

40
Aniversario

**Analecta
Veterinaria**

Publicación de la Facultad de Ciencias Veterinarias

Volumen 19 Número 1/2 1999



Universidad Nacional de La Plata



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol.19 n° 1 y 2, 1999

Publicación de la
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Autoridades

Decano

Méd.Vet. Eduardo Rafael Pons

Vicedecano

Dra. María Elisa Etcheverrigaray

Secretario Académico

Méd.Vet. Juan Carlos Chiaravalli

Secretario de Postgrado

Dra. Pilar Peral García

Secretario de Extensión Universitaria

Dra. Cecilia Di Lorenzo

Secretario de Ciencia y Técnica

Dr. Edgardo Nosetto

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité editorial

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi (h)

Dr. Pablo E. Martino

Méd.Vet. Enrique Pennimpepe

Dra. Pilar Peral García

Responsable Versión Electrónica

Méd.Vet. Santiago Corva

Consultores:

R. Bowden (Argentina), F. Capano (Uruguay), A. Conigliaro (Argentina), L. Estol (Argentina), A. Mariñelarena (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. Zorzópolos (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), 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), J. Lasta (Argentina), N. Leardini (Argentina), L. León Vizcaino (España), H. Molinuevo (Argentina), E. Moras (Argentina), S.J. de Oliveira (Brasil), J. Pistani (Argentina), B. Ruksan (Argentina), B. Rutter (Argentina), E. Smitsaart (Argentina), C. Schenk (Argentina), R. de Torres (Argentina), J. Troiano (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 y de extensión que se desarrollan en esta Casa de Estudio. ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y por el Ulrich's International Periodicals Directory.

ISSN 0365-5148 Versión Impresa
ISSN 1514-2590 Versión Electrónica
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 los autores pertenecen.

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 (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.

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

<http://fcv.medvet.unlp.edu.ar/analecta.htm>

Dirección electrónica:

Puede recuperar la revista accediendo a la página en la **Web**

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

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

Si tiene dificultades para recuperar la revista electrónicamente envíe un mail a:

sgcorva@fcv.medvet.unlp.edu.ar



Impresión
E.C.A.

Ediciones Científicas Americanas
60 nro. 226 (1900) La Plata,
Buenos Aires, Argentina

Todos los trabajos publicados en
ANALECTA VETERINARIA SON sometidos
a revisores externos

All articles published in ANALECTA VETERINARIA
are submitted to External
Scientific Reviewers

Supervisión de Estilo

Méd.Vet. Julio Bernal
Prof. Nora B. Vázquez

Impreso en Argentina
Printed in Argentina

EDITORIAL

Con el presente número de *Analecta Veterinaria* se cumplen 40 años desde la creación de la «Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata» y 30 años desde su actual denominación *ANALECTA VETERINARIA*. El largo camino recorrido han posicionado a *ANALECTA VETERINARIA* entre las revistas de reconocido prestigio científico de nuestro país, considerándola como una de las mejores publicaciones veterinarias.

Queremos mencionar nuestro agradecimiento a los numerosos colaboradores que durante 40 años han permitido alcanzar el nivel científico acorde a nuestra Universidad.

Por otro lado, debido a que en ciertos números se produjo errores de nomenclatura de tapa, se describen todos aquellos aparecidos desde la creación de la Revista en 1959.

Revista de la Facultad de Veterinaria de La Plata				ANALECTA VETERINARIA			
*Año Vol.	número	Fecha	Año de publicación	*Año Vol.	número	Fecha	Año de publicación
I	1	Enero-Abril	1959	1	1	Enero/Abril	1969
I	2	Mayo-Agosto	1959	1	2	Mayo/Agosto	1969
I	3	Septiembre-Diciembre	1959	1	3	Setiembre/Diciembre	1969
II	4	Enero-Abril	1960	2	1, 2, 3	Enero/Diciembre	1970
II	5	Mayo-Agosto	1960	3	1, 2, 3	Enero/Diciembre	1971
II	6	Septiembre-Diciembre	1960				
III	7	Enero-Abril	1961	4	1	Abril	1972
III	8	Mayo-Agosto	1961				
III	9	Septiembre-Diciembre	1961	IV, V**			
IV	10/11	Enero/Junio-Julio/Diciembre	1962		2, 3 y 1, 2, 3	Mayo/Diciembre Enero/Diciembre	1972 1973
V	12/13	Enero/Junio-Julio/Diciembre	1963	VI, VII, VIII**	1, 2, 3	Enero/Diciembre	1974, 1975, 1976
VI	14	Enero/Junio	1964				
VI	15	Julio/Diciembre	1964	IX	1, 2, 3	Enero-Diciembre	1977
VII	16	Enero/Junio	1965	X	1	Enero/Abril	1978
VII	17	Julio/Diciembre	1965	X, XI**	2, 3 y 1, 2, 3	Mayo/Diciembre Enero/Diciembre	1978 1979
VIII	18	Enero/Junio	1966				
VIII	19	Julio/Diciembre	1966	XII	1, 2, 3	Enero/Diciembre suplemento I	1980 1980
IX	20	Enero/Junio	1967				
IX	21	Julio/Diciembre	1967	XIII	1, 2, 3	Enero/Diciembre	1981
X	22	Enero/Abril	1968				
X	23	Mayo/Agosto	1968	XIV	1, 2, 3	Enero/Diciembre	1982
X	24	Setiembre/Diciembre	1968				
					En caras Internas	En tapa	
				XV	1	volumen 1 1995	1995
				XVI	2	volumen 2 1996	1996
				XVII	3	volumen 1 1997	1997
				18***	1, 2	volumen 18 1/2	1998
				19	1, 2	volumen 19 1/2	1999

*Se ha respetado la nomenclatura utilizada en cada número de la revista.

**Un sólo ejemplar

***Debido a la disparidad de criterios en la organización de *ANALECTA VETERINARIA* y considerando que es una revista de aparición semestral, hemos adoptado el criterio de la mayoría de las revistas científicas, en donde una cierta cantidad de números (por ejemplo mensuales) comprende un volumen (generalmente anual) de esta manera *ANALECTA VETERINARIA* publica un volumen anual y 2 números en ese período (nomenclatura en ambos casos en números arábigos). Con el vol 18 aparece la versión electrónica en Internet.

Artículos de Investigación

COMPORTAMIENTO ANTIGÉNICO DE CEPAS DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY. M.G.Echeverría, E.O. Nosetto 1-10

DIFERENCIAS DE FERTILIDAD EN RATONES SELECCIONADOS POR PESO. S. Bernardi, G. Brogliatti, M. I. Oyarzabal 11-17

Artículos de Revisión

GLOMERULOPATÍAS INMUNOMEDIADAS DE PERROS Y GATOS: ACTUALIZACIÓN DE LAS DISTINTAS ALTERNATIVAS PARA SU TRATAMIENTO. M.E. Diessler, A.N. del Amo 18-29

INDUCCIÓN DE ANEUPLOIDÍA POR METALES PESADOS: SU EVALUACIÓN A TRAVÉS DE TÉCNICAS CITOGÉNÉTICAS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS. A. Seoane, F.N. Dulout 30-39

HERPESVIRUS BOVINOS 1 y 5. C. L. Pidone, C. M. Galosi, M. E. Etcheverrigaray 40-50

RIESGO DE LA SALUD PUBLICA POR EXPOSICIÓN A ANIMALES DE PELETERÍA Martino P, Stanchi NO, Arias DO, Gatti EM 51-57

Comunicaciones Cortas

CAMPYLOBACTER TERMOTOLERANTES EN MENUDOS Y CARCASAS DE POLLOS PROVENIENTES DE DIFERENTES COMERCIOS EN LA CIUDAD DE LA PLATA. G. Giacoboni, M.C. Puchuri, R. Cerdá 58-61

CARACTERIZACIÓN DE VENENOS DE BOTHROPS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA N. O. Stanchi, C. Dilorenzo, C.M. Gómez, C. Grisolia, J. Copes 62-65

ANALECTA VETERINARIA Vol 19 # 1/2, 1999

Contents

Research articles

ANTIGENIC BEHAVIOUR OF SEVERAL AUJESZKY'S DISEASE VIRAL STRAINS. M.G. Echeverría, E.O. Nosetto 1-10

REPRODUCTIVE DIFFERENCES IN MICE SELECTED FOR BODY WEIGHT. S. Bernardi, G. Brogliatti, M. I. Oyarzabal 11-17

Review articles

IMMUNE-MEDIATED GLOMERULOPATHY IN DOGS AND CATS: ACTUALIZATION OF THE DIFFERENT TREATMENT ALTERNATIVES. M.E. Diessler, A.N. del Amo 18-29

ANEUPLOIDY INDUCTION BY HEAVY METALS: EVALUATION USING CYTOGENETIC TECHNICS IN MAMMALIAN CELLS. A. Seoane, F. Dulout 30-39

BOVINE HERPESVIRUS 1 AND 5. C. L. Pidone, C. M. Galosi, M. E. Etcheverrigaray 40-50

PUBLIC HEALTH RISK BY EXPOSITION TO FUR-BEARING ANIMALS Martino P, Stanchi NO, Arias DO, Gatti EM 51-57

Short Communication

THERMOTOLERANT CAMPYLOBACTER IN CARCASSES AND RETAIL POULTRY PARTS FROM DIFFERENT MARKET PLACES IN LA PLATA CITY. G.Giacoboni, Puchuri M, Cerdá R. 58-61

CHARACTERIZATION OF BOTHROPS VENOMS OF ARGENTINA BY SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS N. O. Stanchi, C. Dilorenzo, C.M. Gómez, C. Grisolia, J. Copes 62-65

COMPORTAMIENTO ANTIGÉNICO DE CEPAS DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY

M. G. Echeverría, E.O. Nosetto

Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

RESUMEN: Desde que la Enfermedad de Aujeszky fue diagnosticada por primera vez en Argentina en 1978, fueron sucediéndose numerosos brotes en diferentes lugares del país. El objetivo de este trabajo fue comparar diferentes cepas del virus de la Pseudorabia porcina. Para ello utilizamos 5 cepas argentinas (3 aisladas en nuestro laboratorio) y 4 de referencia internacional. Las mismas fueron caracterizadas mediante pruebas físico-químicas; sus proteínas comparadas por electroforesis en SDS-PAGE; su antigenicidad fue comparada al evaluar los 9 antisueros producidos en ratas mediante un sistema de virus neutralización cruzada y ELISA indirecto cruzado. Las pruebas físico-químicas permitieron observar pequeñas diferencias de comportamiento de las cepas virales frente a diferentes variables tales como pH, calor, acción de la tripsina, éter y cloroformo, las que en ningún caso aportan datos concluyentes que permitan observar diferencias significativas. El estudio de la movilidad de las proteínas estructurales de los virus en geles de poliacrilamida tampoco arrojó datos de importancia y resultó insuficiente para distinguirlos. El uso de la prueba de virus neutralización cruzada para estudiar su antigenicidad, en cambio, mostró resultados que permitieron comprobar que las cepas argentinas produjeron títulos neutralizantes más elevados que las extranjeras.

Palabras Clave: Enfermedad de Aujeszky; caracterización; antígenos

ANTIGENIC BEHAVIOUR OF SEVERAL AUJESZKY'S DISEASE VIRAL STRAINS

ABSTRACT: Since Aujeszky's Disease was first recognized in Argentina in 1978, many outbreaks occurred in different places in our country. Nine Pseudorabies virus strains, 5 Argentine -3 of them isolated in our laboratory- and 4 reference ones, were characterized by physicochemical, SDS-PAGE, virus neutralization and ELISA methods. Using trypsin, heat, ether, chloroform and pH in physicochemical analysis, only small differences were observed, as well as when the viral structural proteins were compared by SDS-PAGE. Cross virus neutralization test using 9 antisera produced in rats, showed that Argentine Pseudorabies virus strains elicited higher antibodies titres than those obtained with reference ones.

Key Words: Aujeszky's Disease; characterization; antigens

Fecha de recepción: 04/09/98

Fecha de aceptación: 02/09/99

Dirección para correspondencia:

María Gabriela Echeverría CC 296, La Plata (B1900AVW), Argentina Fax: (0221) 425-3276

E-mail: gecheverria@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Aujeszky (EA) o Pseudorrabia es una enfermedad viral, contagiosa y aguda de muchas especies animales, causada por un herpesvirus. El virus herpes suino o de la Pseudorrabia (PRV), llamado de acuerdo a la nomenclatura internacional "Suid Herpesvirus 1" (SHV-1), pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae*. El huésped natural del PRV es el cerdo, especie en la cual la infección por este virus se manifiesta de diferentes maneras según se trate de individuos adultos o jóvenes. Mientras que en los primeros causa abortos e infecciones latentes, para los segundos resulta letal. Otras especies -salvajes y domésticas- también pueden ser infectadas por este virus. En estos casos, la enfermedad tiene siempre un curso agudo y termina generalmente con la muerte de los individuos afectados (1).

En 1978, Ambrogi y colaboradores (2), diagnosticaron por primera vez la EA en Argentina y lograron el aislamiento del agente causal. A partir de ese año, los brotes de EA fueron ocurriendo, primero en las zonas de mayor producción porcina del país, para luego extenderse a otras regiones de menor intensidad de producción (3).

