon LR, Molo Noblot S, Bagdon WJ, Duprat P, Peter CP, Van Zwieten MJ. Effects of chronic oral administration of a selective 5 α reductase inhibitor, Finasteride, on the dog prostate. *The prostate* 1994; 24: 93-100.

10.Carlin JR, Christofalo P, Arison BH, Ellsworth RE, Rosegay A, Miller RR, Chiu SH, Vandenheuel WJA. Disposition and metabolism of Finasteride in dogs. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1996, 25: 100-109.

11.Johnston SD, Kamolpatana K, Root-Kustritz MV, Johnston GR. Prostatic disorders in the dog. *Animal Reproduction Science*. 2000; p. 405-415.

12.Suzuki K, Okazaki. H, Ono Y, Kurakawa K, Suzuki T, Onuma E, Takanashi H, Mamiya Y, Yamanaka H. Effect of dual inhibition of 5- Alpha- Reductase and Aromatase on spontaneously developed canine prostatic hypertrophy. *The prostate*. 1998; 37: 70-76.

13.Laroque PA, Prahallada S, Molo Noblot S, Cohen SM, Soper K, Duprat P, Peter CP, Van Zwieten MJ. Quantitative evaluation of glandular and stromal compartments in hyperplastic dog prostates: effect of 5 α reductase inhibitors. *The prostate*. 1995; 27: 121-128.

14.Murakoshi M, Tagawa M, Ikeda R, Nakayama T, Ishimura K. Immunolocalization of androgen receptor (AR) and steroid 5 α reductase type II (5 α reductase type II) in canine prostate. Effect of antiandrogen, chlormadinone acetate (CAM). *Acta Histochem. Cytochem*. 2000; 33 (3): 223 229.

15.Kamolpatana K, Johnston SD, Hardy SK, Castner

S. Effect of Finasteride on serum concentrations of dihydrotestosterone and testosterone in three clinically normal sexually intact adult male dogs. *AJVR*. 1998; 59: 762-764.

16. Atalan G, Barr FJ, Holt PE. Comparison of ultrasonography and radiographic measurements of canine prostate dimensions. *Veterinary Radiology & ultrasound*. 1999; 40 (4): 408-412.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones. Asimismo, reflejará las actividades académicas de postgrado, de extensión y de educación a distancia que se desarrollan en esta Casa de Estudio. El idioma oficial es el español aunque se aceptarán trabajos en inglés que seguirán el mismo esquema detallado más abajo.

ANALECTA VETERINARIA seguirá los "Requerimientos uniformes" para la presentación de manuscritos en revistas biomédicas según la quinta edición de 1997 (*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirement for manuscript submitted to biomedical Journals*. N Engl J Med 1997; 336:309-15). Una traducción de estos requerimientos pueden ser recuperada en INTERNET en la dirección electrónica:

<http://www.fcv.unlp.edu.ar>

ANALECTA VETERINARIA puede ser recuperada gratuitamente en INTERNET en formato pdf (Adobe Acrobat Reader®) que permite su impresión tal como aparece en la copia final incluyendo gráficos y tablas. La misma se encuentra en la dirección electrónica <http://www.fcv.unlp.edu.ar>. La revista consta de las siguientes secciones:

I.-Trabajos de investigación, II.-Artículos de revisión, III.-Comunicaciones breves IV-Información institucional y V. Cartas al editor.

Normas generales de redacción

Los manuscritos deberán ser enviados para su publicación al Comité editorial en idioma español o inglés. Deberán enviarse por triplicado en hoja tamaño A4 (210 x 297 mm), numeradas correlativamente y escritas a doble espacio, simple faz, con un margen de 4 cm a la izquierda y no menor de 2 cm en el derecho. Deberá enviarse además una copia en disquete (MS-Word 2000® o Word Perfect 8.0®); dos de las copias no deberán contener el nombre de los autores ni su filiación científica. Los autores deben retener una copia de todo el material enviado inclusive fotografías ya que no se aceptará responsabilidad por daño o pérdida de trabajos.

Las fotografías en blanco y negro podrán ser incluidas en número no mayor a 3 por artículo. Otras inclusiones de fotografías en blanco y negro o en color tendrán un cargo extra y estarán a cargo de los autores. Las versiones electrónica y en CD-ROM de la revista podrán contener fotografías color sin costo para los autores. La inclusión de fotografías color en el material impreso deberá ser expresamente solicitado al editor. El material enviado estará listo para su repro-

ducción, podrán enviarse fotografías o gráficos en formato TIF, CRD, JPG, GIF o BMP. El costo de cada artículo será de \$ 50 hasta 7 hojas (publicadas) y \$ 10 por cada hoja adicional que deberá ser abonado por los autores indefectiblemente antes de su publicación.