El cerdo es el principal reservorio del virus aunque también son fuentes de infección la atmósfera, el estiércol, las aguas servidas, el suelo y fomites, así como carnes, vísceras y carcasas contaminadas, y secreciones. La susceptibilidad del cerdo se ve aumentada debido a fatigas provocadas por el transporte, cambios climáticos y otras situaciones de estrés, tales como escasez de alimentos y deficiencias inmunitarias, que pueden favorecer la manifestación clínica de la enfermedad en piaras infectadas inaparentemente, por la reactivación del virus que se encuentra en estado latente (1).

Al poseer un rango tan amplio de huéspedes, el SHV-1 puede replicar en una extensa variedad de células (4, 5, 6, 7) que pueden presentar 2 tipos distintos de efecto citopatogénico (ECP) característico: formación de sincicios y/o redondeamiento celular. De acuerdo al comportamiento y a la habilidad de formar sincicios se pueden dividir las cepas en virulentas y de reducida virulencia.

Como todos los miembros de la familia *Herpesviridae*, el PRV es sensible a los solventes orgánicos y al calor y la tripsina, siendo las cepas virulentas más sensibles al calor que las de virulencia reducida (4).

De las 11 glicoproteínas (gps) halladas, gC y gD constituyen los mayores inmunógenos del SHV-1 (8), y junto con gB y gE, juegan un rol muy importante en la inducción de anticuerpos neutralizantes (AcN) en animales infecta-

dos (9, 10). Los anticuerpos (Ac) dirigidos contra gB, gC y gD son capaces de neutralizar la infectividad del SHV-1 en ausencia de complemento (C'), inhibiendo la adsorción viral (11). gH junto con gL inducen AcN independientes del C' (12). Los AcN aparecen a los 7 días post infección y alcanzan su pico máximo en aproximadamente 2 a 3 semanas, permaneciendo luego por varios meses. Además, por su efecto inmunosupresor, el PRV aumenta la severidad de las infecciones bacterianas (especialmente pulmonares) por *Pasteurella multocida* o *Streptococcus suis*.

El objetivo de esta investigación fue comparar las gps del SHV-1 de las cepas virales aisladas en nuestro país y de referencia procedentes de otros países, aisladas en distintos periodos, mediante el análisis de sus propiedades biológicas, determinando si existen diferencias en la respuesta de AcN contra las distintas cepas, y el grado de homología que existe entre las proteínas de las diferentes cepas de acuerdo a su peso molecular (PM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas virales

Fueron utilizadas las siguientes: Río Cuarto 79 (RC/79); Mercedes (Mer); Chañar Ladeado 7 y 15 (CL-7 y CL-15); Trenque Lauquen 92 (TL/92); Sweden 66 (S-66); Indiana Sullivan (Ind-S); Alfort (Alf); Yamagata 81 (YS-81). El origen y la historia de las mismas se encuentra resumido en otro trabajo (3).

Características del ECP en distintos cultivos celulares de línea

Medios y soluciones de cultivo: como medio de crecimiento celular (MC) se utilizó Medio Mínimo Esencial (MEM, Laboratorios Nissui, Japón) con el agregado de 0,3 mg/ml de glutamina, 200 UI/ml de penicilina, 0,5 mg/ml de estreptomycin, 20 UI/ml de nistatina y 10% de suero fetal bovino (SFB). El medio de mantenimiento celular (MM) fue el mismo que el anterior pero con un porcentaje reducido de SFB (2%). Para determinadas experiencias se utilizó medio de cultivo sin suero (MSS). Para la disgregación de las monocapas celulares se utilizó una solución de tripsina (Laboratorios Difco, USA) al 0,25% y sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 0,2% en solución tamponada de fosfatos (PBS).

Cultivos celulares: fueron utilizadas las siguientes líneas celulares: «Porcine Kidney» -riñón de cerdo- (PK15); «Continuous Porcine Kidney» -riñón de cerdo- (CPK); «Rabbit Kidney» -riñón de conejo- (RK13); «Madin Darby Bovine Kidney» -riñón de bovino- (MDBK); «Crandell's Feline Kidney» -riñón de gato- (CRFK) y «Helen

Lane» -tumor humano- (HeLa), cedidas por la Universidad de Tokio y el Instituto Nacional de Salud Animal del Japón. Otra línea celular utilizada fue «Baby Hamster Kidney» -riñón de hamster- (BHK) cedida por el Laboratorio Med Vet, La Plata.

Replicación viral: todas las cepas fueron replicadas entre dos y tres veces sobre las células de origen porcino (CPK), desarrolladas en frascos de vidrio de diferentes capacidades. Los sobrenadantes correspondientes fueron luego centrifugados, divididos en tubos Eppendorf (0,5 ml) y congelados a -70°C hasta su uso.

ECP en células teñidas con hematoxilina y eosina (H-E): todas las líneas celulares fueron sembradas utilizando MC, en una concentración de 2×10^5 a 5×10^5 células/ml, en cajas de Petri de 60 mm de diámetro (19 cm^2) que contenían 1 cubreobjetos de $18 \times 18 \text{ mm}$ cada una. Se utilizaron 10 cajas de Petri por cada una de las células utilizadas: 9 fueron empleadas para cada una de las cepas virales y una para las células control sin inocular. Una vez que las monocapas fueron confluentes sobre los cubreobjetos, el MC fue aspirado y cada una de las cajas fue inoculada con 0,5 ml de cada una de las cepas virales (títulos entre $10^{6,5}$ y $10^{7,5}$ DICT₅₀/0,05 ml), dejándose en adsorción a 37°C durante 60 min en atmósfera con 5% de CO_2 . Posteriormente, se retiraron los inóculos, se lavaron las monocapas con PBS y finalmente se colocaron 6 ml de MM en cada placa. Fueron incubadas en las condiciones antedichas durante 14 h, a excepción de las que contenían RK13 que solo fueron incubadas durante 9 h. Luego de este período fueron lavadas 3 veces con PBS y los cubreobjetos fueron fijados con solución de Carnoy durante 15 min. Por último, cada monocapa fue teñida con el método convencional de H y E.

Pruebas de caracterización físico-química

Para este trabajo se utilizaron células CPK, solución fisiológica -ClNa 0,15 M-(SF), SFB, bicarbonato de sodio, medio 199, MM, MC, tripsina, éter y cloroformo de alta calidad. Todas las pruebas fueron realizadas en microplacas de fondo plano de 96 pocillos, las cuales fueron incubadas a 37°C en atmósfera reducida de CO_2 durante 6 días (13).

Acción del calor: se efectuaron las diluciones virales en SF en tubos por duplicado los que fueron incubados a Baño de María (BM) a 56°C durante 15 min y a 56°C durante 30 min respectivamente.

Acción de la tripsina: se efectuaron diluciones en partes iguales de tripsina al 1% (0,5 ml) e inóculo puro (0,5 ml), logrando una concentración final de tripsina de 0,5%. El mismo

procedimiento se realizó con tripsina al 0,2% (concentración final 0,1%). Se mantuvo el pH en 7,2 con bicarbonato de sodio y se incubaron los tubos a 37°C durante 60 min a BM. Posteriormente la tripsina fue inactivada con el agregado de 0,1 ml de SFB.

Acción del pH: se realizaron las diluciones virales en Medio 199 (pH 3) y se incubaron a 4°C durante 18 h.

Acción del éter: se mezclaron 0,1 ml de éter y 0,5 ml de virus (concentración final 20%), se agitaron los tubos durante 10 min y la mezcla se incubó a 4°C durante 18 h. Luego, los tubos se centrifugaron a $1200 \times g$ en rotor 3N (centrífuga Tomy Seiko) durante 10 min, el éter fue aspirado y el inóculo diluido e inoculado.

Acción del cloroformo: se mezclaron 2 ml de virus con 0,1 ml de cloroformo (concentración final 5%), y se procedió de la misma forma que con el éter.

Las diluciones virales fueron realizadas en base logarítmica 10 (10^{-1} a 10^{-8}) y cada una de ellas inoculada en 5 pocillos (0,05 ml) con 0,1 ml de células CPK. Se dejaron como controles negativos células sin inocular, y como controles positivos, una titulación paralela de cada virus sin tratamiento en cada microplaca.

Preparación de los Antígenos (Ag)

Obtención de Ag de membrana: (membrana citoplásmica celular modificada por las gps virales). Se infectaron monocapas de células MDBK con inóculos con un título entre 10^6 y 10^7 DICT₅₀/0,05 ml de cada una de las cepas virales. Luego de la adsorción a 37°C durante 60 min, se completó con MSS y se dejó en incubación en las mismas condiciones, hasta la aparición de ECP generalizado. Las células fueron recogidas junto con los medios y fueron centrifugadas a $3.200 \times g$ en rotor 5N (centrífuga Tomy Seiko) durante 15 min. El sobrenadante se conservó congelado y el «pellet» celular fue lavado con buffer TEN (20 mM Tris-ClH pH 7,4; 0,1 mM EDTA; 10 mM ClNa) y centrifugado nuevamente como en el paso anterior. El «pellet» obtenido fue resuspendido en una concentración entre 50 y 100 veces menor al volumen del medio de cultivo sobrenadante original, en buffer TEN-1% Nonidet P-40 y se dejó a 4°C durante 60 min. Por último, se centrifugó a $7.500 \times g$ durante 20 min en el mismo rotor y centrífuga, se descartó el «pellet» y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a $90.000 \times g$ en rotor 80 Ti (Beckman L8-80) durante 60 min. El Ag resultante fue dividido en alícuotas y conservado a -70°C hasta su uso (14).

Obtención de virus purificado: el sobrenadante clarificado de cada uno de los cultivos inoculados con cada cepa viral fue concentrado mediante ultracentrifugación en un rotor

Beckman 50 Ti a 100.000 x g durante 3 h. El «pellet» obtenido fue resuspendido en un volumen de TE 200 veces menor al volumen de medio original y se purificó en un gradiente continuo de tartrato de potasio 10-40% en buffer TE. El «pellet» final fue resuspendido en 0,1 ml de buffer TE y titulado. Los títulos obtenidos oscilaron entre $10^{5,5}$ y $10^{6,75}$ DICT₅₀/0,05 ml. Cada uno de los virus fue utilizado en la inoculación de los animales de experimentación, por lo que posteriormente fueron inactivados con luz UV durante 15 min.

·Animales de experimentación. Esquema de inoculación

Se utilizaron ratas convencionales Long Evans machos de 2 meses de edad. Se obtuvieron muestras de suero sanguíneo para controlar que no fuesen tóxicos y fueran carentes de Ac anti-SHV-1. Estos sueros se utilizaron como controles negativos de cada uno de los animales utilizados. Las inoculaciones fueron realizadas por vía intraperitoneal con intervalos de 15 a 20 días entre cada una. La primera se realizó con 0,25 ml de virus inactivado y 0,25 ml de adyuvante completo de Freund; la segunda, con iguales volúmenes pero utilizando adyuvante incompleto; la tercera con 0,5 ml de virus sin adyuvante y la cuarta, con 0,5 ml de Ag de membrana. Previamente a cada inoculación, se sangraron los animales y se titularon los sueros. Los sueros anti-PRV fueron obtenidos de las ratas mediante punción cardíaca y sangrado a blanco. Fueron centrifugados para eliminar los elementos formes, divididos en alícuotas y congelados hasta su uso. Parte de ellos fue inactivada a 56°C durante 30 min.

·Virus neutralización (VN) cruzada

Se usaron 100 partículas infectivas / 0,025 ml de cada una de las cepas virales. Fue utilizado C' heterólogo liofilizado, diluido 1:20 en MSS, dividido en alícuotas y congelado a -80°C hasta su uso. Se enfrentó cada una de las cepas virales con los 9 antisueros producidos; 2 con sueros descomplementados y 2 con sueros descomplementados y el agregado de C' heterólogo (total 36 placas). El método utilizado fue el convencional suero variable - virus constante (15).

·ELISA indirecto cruzado

Los Ag de membrana producidos fueron diluidos 1/1000 en buffer carbonato-bicarbonato 50 mM con los que se adsorbieron placas de ELISA. Luego de la incubación a 4°C durante 24 h, las placas se vaciaron y se colocó 0,1 ml de solución de bloqueo (PBS-0,1% seroalbúmina bovina) durante 1 hora a 37°C. Luego se lavó con Tween 20 al 0,05% en PBS tres ve-

ces. Los antisueros obtenidos en ratas fueron diluidos en PBS-5% leche en polvo descremada (SD) desde 1/4 hasta 1/8192, luego de 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se incorporó anti-gamaglobulina de rata conjugada con peroxidasa diluida 1/1000 en SD (Sigma). Luego de 60 min de incubación y posteriores lavados se colocó el sustrato específico conteniendo: ácido cítrico 0,1 M, fosfato disódico 0,2 M, peróxido de hidrógeno al 0,01% y ABTS 0,3 mg/ml. El mismo procedimiento se realizó con antígenos controles. Los valores de absorbancia fueron leídos con filtro de 405 nm a los 60 min de reacción utilizando un lector Titertek Multiskan.

·Electroforesis en SDS-PAGE.

Se trabajó en geles al 10% empleando un sistema de buffer discontinuo. Las muestras fueron procesadas para trabajar en condiciones reducidas y no reducidas. Las condiciones de corrida se estandarizaron a 36 mA durante 3,5 h en placas de 170 x 190 x 1 mm y la tinción fue realizada con azul brillante de Coomassie.

RESULTADOS

·Características del ECP en distintos cultivos celulares

Todas las cepas virales empleadas fueron replicadas en diferentes sustratos celulares: PK15, CPK, RK13, MDBK, CRFK, HeLa y BHK, células de tipo epitelial, con excepción de BHK que es de tipo fibroblástica. El tiempo de incubación de las cepas virales en las células fue de 14 h, excepto en el caso de la línea RK13 que solo resistió 9 h de incubación antes que el ECP fuera total. Tanto las células RK13 como las CRFK forman sincicios espontáneos en los controles sin inocular, de aproximadamente 4 células promedio cada uno. En la tabla 1 se resumen las características de ECP presentado por las distintas cepas virales en los diferentes sustratos celulares.

·Pruebas de caracterización fisico-química

En la tabla 2 se resumen los resultados de las pruebas de caracterización fisico-química realizadas en las 9 cepas de PRV.

·VN cruzada

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 3 y 4.

·ELISA Indirecto cruzado

La tabla 5 ilustra los resultados obtenidos.

Tabla 1: características de ECP de las cepas virales en los diferentes sustratos celulares
 Table 1: CPE obtained with viral strains inoculated onto different cell lines

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92	S-66	Ind-S	Alf	YS-81
PK15*	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S
CPK*	A, CR, P, CI	A, CR, CI	A, CR, P, CI	A, CR, P, CI	A, CR, P, CI	A, CR, CI	A, CR, P, CI, S	A, CI	A, CR, P, CI
RK13**	A, P, S	A, P, S	A, P, S	A, P, S	A, P, S	A, P, S	A, P, S	A, P, S	A, P, S
MDBK** *	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S
CRFK*** *	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S
HeLa*	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S
BHK****	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S

Referencias: A=agujeros; CR=células redondas; P=puentes; CI=cuerpos de inclusión intranucleares; S=sincicios. * sincicios pequeños de 5 células promedio ** sincicios gigantes, apariencia de ser toda la monocapa un gran sincicio *** sincicios grandes (20 células promedio) y pequeños (6 células promedio) juntos **** sincicios de 10 células promedio.

Tabla 2: pruebas de caracterización fisico-química realizadas en las 9 cepas de PRV
 Table 2: physicochemical characterization of 9 strains of PRV

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92	S-66	Ind-S	Alf	YS-81
Título*	10 ⁷	10 ^{7,75}	10 ^{6,5}	10 ^{7,5}	10 ^{7,5}	10 ^{6,5}	10 ⁷	10 ^{7,5}	10 ^{7,5}
Eter	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorof.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trip. 0,5	10 ^{2,25}	10 ⁴	10 ^{3,75}	10 ^{3,5}	10 ⁵	10 ⁴	10 ^{2,75}	10 ^{2,5}	10 ^{4,25}
Trip. 0,1	10 ^{6,5}	10 ⁷	10 ^{6,25}	10 ⁷	10 ^{5,75}	10 ^{5,75}	10 ^{6,5}	10 ⁷	10 ^{7,25}
56°C 15'	10 ^{1,5}	10 ^{2,25}	10 ^{1,5}	10 ^{0,75}	10 ^{2,5}	10 ^{1,5}	10 ^{1,5}	10 ^{1,5}	10 ^{1,5}
56°C 30'	10 ^{0,75}	-	-	10 ¹	10 ^{1,5}	-	-	-	10 ^{1,5}
pH 3	10 ^{1,5}	-	-	-	10 ^{1,5}	10 ¹	-	-	-

Los títulos se expresan en DICT₅₀/0,05 ml. (*) indica título previo al tratamiento; (-) indica ausencia de ECP.

Electroforesis en SDS-PAGE

Los Ag de membrana de las 9 cepas y el control negativo (células sin infectar) otorgaron un número elevado de bandas proteicas en la concentración utilizada (>30 bandas en el caso de Ag reducidos). Algunas de estas bandas (120, 40 y 30 kD en Ag no reducidos y 140, 110, 80, 62 y 52 kD en Ag reducidos) están presentes únicamente en todas las cepas virales y ausentes en los controles sin inocular, lo que indica que son específicas de virus.

Los patrones obtenidos con las 9 cepas de PRV fueron similares, existiendo pequeñas

diferencias: las cepas CL-7, CL-15 y TL/92 tienen prácticamente el mismo perfil proteico excepto la ausencia de una banda de aproximadamente 38 kD en CL-7 y CL-15, banda que también resulta ausente en Ind-S. Alf también tiene una banda ausente de aproximadamente 45 kD. Mer presenta un grupo de bandas de entre 33 y 35 kD. Mer, Alf y YS-81 tienen una banda ausente de aproximadamente 140 kD; RC/79 presenta una banda de 100 kD y el resto de las cepas muestran pequeñas diferencias de movilidad: Mer en 70, 40 y 30 kD.

Tabla 3: reactividad de los antisueros producidos en ratas contra las diferentes cepas virales (sueros inactivados a 56°C 30 min con el agregado de C' heterólogo)

Table 3: reactivity of 9 antisera produced in rats against different viral strains (the sera were inactivated at 56°C 30 min, and C' was added)

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92	S-66	Ind-S	Alf	YS-81	Cer*
RC/79	128	16	32	16	32	8	-	-	4	1024
Mer	256	32	64	64	128	16	4	16	16	512
CL-7	128	4	64	32	64	4	-	8	4	512
CL-15	256	64	128	128	64	16	4	16	16	512
TL/92	64	16	64	32	64	4	-	8	4	1024
S-66	64	32	32	32	32	8	4	4	8	512
Ind-S	256	128	128	64	128	16	4	16	16	2048
Alf	64	8	16	32	32	4	-	8	4	128
YS-81	>256	128	64	128	256	32	4	32	32	>4096

En la horizontal se ubicaron los antisueros y en la vertical las distintas cepas virales. Los títulos se expresan como la inversa de la dilución que neutraliza 10^2 DICT₅₀/0,05 ml. (-) indica ausencia de AcN. (*) Suero policlonal de cerdo de referencia.

Tabla 4: reactividad de los antisueros producidos en ratas contra las diferentes cepas virales (sueros inactivados a 56°C 30 min sin C')

Table 4: reactivity of 9 antisera produced in rats against different viral strains (the sera were inactivated at 56°C 30 min without adding C')

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92	S-66	Ind-S	Alf	YS-81	Cer*
RC/79	64	4	16	16	32	4	-	-	-	128
Mer	32	8	32	16	32	8	4	8	8	16
CL-7	64	8	32	16	16	-	-	4	-	32
CL-15	64	4	64	32	32	4	-	4	-	64
TL/92	16	8	16	16	16	-	-	4	-	64
S-66	32	32	16	8	32	4	4	-	4	16
Ind-S	128	64	64	32	64	-	-	-	-	128
Alf	64	4	16	16	32	4	-	4	4	64
YS-81	128	4	8	8	64	8	4	8	8	128

En las finas se ubicaron los antisueros y en las columnas las distintas cepas virales. Los títulos se expresan como la inversa de la dilución que neutraliza 10^2 DICT₅₀/0,05 ml. (-) indica ausencia de AcN. (*) Suero policlonal de cerdo de referencia.

Tabla 5: resultados obtenidos en ELISA indirecto cruzado
 Table 5: results obtained by cross-indirect ELISA

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92	S-66	Ind-S	Alf	YS-81
RC/79	256	16	64	32	128	16	4	8	4
Mer	-	256	128	64	512	128	16	128	64
CL-7	-	-	128	64	-	-	-	-	-
CL-15	2048	128	128	512	512	64	-	-	-
TL/92	1024	-	1024	1024	2048	128	-	128	32
S-66	>8192	1024	512	1024	>8192	256	16	256	256
Ind-S	>8192	1024	512	1024	4096	512	64	512	128
Alf	>8192	1024	1024	256	2048	512	256	512	256
YS-81	2048	1024	2048	512	1024	256	-	256	128

En las filas se ubicaron los antisueros y en las columnas distintas cepas virales utilizadas como antígenos.

DISCUSIÓN

En general, todas las cepas virales produjeron el mismo ECP en las distintas líneas celulares: lisis, sincicios y/o cuerpos de inclusión (CI) intranucleares eosinófilos (PK15, RK13, MDBK, CRFK, HeLa y BHK). En CPK ninguna cepa produjo sincicios con excepción de Ind-S que los produjo escasos y muy pequeños, dato que no es significativo. Los CI característicos fueron observados en todas las líneas celulares excepto en RK13, debido probablemente al menor tiempo en que el virus produjo ECP en estas células. Según lo expresado por Bitsh (5), las cepas altamente patogénicas son capaces de formar sincicio a lo que Golais y Sabó, (16) agregan que las atenuadas producen únicamente redondeamiento celular. Nosotros obtuvimos ambas manifestaciones de una misma cepa en diferentes cultivos celulares. Kaplan y Ben-Porat (17) observaron que con alta multiplicidad de infección, el virus de la EA destruye una monocapa de RK13 en menos de 18 h de incubación, lo que en nuestro caso se redujo a 9 h. Considerando entonces el corto tiempo requerido para la aparición de ECP y la producción llamativa de sincicios, es que se sugiere el uso de esta línea para el intento de aislamiento viral.

En el estudio realizado por Bodon y col. (18) las cepas virulentas resultaron sensibles a la tripsina en concentraciones de 0,5 mg/ml; para ellos, resistencia al calor y a la tripsina se acompañan de virulencia reducida. Otros au-

tores no obtuvieron relación directa entre termoresistencia y virulencia por lo que no consideran que la sensibilidad al calor sea adecuada para la caracterización de cepas. Para Bartha y col. (4) el tratamiento con calor redujo los títulos originales (4-5 log) dependiendo de la cepa viral, y mediante el tratamiento con tripsina la sensibilidad fue menor utilizándola al 0,1%. Bodon y col. (18), Bartha y col. (4) y Lloyd y Baskerville (19) sugieren que el PRV puede ser diferenciado, por su sensibilidad a la tripsina, en: atenuadas = tripsinosensibles y virulentas = tripsinoresistentes, especulando con que el marcador de sensibilidad a la tripsina puede correlacionarse con su virulencia. Por el contrario, Platt y col. (20) no encontraron esa correlación pero sí observaron relación directa entre inactivación térmica y sensibilidad a la tripsina. Los resultados de los experimentos indicados en la tabla 2 muestran pocas diferencias de sensibilidad de las 9 cepas sometidas a los diferentes agentes físico-químicos. Las 9 cepas presentaron reducciones de títulos entre 2,5 y 5 log al ser sometidas a la acción de la tripsina en concentración del 0,5%, siendo Alf la cepa más sensible. Las mismas, enfrentadas con tripsina al 0,1%, sufrieron menores reducciones de títulos (0,25 y 1,75 log) siendo la TL/92 la más sensible, lo que demuestra que es necesaria una concentración mínima de tripsina para reducir la virulencia de PRV en forma significativa.

Las cepas se comportaron altamente sen-

sibles cuando fueron sometidas a la acción del calor: disminuyeron entre 5 y 6,75 log a 56°C durante 15 min, siendo CL-15 la más sensible y prolongando el período a 30 min con la misma temperatura, la virulencia se redujo desde 6 log a la inactivación total, siendo las más sensibles Mer y Alf (7,75 log), Ind-S (7 log) y CL-15 y S-66 (6,5 log).

Con respecto a la labilidad experimental por las cepas frente al pH ácido, las variaciones oscilaron entre 5,5 log y 7,5 log siendo las más lábiles Mer, CL-15, Alf y YS-81 (7,5 log), Ind-S (7 log) y CL-7 (6,5 log).

La sensibilidad frente a diferentes agentes físico-químicos, no es de utilidad en estos casos al utilizar 9 cepas aisladas de campo, como lo demuestra también Tozzini (7) quien, trabajando con 4 cepas de campo, obtuvo las mismas variaciones de título en la resistencia al calor y no pudo correlacionar la sensibilidad de cepas con respecto a diferentes agentes, ni establecer cuál fue la más resistente ni cuál la más sensible globalmente.

De acuerdo a los resultados contradictorios obtenidos por diversos autores con respecto a la relación sensibilidad a la tripsina-calor/virulencia, es que consideramos que estos marcadores no son útiles en estos casos. En nuestra experiencia solo utilizamos cepas virulentas, las que no mostraron diferencias de sensibilidad. Por lo tanto esta metodología (sensibilidad a diferentes agentes y ECP en cultivos celulares) no permite la identificación de cepas, ni aún el agrupamiento en distintos serotipos, debido a su elevada laboriosidad y escaso poder resolutivo (21).

Para determinar si los diferentes aislamientos de PRV muestran diferencias en cuanto a su antigenicidad, se realizaron inmunizaciones periódicas a 9 ratas a fin de obtener 9 antisueros policlonales que fueron utilizados en VN cruzada y ELISA indirecto cruzado. Estas ratas resultaron de fácil maniobrabilidad para el esquema de inmunización seguido.