Las unidades de medida se expresarán siguiendo las normas del Sistema Internacional de Unidades. El material enviado será analizado para su publicación por el Comité Editorial, el que lo someterá a consideraciones del referato externo. El Comité Editorial informará al autor del trabajo de las correcciones y/o recomendaciones sugeridas por el evaluador y determinará en función de ello la aceptación o rechazo del mismo. Si hubiere correcciones, las mismas deberán ser efectuadas por los autores en un plazo máximo de 6 meses, caso contrario se considerará el trabajo como "rechazado". Se deja constancia que el hecho de recibir un trabajo no conlleva la obligación de su publicación por parte de ANALECTA VETERINARIA. Una vez aceptado el trabajo se enviará a los autores la "prueba de galera" para su corrección, la que deberá ser devuelta en un plazo no mayor de 15 días. La falta de respuesta luego del plazo estipulado se entenderá como una aceptación de la misma. El envío de un trabajo a ANALECTA VETERINARIA deberá realizarse con el consentimiento de todos los autores. En todos los casos se tomará como fecha de remisión la del timbre postal correspondiente.

La falta de cumplimiento de cualquiera de las normas implica la devolución del trabajo para su adecuación. La Facultad no se hace solidaria con las opiniones vertidas en los trabajos, siendo los autores los únicos responsables. Tampoco se hace responsable ni respalda la publicidad incluida en la revista.

Normas particulares de redacción:

1.Trabajos de investigación:

No deberán exceder de 30 páginas, incluyendo 25 citas bibliográficas. Deberán ser inéditos y estarán organizados de la siguiente manera.

a)Título: será breve, preciso y reflejará el contenido del trabajo. A renglón seguido se indicará el nombre y apellido (s) del autor, acompañados de sus grados académicos más importantes, separando los autores por una coma. A renglón seguido se señalará el nombre de la institución, cátedra o laboratorio a la que pertenece, así como su dirección postal, número de fax, y dirección electrónica si la posee. Cuando haya más de un autor que pertenezca a diferentes instituciones, cátedras o laboratorios, las mismas serán identificadas con un número arábigo superíndice, después del apellido. Agregar un título resumido de un máximo de 40 caracteres (considerar espacios y símbolos como caracteres).

b)Resumen: será redactado en castellano y en inglés (abstract) incluyendo además en este último caso el título en idioma inglés. El resumen deberá sintetizar los objetivos principales del trabajo, la metodología empleada, los resultados más sobresa-

lientes y las conclusiones que se hayan obtenido. No superará en español las 200 palabras y las 400 en inglés.

c) Palabras clave: al finalizar el resumen y el "abstract" en renglón aparte, deberán consignarse palabras clave, cinco como máximo, colocándolas bajo el título Palabras clave o "Key Words" según corresponda.

d) Introducción: se señalarán los antecedentes sobre el tema, citando la bibliografía más relevante y especificando claramente los objetivos y el fundamento del trabajo.

e) Materiales y Métodos: toda técnica nueva deberá detallarse para facilitar su comprensión. Se evitará pormenorizar sobre métodos ya experimentados, citándose los materiales utilizados en la realización del trabajo. En los casos en que el diseño experimental requiera una evaluación estadística, se indicará el método empleado.

f) Resultados: se presentarán en forma clara, ordenada y breve.

g) Discusión: incluirá la evaluación y la comparación de los resultados obtenidos con los de otros autores, indicando las referencias bibliográficas correspondientes. Las conclusiones deberán sustentarse en los resultados hallados, evitando todo concepto vago o condicional.

h) Agradecimientos: colaboraciones, ayuda técnica, apoyo financiero, etc. deberán especificarse en agradecimientos. Estas personas deberán conceder su permiso para ser nombradas.

i) Bibliografía: deberá escribirse en hoja aparte ordenada según aparece en el texto y numerada correlativamente con números arábigos, contendrá todas las citas mencionadas en el texto teniendo en cuenta el siguiente formato:

Autores: Apellido, seguido por las iniciales del/los autor/res separados del siguiente autor por coma. Título: completo del trabajo en el idioma en que fue publicado. Nombre de la revista o publicación donde aparece el artículo abreviada de acuerdo al "US National Library of Medicine (NLM)" que usa el *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov>). En forma seguida el año de publicación; en forma continuada el número de volumen de la revista, seguido de coma y el número de la revista (si lo posee), dos puntos, seguido del número de páginas de inicio y terminación del trabajo. Ej.