Es sabido que el C' favorece la acción neutralizante de muchos virus, sobre todo para la detección de Ac tempranos, mejorando de algún modo la unión Ag-Ac (22). La neutralización dependiente del C' fue conocida entre los miembros de la familia Herpesviridae, en sueros humanos o de conejos con Ac contra Virus Herpes Simplex 1 y fue utilizada también para la detección de infección temprana de Herpes Virus Bovino 1 y Rinotraqueítis Felina como método más sensible (23). Los AcN dirigidos contra gC y gD pueden ser independientes del C', mientras que los dirigidos contra gB son C' dependientes (21). Sin embargo, como fue demostrado por Ben-Porat y col. (9), existen variaciones antigénicas entre cepas de PRV, sobre todo

entre aquellas aisladas de diferentes áreas geográficas. Los aislamientos de PRV de la misma zona geográfica parecen antigénicamente similares. Estas variaciones antigénicas se presentan principalmente en gE y gC (ambas esenciales para la replicación viral *in vitro*) y no en gB. Yamada y col. (10), utilizando anticuerpos monoclonales (AcMo) observaron que Ac dirigidos contra gB muestran diferencias de reactividad entre cepas americanas y japonesas, pero no entre las japonesas entre sí. Esta diferente reactividad también fue observada en nuestro laboratorio cuando realizamos VN cruzada empleando 5 AcMo contra 7 cepas de PRV. Cuatro de ellos neutralizan en presencia de C' y la diferente reactividad permite reunir a las cepas en 2 grupos (YS-81, S-66, CL-15 y Mer por un lado e Ind-S, RC/79 y Alf por el otro), no existiendo relación entre fenotipo y genotipo como se observó en trabajos previos (14).

La tabla 3 muestra la diferente reactividad cruzada de las cepas frente al C' heterólogo: los mayores títulos neutralizantes se observaron contra las cepas argentinas. En la tabla 4 se observa que efectivamente los sueros sin el agregado de C' presentaron títulos menores. La actividad neutralizante aumentada por el C' también se demuestra por la diferencia de títulos del suero policlonal de cerdo de referencia de las tablas 3 y 4. En ELISA indirecto cruzado existió gran variabilidad. Al enfrentarse a la mayoría de los Ag, los antisueros dirigidos contra cepas argentinas brindaron títulos más elevados, con ciertas excepciones como la escasa reactividad que tuvieron frente al Ag CL-7. Con los antisueros obtenidos contra cepas de referencia no se obtuvieron títulos mayores a 1:512, mientras que los antisueros dirigidos contra las cepas Argentinas reaccionaron con títulos >1:8192 y no se halló alta correlación entre AcN y Ac totales. Probablemente esta diferencia de reactividad se debería, ya sea a características inmunológicas individuales de cada rata, ya sea por diferencias antigénicas entre cepas de diferentes áreas geográficas o bien a que la alta cantidad de pasajes por cultivo que tienen las cepas recibidas en nuestro laboratorio hayan modificado su antigenicidad.

Cabe recordar los pesos moleculares conocidos de algunas de las gps presentes en el virión PRV: gB: 155 kD (subunidad a: 110-125; subunidad b: 68-74; subunidad c: 55-58); gC: 92 kD; gD: 55-60 kD; gE: 130 kD; gI: 63 kD; gH: 95 kD; gK: 36 kD; y gM: 45 kD. Los patrones obtenidos con las 9 cepas de PRV fueron similares, existiendo pequeñas diferencias, a saber: las cepas aisladas más recientemente en nuestro país (CL-7, CL-15 y TL/92) tienen prácticamente el mismo perfil proteico excepto la ausencia de una banda de aproximadamente 38

kD en CL-7 y CL-15, banda que podría corresponderse con gK y que también resulta ausente en Ind-S. Alf también tiene una banda ausente de aproximadamente 45 kD, tamaño aproximado de gM. Mer es la cepa que muestra mayores diferencias con el resto de las cepas argentinas e incluso difiere mucho de las de referencia: en ella aparece un grupo de bandas de entre 33 y 35 kD. En general las diferencias entre las cepas se comienzan a observar en PM < 60 kD y podría tratarse de gps como gD (55-60 kD), gK (36 kD) y gM (45 kD), de las cuales la primera tendría significancia antigénica ya que tanto la gK como la gM han sido descritas recientemente y no se conoce aún su función específica. El resto de las diferencias de bandas de PM muy bajos, podrían ser precursores proteicos o restos de otras proteínas celulares, proteínas contaminantes, nuevas gps, proteínas aún no homologadas o productos parcialmente glicosilados (24).

Los resultados obtenidos para el perfil proteico de cepas de PRV coinciden con los de otros autores: Ben-Porat y col. (9) no pudieron establecer diferencias entre cepas de distintos lugares del mundo aún utilizando inmunoprecipitación con AcMo. Si pudieron establecerlas entre cepas vacunales y cepas salvajes. Ellos concluyen que además, los aislamientos de PRV

de la misma área geográfica aparecen antigénicamente similares.

En nuestro caso, solo Mer aparece diferente a las demás, sobre todo en SDS-PAGE de Ag de membrana sin reducción. Cabe destacar que esta cepa fue recibida en el laboratorio sin conocer su número anterior de pasajes en cultivos celulares.

CONCLUSIONES

·No es posible establecer diferencias marcadas en el ECP producido por varias cepas de PRV en cultivos celulares.

·Se sugiere el uso de la línea celular RK13 para aislamiento de PRV dada la rapidez de aparición de ECP y la practicidad del uso de esta línea celular en el laboratorio.

·Las pruebas fisico-químicas no aportan datos concluyentes que permitan observar diferencias significativas entre las cepas de campo de PRV.

·Con los antisueros obtenidos en ratas no se observaron diferencias entre cepas argentinas de PRV.

·El estudio de la movilidad de las proteínas estructurales de las diferentes cepas de PRV, no arrojó datos de importancia que permitieran diferenciarlas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kluge JP, Beran GW, Hill HT, Platt KB. Pseudorabies (Aujeszky's Disease). En: Leman, A. D.; Straw, B. E.; Mengeling, W. L.; D'allaire, S.; Taylor, D. J. (eds.): Diseases of swine. 7a edition, Ed. Iowa State University Press, Ames IA, (USA) 1993; 312-323.
2. Ambrogi A, Giraudo J, Busso J, Bianco B, Bagnat E, Segura de Aramburu M, Ramos B, Ceriatti S. Primer diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky en cerdos en la República Argentina. Gaceta Veterinaria 1981; tomo XLIII: 58-64.
3. Echeverría MG. Estudio comparativo entre cepas del virus de la Pseudorabia porcina aisladas en el país y de referencia mediante pruebas fisico-químicas, electroforesis en SDS-PAGE y patrones de restricción del ADN. Tesis Doctoral 1996, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.
4. Bartha A, Belak S, Benyeda Y. Trypsin- and heat-resistance of some strains of the Herpesvirus group. Acta Vet Acad Sci Hung 1969; 19: 97-99.
5. Bitsch V. Correlation between the pathogenicity of field strains of Aujeszky's Disease virus and their ability to cause cell fusion -syncytia formation- in cell cultures. Acta Vet Scand 1980; 21: 708-714.
6. Onyekaba C, Bueon L, King P, Fahrman J, Goyal S. Susceptibility of various cell culture systems to Pseudorabies virus. Comp Immun Microbiol Infect Dis 1987; 10: 163-166.
7. Tozzini F. Characteristics of field and modified Aujeszky's Disease strains. En: Wittmann G.; Hall S. A. (eds): Aujeszky's disease. Curr Top Vet Med Anim Sci Vol 17. Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 1982; 31-36.
8. Klupp BG, Baumeister J, Dietz P, Granzow H, Mettenleiter T. Pseudorabies virus glycoprotein gK is a virion component involved in virus release but is not required for entry. J. Virol 1998; 72: 1949-1958.
9. Ben-Porat T, DeMarchi J, Lomniczi B, Kaplan A. Role of glycoproteins of Pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. Virol 1986; 154: 325-334
10. Yamada S, Imada T, Nishimori T, Sekikawa K, Shimizu M. Antigenic variation of Pseudorabies virus glycoproteins gII and gIII demonstrated by neutralizing monoclonal antibodies. Arch Virol 1991; 119: 285-290.
11. Mettenleiter TC. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's Disease). Vet Immunobiol Immunopath 1996; 54: 221-229.
12. Klupp B, Baumeister J, Karger A, Visser N, Mettenleiter T. Identification and characterization of a novel structural glycoprotein in Pseudorabies virus, gL. J Virol 1994; 68: 3868-3878.
13. Galosi CM, Nosetto EO, Gimeno EJ, Gómez Dunn C, Etcheverrigaray ME, Ando Y. Equine Herpes virus 1 (EHV-1): characterization of a viral strain isolated from equine plasma in Argentina. Rev. Sci. Tech. Off Int Epiz 1989; 8: 117-122.
14. Nosetto EO, Echeverría MG, Horimoto T, Pecoraro MR, Galosi CM, Tohya Y, Norimine J, Takahashi E, Etcheverrigaray ME, Mikami T. Characterization of several Aujeszky's Disease viral strains by virusneutralization test using monoclonal antibodies. Viral Immunol 1997; 10: 159-166.
15. Martin S, Wardley RC, Donaldson AJ. Serological response of pigs infected with Aujeszky's Disease virus. Res Vet Sci 1983; 35: 227-233.
16. Golais F, Sabo A. The effect of temperature and urea on virulent and attenuated strains of Pseudorabies virus. Acta Virol 1975; 19: 387-392
17. Kaplan AS, Ben-Porat T. The effect of Pseudorabies virus on the nucleic acid metabolism and the nucleic acid of rabbit kidney cells. Virol 1959; 8: 352-366.
18. Bodon L, Meszaros J, Papp-Vid G, Romvary J. Properties of Aujeszky's Disease virus strains isolated from swine pneumonia cases. Acta Vet Sci Hung 1968; 18: 107-109.
19. Lloyd G, Baskerville A. In vitro markers to differentiate an avirulent from a virulent strain of Aujeszky's Disease virus. Vet Microbiol 1978; 3: 65-70.
20. Platt KB, Mare CJ, Hinz PN. Differentiation of vaccine strain and field isolates of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus: trypsin sensitivity and mouse virulence markers. Arch Virol 1980; 63: 107-114.
21. Christensen LS. The population biology of Suid Herpes virus 1. APMIS Supplem 1995; 48: 1-48.
22. Bitsch V, Eskildsen M. Complement dependent neutralization of Aujeszky's Disease virus by antibody. En: Wittman G., Hall, S. A. (eds.): Aujeszky's Disease. Cur. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 17, Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 1982; 41-49.
23. Horimoto T, Limcumpao J, Tohya Y, Takahashi E, Mikami T. Enhancement of neutralizing activity of anti-Feline Herpes virus 1 sera by complement supplementation. Jpn J Vet Sci 1989; 51: 1025-1027.
24. Lukacs N, Thiel HJ, Mettenleiter T, Rziha HJ. Demonstration of three major species of Pseudorabies virus glycoproteins and identification of a disulfide-linked glycoprotein complex. J Virol 1985; 53: 166-173.

DIFERENCIAS DE FERTILIDAD EN RATONES SELECCIONADOS POR PESO

S. Bernardi¹, G. Brogliatti², M. I. Oyarzabal³

¹Cátedra de Histología II y Embriología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de Rosario

²Centro de Investigaciones Reproductivas Pérez Compans - Escobar

³Cátedra de Producción Animal II, Facultad de Ciencias Veterinarias, CIUNR

RESUMEN: La selección direccional de un carácter de interés económico puede ocasionar deterioro en otros caracteres comprometidos con la aptitud biológica. Con el objetivo de evaluar si la selección divergente para peso corporal realizada en dos líneas, originadas a partir de una población testigo de ratones CF1, había modificado caracteres reproductivos, se estudió: edad de la apertura vaginal y primer estro, duración del ciclo estral, tamaño de camada, número de pariciones e intervalo parto-parto. La duración del ciclo estral de las líneas seleccionadas fue similar a la de la población testigo, no ocurrió lo mismo con el resto de las variables. Además, se observó que la población testigo pare más veces con intervalos interpartos menores, tiene un número mayor de crías y el tamaño de camada no decae rápidamente con el transcurso de las pariciones. La apertura vaginal es un indicador de la llegada a la madurez sexual, está asociada positivamente con el peso a la misma edad en la población testigo. Esta asociación se invierte en las líneas seleccionadas. Los resultados evidenciaron que la selección por peso modificó caracteres reproductivos, y como consecuencia, disminuyó la producción en gramos evaluada a nivel poblacional y a lo largo de la vida reproductiva.

Palabras Clave: selección divergente, peso corporal, caracteres reproductivos, ratones

REPRODUCTIVE DIFFERENCES IN MICE SELECTED FOR BODY WEIGHT

ABSTRACT: The directional selection of a character of economic interest can produce an impairment in other characters, mainly in those highly involved in the biological fitness, such as reproductive characters. With the objective of evaluate if the two way selection for body weight had altered reproductive characters in two lines, originated from a CF1 mice randombred population without selection, the following characters were studied: age at vaginal opening and at first estrus, estrous cycle duration, litter size, parturition number and calving interval. The response to weight selection was evident, mainly, because of a significant weight increase of the upward selection animals. The estrous cycle duration was similar in the studied lines, but the others variables showed different behaviours. When studying the reproductive behavior, it was observed that the control population has more parturitions and the calving intervals are shorter, their litter size is bigger and does not decrease within parturitions. Vaginal opening is an indicator of sexual maturity and correlates positively with body weight at the same age in the control line, but it does not correlate with body weight at 49 days, that was the selected character. These correlations are inverted in the selected lines. The results showed that the body weight selection alters the reproductive characters, and as a consequence, decreases the production in grams when an evaluation at population level and throughout their reproductive life is done.

Key Words: two way selection, body weight, reproductive characters, mice

Fecha de recepción: 05/12/98

Fecha de aceptación: 02/09/99

Dirección para correspondencia:

María Inés Oyarzabal. Facultad de Ciencias Veterinarias UNR. Ov. Lagos y Ruta 33 - 2170 Casilda, Argentina Telfax: 0341-422050 E-mail: moyarزاب@fveter.unr.edu.ar

INTRODUCCION

Para el mejoramiento genético animal se tendió durante mucho tiempo a seleccionar animales para alto peso, alta tasa de crecimiento, alta producción de leche, etc. Esta selección direccional trajo como consecuencia el deterioro de otros caracteres, entre otros, problemas reproductivos y menor resistencia a enfermedades, obteniéndose como resultado una menor producción si se la evalúa a nivel poblacional (1, 2, 3, 4). Tal es así, que hoy ya no se desea un animal excesivamente grande y se duda que una vaca de muy alta producción de leche, al menos en condiciones de pastoreo, sea la más productiva por unidad de superficie (5).

La realización de experimentos que evalúen los efectos de la selección en animales de interés económico se hace difícil debido a la longitud de los intervalos generacionales, los tiempos y costos son elevados. Una alternativa es utilizar modelos experimentales en animales de laboratorio cuyos resultados, si bien no son totalmente extrapolables, conducen a incrementar el conocimiento sobre los mecanismos genéticos básicos involucrados y a la realización de planes de mejoramiento con mejor criterio.

Desde los experimentos realizados por Goodale en 1938 (6) que probaron la posibilidad de seleccionar por peso corporal en el ratón, son numerosos los trabajos publicados con respecto a límites de la selección, interacción genotipo-ambiente, efectos maternos, consecuencias de la selección, respuestas correlacionadas, etc. (7, 8, 9, 10, 11), cuyos resultados generalmente se han comprobado más tarde en animales de interés económico.

En la Facultad de Ciencias Veterinarias (U.N.R.), a partir de la generación 3 de una población de ratones CF1 (**t**), se fundaron dos líneas de selección divergente para peso corporal a los 49 días de edad (**s**: negativa; **s'**: positiva). Estas líneas difieren significativamente para el carácter seleccionado, siendo **s'** la más pesada, manteniéndose **s** más parecida a **t** (18). Estos genotipos diferentes permiten la realización de estudios genéticos relacionados con la respuesta a la selección artificial y sus consecuencias.

En ratones, la apertura del orificio vaginal es uno de los primeros síntomas de la llegada a la pubertad de las hembras. Puede ocurrir temprano, por ej., a los 24 días de edad en la cepa C57Bl/6J, y coincidir con el primer estro, u ocurrir unos días antes que éste (12). El momento en que se produce depende de factores ambientales, de la cepa, línea, etc. El ciclo estral se repite a intervalos regulares de 4 a 6 días (12, 13) a lo largo de la vida reproductiva, dividiéndose en proestro, estro, metaestro y diestro, aunque algunos autores llegan a dividirlo

hasta en 13 etapas. El estro postparto tiene lugar dentro de las 24 h posteriores al parto. La duración de la gestación oscila entre 19 y 21 días.

Existe variabilidad en los patrones mencionados. Al comparar cepas o practicar selección artificial, diversos autores (10, 14, 15, 16, 17) encontraron diferencias en distintos componentes de la fertilidad en ratones, por ej., edad media de la apertura vaginal, longitud del diestro, tamaño de camada, porcentaje de partos.

Con el objetivo de evaluar consecuencias de la selección practicada para peso corporal en las líneas mencionadas se evaluaron caracteres relacionados con fertilidad que no fueron seleccionados en **t**, **s** y **s'**: edad de la apertura vaginal y primer estro, duración del ciclo estral y seguimiento de la vida reproductiva durante 220 días a partir del primer estro. Estas variables se asociaron con peso corporal para el cual se practicó selección divergente.

MATERIALES Y METODOS

Animales experimentales:

Se utilizaron hembras CF1 pertenecientes a:

- una población testigo (**t**) sin selección, con $N_e \cong 40$
- un par de líneas de selección divergente para peso a los 49 días de edad, con $N_e < 8$, **s'**: positiva, **s**: negativa (18).

A los animales se les suministró *ad-libitum* agua y un alimento comercial para ratón con 25% de proteínas. El bioterio se mantiene a una temperatura ambiente media de 21 ± 2 °C, con luz natural. El macho permaneció con la hembra durante las sucesivas preñeces y lactancias en cajas individuales, a excepción de los casos en que especialmente se menciona. Los animales se destetaron y se identificaron (sistema australiano) a los 21 días de edad y luego se alojaron en grupos de 6 a 7 por caja con cama de viruta, separados por sexo.

Edad de apertura vaginal y primer estro

Con el objetivo de probar si existen diferencias entre las tres líneas para la edad de apertura vaginal se controló diariamente el estado de los labios vulvares desde el destete (21 días) hasta el día en que se observaron totalmente separados registrándose la edad en ese momento. Desde ese día se realizaron muestreos vaginales cada 24 horas hasta detectar el primer estro mediante citología vaginal exfoliativa (19, 20). Para probar si la apertura vaginal es un indicador de llegada a la pubertad se compararon la edad de apertura vaginal (EAV) y la edad al primer estro (EPE).

Ciclo estral

Mediante la técnica de citología exfoliativa se determinaron las fases del ciclo estral en hembras adultas, realizándose muestreos cada 12 horas durante el número de días necesario a fin de detectar al menos dos estros. Una vez fijadas, las preparaciones, se colorearon con hematoxilina de Harris y eosina para su observación al microscopio (19, 20).

Seguimiento de la vida reproductiva

Se eligieron 21 hembras (7 por cada una de las líneas) que tuvieran distintas edades de apertura vaginal (entre 24 y 35 días), se comprobó que estuvieran en estro y se les dio servicio con machos de la misma línea que se había probado eran fértiles. Los machos permanecieron con las hembras hasta detectar preñez por inspección ocular, momento en el cual se los retiró y se colocó en su lugar machos más jóvenes de la misma línea. A estas hembras se las siguió durante los 220 días posteriores al primer estro registrándose variables de fertilidad y de producción.

Variables estudiadas

- edad de apertura vaginal (EAV)
- edad al primer estro (EPE)
- peso en gramos a la apertura vaginal (P_{AV})
- peso en gramos a los 49 días de edad (P_{49})
- tamaño de camada al nacimiento (TC)
- tamaño de camada al destete (TCD)
- coeficiente de fertilidad de primera parición:
 $CF = (7 \times TC) / (D + 21)$, donde D es el número de días transcurridos desde el armado de la pareja hasta la parición
- peso de camada al destete en gramos (PCD)
- número de pariciones por hembra en 220 días (PAR)
- número de crías producidas por hembra en 220 días (C)
- coeficiente de supervivencia por línea en 220 días:
 $CS = \frac{\sum TCD \times 100}{\sum TC}$
 \sum indica la suma para todas las pariciones de todas las hembras de una línea
- gramos destetados por hembra en 220 días:
 $G = Z \text{ PCD}$
- intervalo parto-preñez medio por línea:
 $IPP = \frac{[220 \text{ días} - (\overline{\text{PAR}} \times 21)]}{\overline{\text{PAR}}}$
 donde 21 es la duración en días de la gestación y $\overline{\text{PAR}}$ es el promedio de pariciones por hembra por línea.

Para probar si existían diferencias en las distribuciones de la EAV de las 3 líneas se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las asociaciones estimadas son lineales. Las diferencias entre las medias de las variables de ferti-

dad y producción se probaron mediante contrastes lineales ortogonales: t vs. $(s + s')$, y, s vs. s' (21).

RESULTADOS

Apertura vaginal y primer estro

En el gráfico II se observan las distribuciones de frecuencias de la EAV para cada una de las tres líneas cuyos pesos medios por generación figuran en el gráfico I. La distribución de s' difiere significativamente de la de t ($p < 0,001$) y de la de s ($p < 0,05$). El rango de la EAV disminuyó en la línea seleccionada para alto peso con respecto a la testigo, corriéndose a la izquierda la distribución de la línea positiva comparada con la negativa.

De un total de 96 hembras pertenecientes a las tres líneas, al comparar la EAV y la EPE, en el 81% de ellas coincidieron ambas edades, en el resto la EPE fue superior a lo sumo en un día con respecto a la EAV.

Se estimaron los coeficientes de correlación entre EAV y peso que fue el carácter seleccionado, cuyos valores se muestran en la tabla 1. No se encontró asociación entre EAV y coeficiente de fertilidad de primera parición.

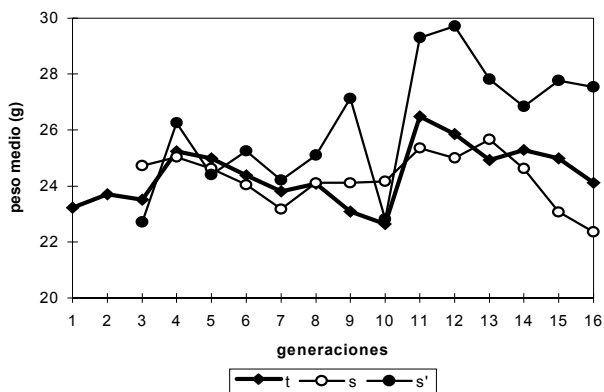


Gráfico I. Evolución del peso medio de hembras Graphics I. Evolution of the female mean weight

Ciclo estral

La duración del ciclo estral en t , s y s' fue de 3 a 4 días, debiéndose esta variación a diferencias en la fase diéstrica. La tipología celular observada y la duración de los distintos períodos del ciclo fueron las siguientes:

proestro: duración aproximada 12 horas; escasos elementos celulares, células superficiales acidófilas y basófilas nucleadas, algunas células intermedias: escaso mucus y leucocitos.

estro: duración aproximada 24 horas; abundantes células superficiales acidófilas nucleadas y anucleadas; no se encontraron otros elementos.

metaestro: duración aproximada 6 horas; predominio de mucus y leucocitos; abundancia de células intermedias, basales y parabasales.

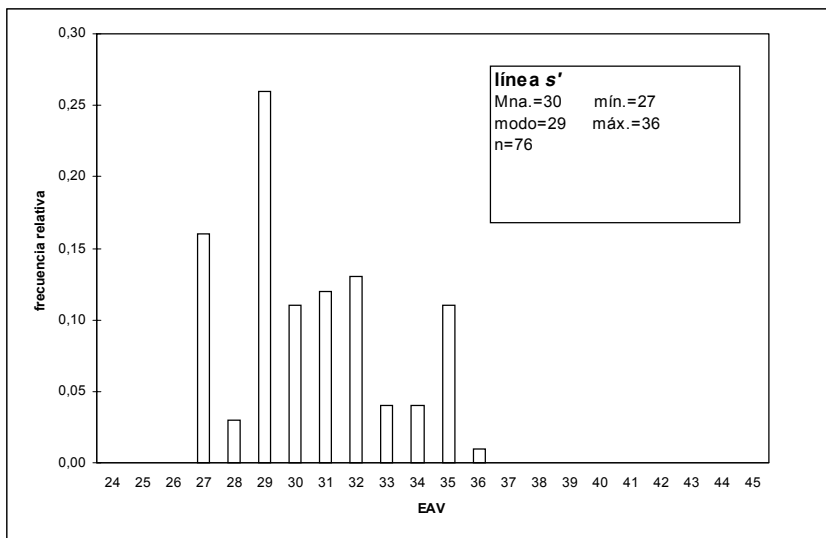
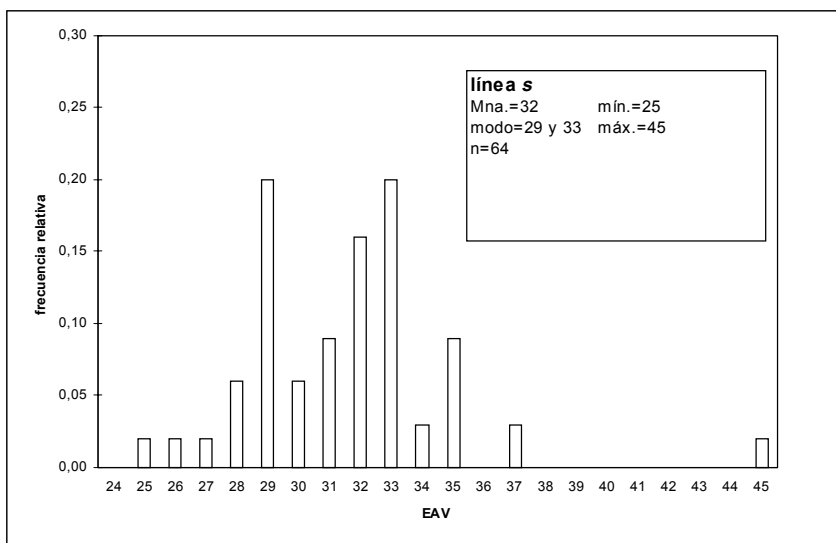
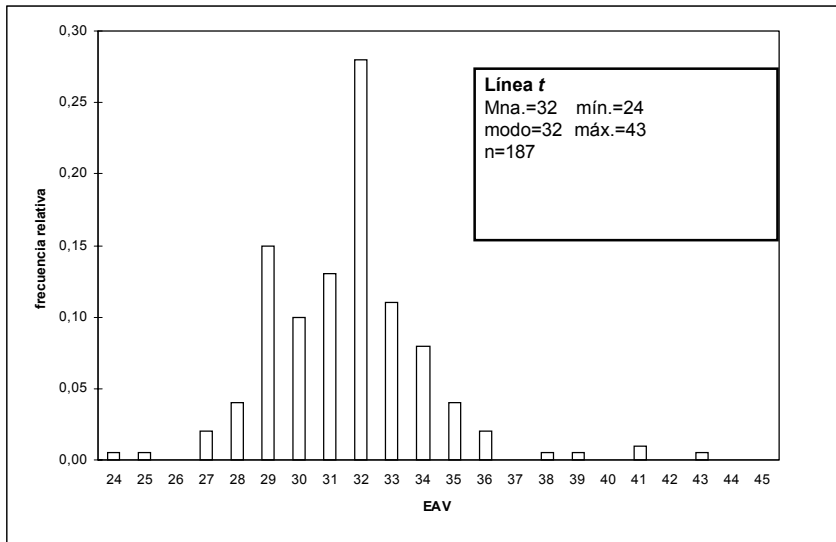


Gráfico II. Distribución de la edad de apertura vaginal por línea
Graphics II. Vaginal opening age distribution by line

Tabla 1. Asociación entre edad de apertura vaginal y peso

Table 1. Correlation coefficients between vaginal opening and body weight

Línea	r(EAV-P ₄₉)	r(EAV-P _{AV})
s	-0,31#	0,30ns.
s'	-0,31###	0,11ns.
t	-0,03ns.	0,51###

(# p<0,05; ## p<0,01)

diestro: duración aproximada 24 a 48 horas; células basales y parabasales, abundante cantidad de leucocitos y mucus.