1. Rodríguez-Vivas RI, Domínguez-Alpizar JL. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. *Rev Biomed* 1998; 9 (1):26-37

En el texto del trabajo hacer referencia mediante números arábigos entre paréntesis.

Si se tratase de trabajos publicados en libros:

Apellido y nombres en forma similar al indicado para revistas periódicas. A continuación el nombre del libro, edición, editorial, ciudad, país entre paréntesis, seguidas del año de publicación y páginas consultadas. Ej.

1. Plonat H. Elementos de Análisis Clínico Veterinario, Ed. Acribia. Zaragoza (España), 1984; p.45-75

Las tablas se presentarán en hojas separadas y con títulos completos ubicados sobre el margen superior y numerados con números arábigos, deberá incluirse además el título en inglés. Los gráficos se presentarán también en hojas separadas pero con títulos explicativos ubicados al pie de los mismos y numerados consecutivamente con números romanos debiéndose incluir además el título en inglés. Las tablas, gráfi-

cos o fotos se adjuntarán al final del manuscrito debiéndose indicar en el texto la posición correspondiente "insertar" tabla N° o gráfico N° o foto N°. Las fotografías deberán remitirse con la numeración en el reverso escrito con lápiz (o pegar una etiqueta de papel) de acuerdo a su secuencia en el texto, así como también indicarse el título y el autor del trabajo y cuál es la parte superior de la misma. El tamaño deberá ser de 10 por 15 cm, pudiendo reducirse en la publicación por lo que se sugiere la buena calidad del detalle que se quiera resaltar. Cada foto deberá ser acompañada de una breve reseña explicativa de la misma en español y en inglés.

II. Artículos de revisión

Versarán sobre temas relevantes incluyendo una revisión bibliográfica adecuada y sus autores deberán tener idoneidad en los mismos. Estos artículos incluirán las siguientes secciones: título, título en inglés, resumen, "abstract", texto, agradecimientos y bibliografía. La extensión de estos trabajos no excederán las cincuenta páginas y sesenta citas bibliográficas.

El autor no deberá solamente realizar una recopilación bibliográfica exhaustiva, sino que además deberá hacer una discusión crítica sobre el tema considerado, destacando la trascendencia actual y futura y los puntos sobre los que existan diferencias de opinión.

III. Comunicaciones breves

Esta sección estará destinada a la comunicación de hallazgos preliminares en trabajos de investigación en marcha y a la descripción de nuevas técnicas (de laboratorio, quirúrgicas, de producción), hallazgos clínicos exóticos o poco frecuentes, etc. Su organización deberá seguir el lineamiento general indicado en el Ítem I. No deberán exceder las dos páginas incluyendo no más de 10 citas bibliográficas.

IV. Información institucional

Esta sección será destinada a difundir todas aquellas actividades o informaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata que tengan una relación directa con los objetivos dispuestos para la presente publicación.

V. Cartas al editor

En esta sección se incluirán actualizaciones breves y comentarios sobre artículos ya publicados. Las cartas (hasta 1000 palabras de texto) deberán ser en formato carta y no se dividirán en secciones. Las cartas comenzarán con una introducción breve sobre la relación del tema. Incluir desarrollo de métodos; referencias, en no más de cinco; y figuras o ilustraciones, en no más de dos.

Correspondencia

Toda correspondencia dirigida a esta revista deberá realizarse a la siguiente dirección:

Sr. Director ANALECTA VETERINARIA
CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA
TEL/FAX: 0221-4257980
Desde el exterior: +54-221-4257980
E-mail: analecta@fcv.unlp.edu.ar
Web: www.fcv.unlp.edu.ar



Características

*La Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, ofrece capacitación de posgrado a través de Educación a Distancia, que tiene como propósito la formación continua del graduado veterinario.

*La permanente generación de información con la creciente necesidad en el uso de la misma en un mercado laboral hiper competitivo y exigente, obliga en forma creciente a la actualización.

*A través de los cursos procuramos el desarrollo y la renovación tecnológica y temática de los profesionales. Es por esto que hemos conformado un equipo de trabajo dedicado a revelar el interés de los diversos temas del veterinario y a conformar una oferta que los satisfaga, avalados por el prestigio y el nivel de excelencia de nuestra universidad.

*Las dificultades existentes para las especializaciones bajo la modalidad presencial por aquellas personas radicadas lejos de los centros de enseñanza y por quienes están insertos en un mercado laboral exigente, proyectan a esta modalidad educativa hacia el futuro.