Seguimiento de la vida reproductiva

En la tabla 2 figuran los promedios por línea para las variables de fertilidad y producción estudiadas, correspondientes al seguimiento de los 220 días posteriores al primer servicio.

Se observó que el tamaño de camada decae más rápidamente en las líneas seleccionadas que en la testigo en relación al número de parición. De las hembras estudiadas, sólo algunas pudieron seguirse hasta el final de su vida reproductiva, en estos casos el número máximo de pariciones observadas fue: **t**: 12, **s**: 8, **s'**: 9.

Si se considera la producción por hembra de la línea **t**, medida en \bar{G} , como 100%, cada hembra **s'** produce en 220 días el equivalente al 82% de una **t**, y cada hembra **s** el 43%. Esto significa que para alcanzar la misma producción que una hembra **t**, se necesitan 1,2 hembras **s'**, o 2,3 hembras **s**.

Los coeficientes de correlación de la EAV con las variables estudiadas figuran en la tabla 3.

DISCUSIÓN

La longitud del ciclo estral fue similar en las líneas estudiadas. No ocurrió lo mismo con la EAV, el número de crías, el intervalo interpartos y el número de pariciones que ponen en evidencia diferencias significativas de fertilidad en estas líneas donde no se seleccionaron los caracteres mencionados.

En las líneas seleccionadas se modificó la distribución de la EAV (Gráf. II), en la de alto peso disminuyó la edad más frecuente, y en la de bajo peso se evidenciaron dos grupos: uno de edad más temprana y otro de edad más tardía. Como en estas líneas la EAV es un indicador de llegada a la madurez, dado que las diferencias entre EAV y EPE en un bajo porcentaje de hembras, son a lo sumo de un día, se puede decir que en **s'** se produjo un adelantamiento de la madurez sexual, y que en **s** hay hembras precoces y otras de madurez tardía.

En **t**, de la cual derivan las líneas seleccionadas, no se encontró asociación entre EAV y el carácter seleccionado (P₄₉), y sí la hubo con P_{AV}, indicando que a mayor peso corporal a edad temprana, la precocidad es menor. En las líneas seleccionadas se alteran estas asociaciones, no la hay con P_{AV} y es negativa con P₄₉. Esta última, sin embargo, a pesar del significado estadístico, toma un valor relativamente bajo (Tabla 1).

Las correlaciones entre EAV y P_{AV}, y EAV y P₄₉ en **t** fueron similares a las encontradas por Eisen (22) en una población control: r(EAV-P₄₂) = -0,31 n.s.; r(EAV-P_{AV}) = 0,66 p<0,05, donde P₄₂ fue el carácter seleccionado.

Al comparar las líneas, **s** y **s'** difieren en los promedios por parición (TC, TCD y PCD), pero no se encontraron diferencias entre **t** y las líneas seleccionadas. En cambio, al compararlas a lo largo de los 220 días, **t** supera a ambas

Tabla 2. Estimaciones por línea de caracteres productivos y reproductivos

Table 2. Productive and reproductive characters estimations by line

línea	por parición			en 220 días				
	\bar{TC}	\bar{TCD}	\bar{PCD}	\bar{PAR}	\bar{C}	CS	\bar{G}	IPP
t	9,11	7,48	86,12	7,28	54,57	86,6	627,21	9,18
s	5,35	3,64	53,47	5,17	22,17	80,1	270,08	21,55
s'	8,60	7,56	112,13	4,86	37,14	95,2	514,86	24,27

(* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001)

Tabla 3. Asociación entre edad de apertura vaginal y caracteres productivos y reproductivos
 Table 3. Correlation coefficients between vaginal opening age and productive and reproductive characters

	<i>t</i>	<i>s'</i>	<i>s</i>
r(EAV-ΣTC)	-0,36 n.s.	0,77 #	0,96 ##
r(EAV-ΣTCD)	-0,16 n.s.	0,76 #	0,88 #
r(EAV-n° de pariciones)	-0,19 n.s.	0,68 n.s.	0,64 n.s.
r(EAV-ΣPCD)	-0,31 n.s.	0,82 #	0,89 #

(* p<0,05; ** p<0,01; n.s. no significativo)

en el número de pariciones, número de crías y tiene un menor IPP, todo esto hace que una hembra *t* produzca a lo largo de su vida productiva más gramos aún que *s'*, línea en la cual los individuos son más pesados.

La EAV está asociada positivamente con tamaño de camada, al nacimiento y al destete, y con el total de gramos destetados a lo largo de los 220 días en las líneas seleccionadas, lo que no fue así en *t*. Por lo tanto, la EAV podría ser también un indicador del tamaño de camada y de la producción total en *s* y *s'*, a mayor EAV, mayor TC, TCD y ΣPCD (Tabla 3).

Analizando los resultados de primera parición, en un trabajo anterior (18) demostraron que la población sin selección de peso producía más gramos por cada gramo mantenido en reproducción, atribuible a mayores coeficientes de fertilidad. Al estudiar el comportamiento de la vida reproductiva se demuestra que la población *t* es capaz de producir regularmente y en forma continuada: da un número de crías significativamente mayor, pare más veces con intervalos interpartos menores y el tamaño de camada no decae rápidamente si se la compara con las seleccionadas. Esta situación provoca una producción en gramos totales significativamente mayor (Tabla 2).

Luxford y col. (15) obtuvieron resultados similares, si bien seleccionaron para mayor tamaño de camada al nacimiento, observaron que las líneas seleccionadas produjeron significativamente menos camadas que la control, con un intervalo mayor entre primera y segunda parición. Además, el peso destetado total a lo largo de la vida de la hembra en la línea control fue mayor que en las seleccionadas.

Al seleccionar peso o fertilidad, se producen modificaciones en el carácter no seleccio-

nado, pero las asociaciones entre ambos no son siempre en el mismo sentido. Büniger y col. (23) seleccionaron para mayor peso corporal a los 42 días de edad en una población no endocriada de ratones y encontraron que el tamaño de camada se redujo. Lo atribuyen a una mayor presión de selección en contra de las camadas grandes cuyos individuos tienen pesos menores y por lo tanto no se seleccionarían. A partir de una población de ratones CF1 de cría libre, Gion y col. (24) fundaron líneas para evaluar distintos métodos de selección con el objetivo de aumentar el tamaño de camada. Encontraron respuesta a la selección y también aumento del peso después de 13 generaciones.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que la selección direccional por peso modificó caracteres reproductivos, y aún cuando se persigue el objetivo de aumentar los gramos producidos, se obtiene como respuesta una menor producción, evidenciándose la importancia de la fertilidad en producción animal. Además, pueden lograrse efectivamente animales con pesos mayores, pero si se analiza a nivel poblacional, un peso intermedio permite una mayor producción, y un costo menor de alimentación y de reposición, dado que se necesitará mantener un menor número de hembras. Estos resultados sugieren la importancia de realizar un seguimiento permanente de caracteres productivos y reproductivos en animales de interés económico cuando están sujetos a selección direccional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Méd. Vet. Fernando Vasquez la valiosa colaboración prestada en la determinación de las etapas del ciclo estral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonczek RR, Richardson DO, Moore ED, Miller RH, Owen JR, Dowlen HH, Bell BR. Correlated responses in reproduction accompanying selection for milk yield in Jerseys. *J Dairy Sci* 1992; 75: 1154-1160
2. Hageman WH, Shook GE, Tyler WJ. Reproductive performance in genetic lines selected for high or average milk yield. *J Dairy Sci* 1991; 74:4366-4376
3. Dunklee JS, Freeman AE, Kelley DH. Comparison of Holsteins selected for high and average milk production. 2 - Health and reproductive response to selection for milk. *J Dairy Sci* 1994; 77: 3683-3690
4. Molinuevo HA. Lo principal de la investigación en la genética zootécnica desarrollada en el INTA Balcarce. *Mendeliana* 1994; 11(1): 52-55
5. Molinuevo HA. Selección genética de bovinos para carne y lecheros en sistemas de pastoreo. *Actas del 22° Congreso Argentino de Producción Animal, Río Cuarto*. 1998.
6. Goodale HD. A study of the inheritance of body weight in the albino mouse by selection. *J Hered* 1938, 29: 101-112
7. Roberts RC. Some contributions of the laboratory mouse to animal breeding research. Part I. *Animal Breeding Abstracts* 1965 a; 33 (3): 339-353
8. Roberts RC. Some contributions of the laboratory mouse to animal breeding research. Part II. *Animal Breeding Abstracts* 1965 b; 33 (4): 515-525
9. Brien FD. A review of the genetic and physiological relationships between growth and reproduction in mammals. *Animal Breeding Abstracts* 1986; 54 (12): 975-997
10. Domenichini M, Picardi L, Rabasa SL. Depresión de la aptitud por selección en ratones con endocría. *Mendeliana* 1989; 9 (1): 57-66
11. McCarthy JC. The laboratory mouse as a model for animal breeding: A review of selection for increased body weight and litter size. 2nd. *World Congr Gen Appl Live Pro* 1982; 66-83
12. Whittingham DG, Wood MJ. The mouse in Biomed Research *Reproductive Physiology*, Academic Press Inc 1983; III (9): 138-158
13. Hafez ESE. *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Lea y Febiger. 1970
14. Picardi L, Font MT, Rabasa SL (con la colaboración de Inurrigarro MI). Efecto de la selección de peso y fertilidad femenina en una población endocriada de ratones. *Mendeliana* 1977; 2 (1): 47-55
15. Luxford BG, Buis RC, Beilharz RG. Lifetime reproductive performance of lines of mice after long term selection for first parity litter size at birth. *J Anim Breed Genet* 1990; 107:188-195
16. Falconer DS. Improvements of litter size in a strain of mice at a selection limit. *Genet. Res Camb* 1971; 17: 215-235
17. Yoon Chai H. Homeostasis associated with heterozygosity in the genetics of the time of vaginal opening in the house mouse. *Genetics* 1955; 40: 297-309
18. Oyarzabal MI, Rabasa SL. Selección divergente de peso en ratones con alta endocría seguida de 90 generaciones de cría libre. *Mendeliana* 1994; 10 (2): 119-132
19. Feldman EC, Nelson RW. *Endocrinología y reproducción canina y felina*. Intermédica. 1991
20. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los EEUU. *Métodos histológicos*. AFIP. 1995.
21. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometría*. H. Blume Ed., Madrid. 1979.
22. Eisen EJ. Single trait and antagonistic index selection for litter size and body weight in mice. *Genetics* 1978; 88: 781-811
23. Büniger L, Renne U, Dietl G. Selection for body weight at 42 days in laboratory mice with and without litter size standardization. Direct response and correlated effects on litter size. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 1992; 35 (3): 305-319
24. Gion JM, Clutter AC, Nielsen MK. Alternative methods of selection for litter size in mice: II. Response to thirteen generations of selection. *J Anim Sci* 1990; 68: 3543-3556

GLOMERULOPATÍAS INMUNOMEDIADAS DE PERROS Y GATOS: ACTUALIZACIÓN DE LAS DISTINTAS ALTERNATIVAS PARA SU TRATAMIENTO

M. E. Diessler¹; A. N. del Amo²

¹Anatomía y Fisiología Patológicas

²Clínica Médica y Quirúrgica de Pequeños Animales

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

Resumen: *En el presente artículo se describen la patogenia de la glomerulopatía y el desarrollo del daño renal a partir del depósito de inmunocomplejos en perros y gatos. Se relata brevemente la presentación clínica, puntualizándose los procedimientos diagnósticos y el pronóstico de la enfermedad. Se lleva a cabo una descripción pormenorizada de las modalidades terapéuticas tendientes a corregir las alteraciones reconocidas en esta afección tales como: la hiperreactividad inmune, la hipercoagulabilidad, los edemas, la hipertensión y el manejo nutricional. Se realiza una actualización sobre nuevos tratamientos implementados a nivel experimental y otros utilizados en medicina humana, que aún no han sido probados en animales de compañía.*

Palabras Clave: Glomerulopatía, Inmunocomplejos, Perros, Gatos

IMMUNE-MEDIATED GLOMERULOPATHY IN DOGS AND CATS: ACTUALIZATION OF THE DIFFERENT TREATMENT ALTERNATIVES

Abstract: *In the present article are described the pathogenesis of the dogs and cat glomerulopathy and the renal damage development caused by the immune complex deposit. The clinical presentation, the diagnostic procedures and the evolution of the illness are also remarked. It is carried out an itemized description of the therapeutic modalities which corrects the following alterations: hyperreactivity of the immune system, hypercoagulability, edemas, hypertension and the nutritional support. An actualization of the new experimental and human treatments was done. None of them have still been proven in company animals.*

Key Words: Glomerulopathy, Immune complex, Dog, Cat

Fecha de recepción: 17/09/98

Fecha de aceptación: 02/09/99

Dirección para correspondencia:

Diessler, M. E Facultad de Ciencias Veterinarias. CC 296 La Plata (B1900AVW), Buenos Aires. Argentina
Tel/Fax: +54-221-4257980 E-mail: diessler@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La glomerulopatía por inmunocomplejos es la afección glomerular más frecuente en los pequeños animales. La misma se desarrolla como consecuencia de la respuesta inflamatoria generada por los inmunocomplejos depositados en el glomérulo renal (7, 10, 12, 15, 16, 26, 27, 34).

En los últimos años se ha revalorizado la importancia de esta entidad como causa de falla renal crónica (FRC) de los caninos y los felinos, muy frecuente en estos animales, que provoca elevadas tasas de mortalidad y altos costos de tratamiento (6).

El objetivo de este trabajo es la descripción de modalidades de tratamiento con fundamentos sólidos, mediante las cuales puedan lograrse respuestas más favorables y evitar efectos medicamentosos nocivos. Se describen las pautas terapéuticas generales aplicables al manejo de esta enfermedad y los resultados obtenidos por los autores consultados o sus fuentes. El énfasis está puesto en las maniobras tendientes a controlar el desarrollo de la falla renal y mejorar así la calidad de vida de los animales afectados.

ETIOPATOGENIA

Se han reconocido dos tipos de mecanismos patológicos: 1) el depósito de complejos inmunes formados en el torrente sanguíneo compuestos de un antígeno (Ag) soluble circulante y su anticuerpo (Ac) específico, lo que constituye un fenómeno de hipersensibilidad de tipo III (1, 10, 12, 16, 18, 26), y 2) la formación de inmunocomplejos *in situ* generados ya sea por autoanticuerpos que reaccionan contra antígenos intrínsecos de la membrana basal glomerular (MBG), como por anticuerpos contra antígenos extraglomerulares fijados a la pared capilar glomerular (10, 12, 16, 26). La generación de autoanticuerpos resultaría de la "pérdida de tolerancia" para un antígeno nativo o de la reacción frente a un antígeno propio normalmente oculto (19); la glomerulonefritis anti-MBG no ha sido demostrada en pequeños animales (18).

Los factores que influyen en el depósito de complejos inmunes son: a) la proporción Ag/Ac, que determina el tamaño y la solubilidad del complejo: aquellos con exceso de Ag, pequeños, tienen mayor posibilidad de quedar atrapados en el riñón (10, 16, 18, 26), b) la capacidad del huésped de eliminar los complejos, c) las propiedades físico-químicas de Ag. y Ac., d) los factores anatómicos y hemodinámicos, ya que la alta proporción del gasto cardíaco que recibe el riñón y la producción de un ultrafil-

trado de plasma con presión hidrostática elevada lo convierten en un órgano muy susceptible al depósito de inmunocomplejos y e) el espesor de la MBG, que favorece adicionalmente la captación de complejos (1, 10, 16, 26).

Uno de los mayores problemas sin resolver es la identificación de la naturaleza y de la fuente de los antígenos que inducen la respuesta inmune. Se ha señalado frecuentemente como factor etiológico para esta entidad a todo proceso capaz de generar estimulación antigénica sostenida como las infecciones de baja patogenicidad, durante el curso de la cual los microorganismos o sus antígenos permanecen circulando por períodos relativamente largos (26).

Las causas que han sido postuladas como generadoras de glomerulonefritis tienen bases diversas a pesar de producir manifestaciones clínicas similares (10). Las mismas se hallan enumeradas en la tabla 1.

ORIGEN DEL DAÑO TISULAR

A partir del acúmulo de inmunocomplejos en la pared capilar glomerular (y con el objetivo de eliminarlos) se activan diversos sistemas compuestos por mediadores bioactivos (eicosanoides, citocinas, factores de crecimiento, etc.) producidos por células glomerulares o sanguíneas (7, 10, 12).

El complemento se activa por las vías clásica o alternativa y sus efectos biológicos son directamente responsables por el daño tisular (7, 10, 12, 15, 26, 27, 34).

Los leucotrienos (LT), la interleuquina 1 (IL-1), diversos factores de crecimiento y el factor de necrosis tumoral (FNT) favorecen la adherencia inmune. Estas sustancias estimulan a las células endoteliales capilares a expresar moléculas de adhesión (selectinas) y permitir la migración leucocitaria a los tejidos (27).

Algunas de las fracciones generadas, como C3a, C5a, C567, producen incremento de la permeabilidad capilar, circunstancia que aumenta el depósito de más inmunocomplejos y la migración de las células inflamatorias. La quimiotaxis ejercida por las fracciones anteriormente citadas, más la acción de otras sustancias como el tromboxano (TX), las IL, el factor de agregación plaquetaria (FAP), los LT, producen infiltrado de leucocitos. Estas células inducen alteraciones tisulares, como por ejemplo destrucción de las sialoproteínas de membrana de los podocitos, mediante la acción de sus enzimas lisosomales oxidativas y proteolíticas. El principal agente oxidante es el peróxido de hidrógeno que forma radicales tóxicos y también activa a las proteinasas (5, 7, 10, 12, 15, 16, 26, 27, 34, 35).

Tabla 1. Agentes etiológicos de la GNP por inmunocomplejos (adaptada de Grauer y Di Bartola, 1997).

Table 1: Etiological agents of the glomerulonephritis (adapted from Grauer and Di Bartola, 1997).

ENFERMEDADES	ESPECIE	
	CANINOS	FELINOS
INFECCIOSAS	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatitis Infecciosa Canina. • Endocarditis Bacteriana. • Piómetra. • Dirofilariasis. • Brucelosis. • Bacteriosis crónicas. • Septicemia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Virus de Leucemia Felina. • Peritonitis Infecciosa Felina. • Poliartritis micoplásmica. • Bacteriosis crónicas.
INFLAMATORIAS	<ul style="list-style-type: none"> • Pancreatitis. • Lupus Eritematoso Sistémico. • Poliartritis. • Prostatitis. • Dermatitis crónicas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pancreatitis. • Lupus Eritematoso Sistémico. • Dermatitis crónicas. • Colangiohepatitis.
NEOPLÁSICAS	<ul style="list-style-type: none"> • Linfoma. • Leucemia. • Mastocitosis. • Eritrocitosis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Linfoma. • Mastocitosis.
HEREDOFAMILIARES	<ul style="list-style-type: none"> • GN del Bull Terrier. • GN del Dobermann Pinscher. 	
INDUCIDAS POR DROGAS	<ul style="list-style-type: none"> • Trimetoprima. • Glucocorticoides. • Hidralazina. • Terapia con C. Parvum. • ¿Captopril ? • ¿Aspirina ? 	
MISCELÁNEAS	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperadrenocorticismo. • Diabetes Mellitus. • Idiopática. 	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetes Mellitus. • Idiopática.

La citotoxicidad del óxido nítrico, producido por los neutrófilos, se basa en su capacidad de evitar la replicación del ADN. La relación causal de estas células con el daño glomerular se utiliza como criterio para clasificar a las glomerulonefritis en “injurias dependientes de neutrófilos” o “injurias independientes de neutrófilos”; esta clasificación tiene importancia en la elección de la modalidad terapéutica a implementar (16, 26).

Los leucocitos producen el desplazamiento del endotelio respecto de la MBG, la necrosis tisular, la digestión de la MBG (por acción de elastasas y catepsinas) y la adherencia y agregación plaquetarias que obstruyen el lumen capilar (10, 12).

La respuesta del mesangio a la injuria consiste en proliferación celular, cambio del fenotipo de dichas células y proliferación de la matriz (19, 24). Esta respuesta está mediada por TX, LT, FNT, IL-1, y endotelina-1, entre otros (19).

La agregación plaquetaria es secundaria al daño endotelial y a la interacción Ag/Ac. La misma exacerba el daño mediante liberación de

tromboxanos y la activación de la cascada de coagulación; otra consecuencia es la liberación de factores estimulantes del crecimiento que promueven la proliferación de las células endoteliales vasculares (12, 15, 26, 27).

La destrucción de las sialoproteínas aniónicas de los podocitos y la digestión de la MBG comprometen la permeabilidad selectiva por carga eléctrica y por tamaño molecular respectivamente. Estos cambios redundan en hiperpermeabilidad glomerular con la consecuente proteinuria, constituida principalmente por: albúmina, transferrina, inmunoglobulinas y antitrombina III. La gravedad de la proteinuria es proporcional al volumen de filtrado glomerular (VFG) y a la proteinemia. Si la pérdida urinaria de albúmina excede tanto a la capacidad de reabsorción tubular renal, como a la capacidad del hígado para restituir la concentración fisiológica, la hipoalbuminemia resultante desencadenará una serie de cambios que en la práctica clínica se denomina “síndrome nefrótico”. El mismo describe un complejo de signos clínicos y alteraciones de laboratorio que incluyen: proteinuria masiva (“proteinuria nefrótica”) e hipoal-

buminemia, acompañados por diversos edemas de grado variable, hiperlipemia (hipercolesterolemia) y lipiduria (2,7,10,12,26).

La disminución de la concentración plasmática de otras proteínas también causa graves desórdenes. La antitrombina III, por ejemplo, actúa como cofactor de la heparina en la inactivación de los factores de coagulación II, IX, X, XII (1), razón por la cual su pérdida urinaria juega un rol importante en el establecimiento del estado de hipercoagulabilidad (12, 34).

La hiperfibrinogenemia (que guarda correlación negativa con la albuminemia), el aumento de secreción de prostaglandinas y endoperóxidos, potenciadores de la adhesión plaquetaria, y la trombocitosis contribuyen a generar un grave estado de hipercoagulabilidad (12, 34). La hipersensibilidad plaquetaria característica de la glomerulopatía se atribuye a la hipoalbuminemia (34).

La fibrinólisis estaría alterada básicamente por las endotoxinas bacterianas y la hiperlipidemia; conforme progresa el daño tisular, también por las lesiones urémicas vasculares, la deshidratación y el shock (12, 34).

Se sugiere que podría existir alteración de la fibrinólisis inducida por el tratamiento prolongado con glucocorticoides. La tromboembolia es una consecuencia habitual del estado de hipercoagulabilidad; si bien la localización más frecuente de los trombos es la vasculatura pulmonar, éstos también pueden localizarse en otros vasos tales como las arterias femorales (7, 12).

PROGRESIÓN DEL DAÑO

Los fenómenos de proliferación celular, contracción de las células mesangiales, tumefacción endotelial y obliteración del glomérulo reducen la superficie disponible para el filtrado plasmático. Por consiguiente el VFG se halla reducido y el flujo sanguíneo insuficiente en los capilares peritubulares post-glomerulares precipita la atrofia y la fibrosis tubulares (34).

La hiperfiltración en los glomérulos remanentes induce su hipertensión, degeneración fibrinoide del glomérulo y esclerosis. El hallazgo regular de tales alteraciones lleva a los investigadores a proponer la inexorable naturaleza progresiva de este desorden si un número crítico de nefrones ha sido destruido (12).

Brown plantea que este modelo de auto-perpetuación de la enfermedad renal es aplicable en ratas pero no puede ser extrapolado a todos los mamíferos. A este respecto postula que el curso de la enfermedad sigue un modelo de fuerzas opuestas: unas que tienden al desarro-

llo de la falla renal y otras que se consideran respuestas compensatorias favorables por lo que las medidas terapéuticas deberán detener las primeras y alentar las últimas (6).

DIAGNÓSTICO

La glomerulonefritis puede presentar distintos cuadros clínicos, tales como: proteinuria asintomática, síndrome nefrótico o glomerulonefritis rápidamente progresiva (7, 12).

Los pacientes pueden exhibir sólo algunas de las anormalidades de laboratorio o signos clínicos característicos del síndrome nefrótico al momento de la presentación (7); este síndrome se presenta tanto en pacientes azotémicos como no azotémicos, acompañado por valores de creatinemia aumentados o normales. Los signos clínicos más comunes son: ascitis, edema periférico, ventral o facial, letargia, disnea, consunción muscular e hidrotórax. Si se desarrolla tromboembolismo se observan distintos grados de paresia (por obliteración de las arterias femorales) y ceguera (por el desprendimiento retiniano) además de disnea. En caso de existir insuficiencia renal se agregan: poliuria, nicturia, polidipsia, vómitos, diarrea, halitosis, helcosis, decaimiento, anorexia, debilidad y pelo hirsuto (7, 10, 12, 16, 26, 35).

Si del examen clínico surge la sospecha de enfermedad glomerular es necesario realizar exhaustivos análisis de laboratorio, que incluyan hemograma, perfil bioquímico del plasma, análisis físico, químico y del sedimento urinario, titulación de anticuerpos generados por agentes infecciosos, y los métodos de diagnóstico que se crean convenientes para confirmar la sospecha de una neoplasia o piómetra (7, 10, 12, 35).