*Los cursos y seminarios virtuales, los foros electrónicos, la edición de CD y la impresión en papel son presentaciones en distintos soportes tecnológicos que se utilizan en función de las exigencias del proceso educativo.

*La Educación a Distancia evita los gastos de traslado y estadía, permite que el docente intervenga y aporte cuando la ocasión lo requiera y a su vez tenga una dedicación más personalizada al alumno y al estudiante administrar su propio tiempo de estudio.

¿Cómo son nuestros cursos?

*Son tutoriales (asistidos por un especialista en el tema) y por lo tanto de atención personalizada y dedicada.

¿De qué materiales dispone el estudiante?

* El estudiante recibe, dependiendo del curso, material escrito, o en un CD multimedia de modo que no tenga que bajar de la web imágenes o archivos pesados, podrá visualizar en la web el desarrollo del curso y sus temas, así como recibirá vía e-mail archivos, comentarios e información de sus profesores. Por vía de correo electrónico, teléfono o fax, realizará preguntas y evacuará dudas así como presentará sus pruebas de evaluación.

¿Qué recibe el estudiante que cursa?

*El alumno recibirá nuevos conocimientos que le abrirán nuevos horizontes y aquellos que cursen y aprueben las evaluaciones planteadas recibirán un certificado, con las horas cursadas y las pruebas realizadas y aprobadas.

Informes e Inscripción:

Dirección de Educación a Distancia
CC 296 (B1900AVW) La Plata, Argentina
Tel/Fax: 0221-4257980 de 12 a 16 h
desde el exterior: + 54 221 4257980
ead@fcv.unlp.edu.ar
stanchi@alternativagratis.com
<http://www.fcv.unlp.edu.ar>

Auspiciados por el
**Colegio de Veterinarios de la
Provincia de Buenos Aires**

ELECTROCARDIOGRAFÍA EN PEQUEÑOS ANIMALES

Director: Daniel O. Arias

Temario: Fundamentos básicos de la electrocardiografía. Técnica de registro electrocardiográfico. Interpretación y diagnóstico electrocardiográfico

Objetivos: Entrenar al profesional en el conocimiento de la electrocardiografía como método complementario de diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares de los pequeños animales.

HEMATOLOGÍA CLÍNICA Y SU INTERPRETACIÓN EN CANINOS Y FELINOS

Director: Bact. Sandra Arauz

Temario: El hemograma en la clínica. Materiales y equipos de laboratorio. Interpretación. Presentación de casos clínicos y su análisis.

Objetivos: Capacitar a los profesionales para la obtención de un diagnóstico hematológico en diferentes cuadros clínicos en pequeños animales.

TEMAS DE REPRODUCCIÓN EN PEQUEÑOS ANIMALES Evaluación de semen. Citología vaginal

Director: María Alejandra Stornelli

Temario: Fisiología reproductiva. Análisis macroscópico, bioquímico y bacteriológico del semen. Evaluación e interpretación de los resultados obtenidos en el estudio de semen. Citología vaginal. Aplicaciones de la citología vaginal en la clínica.

Objetivos: Analizar la fisiología del macho. Conocer y aplicar las técnicas para obtener y procesar la muestra de semen para realizar un espermograma. Conocer las aplicaciones y las limitaciones del espermograma.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO PRÁCTICO PARA EL MÉDICO VETERINARIO (bacterias aerobias)

Director: Prof. Dr. Nestor Oscar Stanchi

Temario: Urocultivo, Otocultivo, Coprocultivo, Hisopados de heridas y piel.

Objetivos: Capacitar a los profesionales para el diagnóstico bacteriológico rápido con especial referencia a las muestras clínicas más comunes que involucran a la práctica frecuente en veterinaria.

2º JORNADAS PLATENSES DE MEDICINA EN PEQUEÑOS ANIMALES

Videos de las Conferencias realizadas en septiembre 2001

Disertantes: Dr. Isidro Castro Mendoza (México), Dr. Rafael Bökenhans (UBA), Dra. Beatriz Di Tollio (UBA)

Temario: Neurología. Examen clínico de la columna. Patofisiología del Trauma Medular. Patologías Degenerativas. Fracturas y Luxaciones de la Columna. Cirugía de la Columna. Discusión de casos clínicos. Endocardiosis Mitral. Fibrilación auricular. Cardiopatías congénitas

Objetivos: Brindar al Médico Veterinario práctico la posibilidad de información concreta y actualizada sobre temas y tratamientos de la práctica profesional.