Los hallazgos que más frecuentemente surgen del análisis completo de la orina son: proteinuria persistente no asociada a piuria o hematuria significativas, isostenuria, cilindros hialinos y cilindros granulosos (2, 5, 7, 10, 12, 26, 35). Con menor frecuencia se describe la aparición de cilindros grasos (2, 7), hematuria y cilindros hemáticos (10, 12).

Mediante la cuantificación de la excreción proteica diaria se puede obtener una determinación más precisa de la magnitud de la proteinuria. Cantidades mayores de 450 mg de proteína/ 24 horas se consideran patológicas. La excreción mayor a 1,5 g de proteína/día es altamente sugestiva de proteinuria de origen renal (10).

El análisis de sangre revela: hipoalbuminemia, hipercolesterolemia y, si coexiste la falla renal: azotemia, anemia no regenerativa, hiperosfatemia y acidosis (5, 7, 10, 12, 26, 35). La

hiperfibrinogenemia es un hallazgo frecuente (2, 7, 35).

La hiperlipoproteinemia es un componente bien reconocido del síndrome nefrótico en los animales y podría ser capaz de acelerar el daño glomerular por mecanismos en los que intervendrían diversos lípidos proinflamatorios y profibrogénicos (2, 10).

El grado de hiperlipoproteinemia es directamente proporcional a la hipoalbuminemia (2, 7, 10, 12).

Se presume que la acumulación anormal de colesterol sería el resultado de la reducción de la presión oncótica plasmática que, por mecanismos transcripcionales, generaría el aumento en la síntesis hepática de esta sustancia. La reducción en el catabolismo periférico de triglicéridos estaría generada por la pérdida urinaria de algún factor protector (2, 7, 16).

Existen dos teorías que intentan explicar la patogénesis del edema (2, 16, 26): la tradicional o "Teoría clásica", que atribuye a mecanismos hormonales la responsabilidad en la retención salina y los edemas, y la alternativa, que explica la trasudación de fluidos en base a

mecanismos de retención salina intrarenales (resistencia relativa a la acción del péptido natriurético atrial) y se ha denominado "Teoría de la expansión del volumen". Esta última se fundamentaría en las siguientes razones: 1) no hay correlación clara entre el grado de hipoalbuminemia y la aparición de los edemas, 2) en la mayoría de los pacientes no se ha demostrado hipovolemia, 3) la retención de sodio y agua preceden a la hipoalbuminemia, cesando antes que ésta se haya corregido, 4) la concentración de aldosterona con frecuencia es normal o baja, 5) el tratamiento con inhibidores de la ECA generalmente no ha disminuido la retención de sodio (Gráfico I).

La biopsia renal es el único método para el establecimiento del diagnóstico definitivo y la clasificación morfológica de la enfermedad (37). Se han desarrollado dos técnicas de obtención de la muestra: 1) biopsia mediante aguja tipo Tru-Cut, Bart automática o Silvermann modificada por Franklin en forma transcutánea a ciegas o bajo control ecográfico, y 2) biopsia quirúrgica incisional del parénquima (37). Las muestras obtenidas se someten a las tinciones

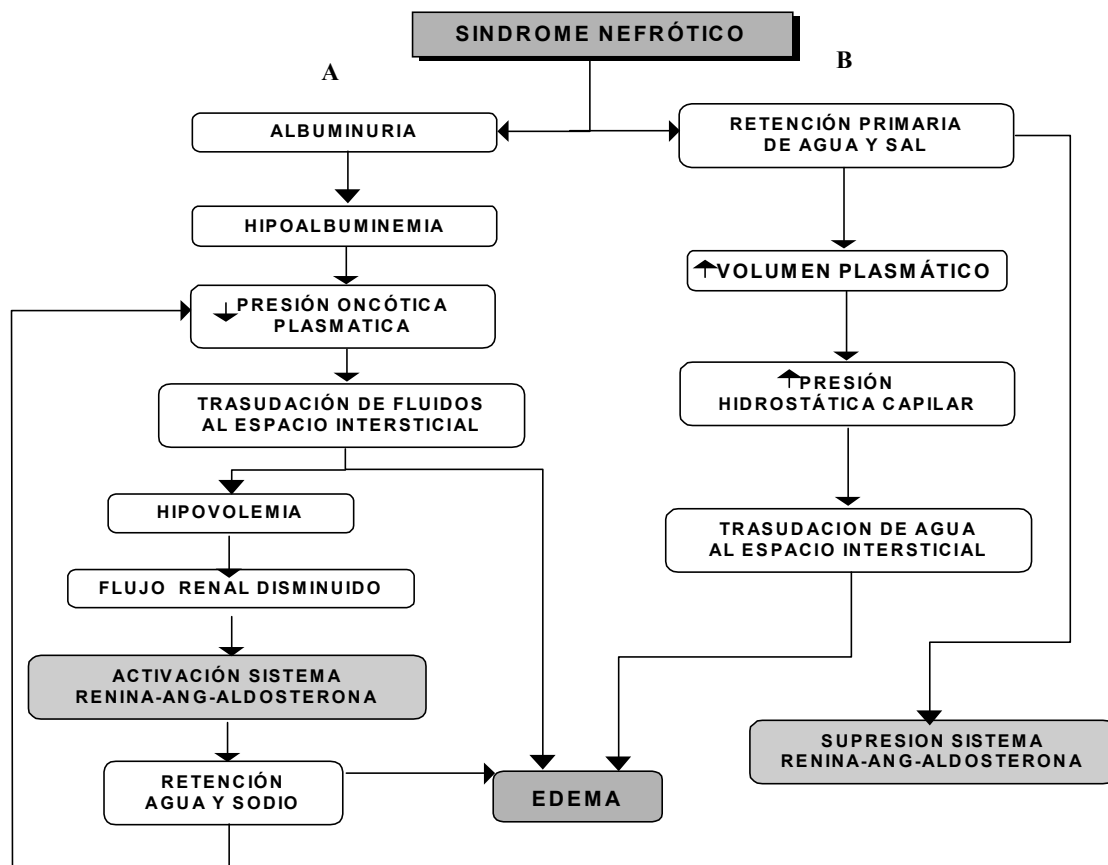


Gráfico I. Patogénesis de la formación de los edemas (adaptado de Alcázar y Ejido, 1997). A) Teoría clásica B) Teoría de la expansión del volumen.

Gráfico I. Pathogenesis of the edema (adapted from Alcazar and Ejido, 1997). A) Classic Theory B) Theory of the volumen expansion.

de rutina, a la tinción de Rojo Congo para descartar la amiloidosis y a inmunofluorescencia. Cuando se trata del depósito de inmunocomplejos circulantes, o exógenos fijos en los capilares glomerulares, el patrón de distribución de la fluorescencia es granuloso, discontinuo y generalmente se trata de depósitos mesangiales o subendoteliales. En cambio, si los anticuerpos son autólogos la fluorescencia será lineal, continua y difusa a lo largo de la MBG (7, 9, 10, 12, 16, 20, 37).

El reconocimiento del tipo de lesión glomerular es importante para establecer el pronóstico y en algunos casos el tratamiento. La clasificación veterinaria se basa en gran medida en muestras obtenidas de necropsia y evaluadas generalmente mediante microscopía óptica (7, 10).

Las glomerulopatías que se reconocen en los perros y en los gatos son las siguientes:

*Membranosa : se observa engrosamiento de la MBG y aumento de la matriz extracelular. Es la única forma histopatológica reconocida en los gatos y está asociada frecuentemente a infecciones virales (7, 9, 10, 12, 20, 34, 35, 37).

*Proliferativa : caracterizada por la proliferación de células glomerulares, debido a la alteración en la expresión de los genes reguladores de mitosis y apoptosis, e infiltración leucocitaria (7, 9, 10, 12, 13, 20, 24, 27, 34, 37).

*Membrano-proliferativa : es la más frecuente en caninos y constituye una combinación de las dos anteriores (7, 9, 10, 12, 20).

*Glomerulopatía de cambios mínimos : caracterizada por leve aumento de la celularidad y abundante proteinuria (7, 13, 37).

*Glomerulonefritis focal embólica (20).

*Glomeruloesclerosis (7, 10, 12, 20, 34).

*Misceláneas (7).

Pronóstico

El pronóstico de la enfermedad es variable. Los factores más importantes que influyen sobre él son: la intensidad de la disfunción al momento de la presentación (expresada como magnitud de la proteinuria y valor de la creatinina sérica), el tipo histológico, el grado de hipertensión sistémica, y la respuesta a la glucocorticoide terapia (3, 12, 16, 26).

Tratamiento de las glomerulonefropatías por inmunocomplejos

La identificación temprana de la enfermedad y del tipo de lesión histológica es fundamental para implementar la modalidad terapéutica correcta (6, 7). Los principios generales que se aplican al tratamiento tienen como objetivo

preservar la función renal y detener (o controlar) los procesos responsables por la progresión del daño. Las principales medidas terapéuticas son las siguientes: 1) identificar y corregir las enfermedades subyacentes, 2) modificar la función inmune, 3) controlar la hipercoagulabilidad, 4) brindar atención de sostén relativa a los edemas y a la hipertensión y 5) establecer pautas dietéticas adecuadas (2, 5, 6, 7, 10, 12, 16, 19, 26, 34).

1) *Identificar* la enfermedad de base es esencial para poder instituir el tratamiento etiológico; sin embargo, la eliminación de la fuente antigénica no siempre puede lograrse, como por ejemplo en la nefritis por Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Leucemia Felina u otras neoplasias. Cuando la causa primaria puede ser erradicada (piómetra, dirofilariasis, endocarditis, algunas neoplasias), luego de realizar el tratamiento médico o quirúrgico la inflamación glomerular activa resuelve y se detiene la progresión de la injuria (10, 12, 16, 26, 34). En algunas ocasiones estas medidas pueden no ser suficientes y se hacen necesarias otras modalidades terapéuticas (26, 34).

2) El tratamiento *inmunosupresor* consiste en la administración de glucocorticoides solos o en combinación con drogas citotóxicas o con la ciclosporina (5, 7, 12, 16, 26). Estos fármacos se administran con el objetivo de suprimir la respuesta inmune mediante mecanismos de acción diferentes. Los glucocorticoides (GCTC) bloquean la liberación de la IL-1 e inhiben la acción citotóxica de los LT efectores mediada por FNT e interferón, además de controlar la inflamación y modificar la actividad del complemento. La ciclosporina exhibe capacidad selectiva para inhibir la síntesis de interleuquinas 2 y 6 por parte del LT colaborador. La ciclofosfamida y la azatioprina, como así también los GCTC, bloquean la diferenciación y la proliferación de las poblaciones de LT efectores y de linfocitos B que sintetizan anticuerpos (16, 17, 26, 34).

El tratamiento utilizado en los perros consiste en administrar prednisona (Deltisona B®), en mañanas alternadas durante ocho semanas. Si se comprueba que existe remisión esta dosis debe reducirse durante ocho semanas; en cambio si no se lograra el descenso de la proteinuria y la elevación de las proteínas plasmáticas totales esperadas, se disminuye progresivamente la dosis hasta discontinuar el tratamiento en las cuatro semanas siguientes (10, 16, 26).

Los pacientes que no responden a la glucocorticoideoterapia pueden presentar una evolución más favorable si se adicionan agentes citotóxicos, como la ciclofosfamida

(Cicloblastina®), el clorambucilo (Leukerán®), la azatioprina (Imurán®) u otros agentes inmunosupresores como la ciclosporina (Sandimmun neoral®) (5, 7, 12, 16, 26).

Si bien la ciclosporina es de utilidad en medicina humana para reducir la dosis de GCTC en glomerulonefropatías que responden a esteroides (25), los pacientes veterinarios no habrían respondido favorablemente a este compuesto. Por otra parte, el efecto antiproteinúrico de la ciclosporina no se debería solamente a su acción inmunosupresora sino además a una notable y nociva reducción en la tasa de filtración glomerular (16, 17, 34).

La glomerulonefritis (GN) de cambios mínimos desarrolla muy buena respuesta a la administración de GCTC (10, 12, 34).

La nefropatía membranosa, en cambio, tiene pobre respuesta a los GCTC; por otra parte la combinación de estos últimos con azatioprina o ciclofosfamida no ofrece beneficios adicionales. El comportamiento biológico de esta GN es variable: en tanto generalmente sigue una progresión insidiosa e irreversible, en otros casos se ha demostrado su remisión espontánea (10, 16, 26). La remisión estaría explicada por un mecanismo de angiogénesis "de novo" mediada por distintos factores de crecimiento. La expansión de la matriz mesangial se resolvería por liberación de metaloproteinasas extracelulares (19).

Las GN proliferativa y membrano proliferativa son progresivas y raramente desarrollan remisión espontánea. El tratamiento inmunosupresor no ha brindado resultados concluyentes (10, 12, 16, 26).

La GN del LES ha respondido favorablemente a la administración de GCTC solos o combinados con ciclofosfamida (12, 16). Los inmunosupresores no están indicados para la glomeruloesclerosis (10).

El uso de inmunosupresores en los caninos ha dado resultados inciertos y se desconoce si sus beneficios, a veces transitorios, exceden los perjuicios que pueden ocasionar (5, 12, 16, 26, 34). La prednisolona se relaciona con el aumento de la permeabilidad glomerular para las proteínas y el enlentecimiento en la remoción de complejos desde el glomérulo (7, 16, 34).

En la mayoría de los gatos con glomerulonefritis el tratamiento con GCTC da buenos resultados (12, 34).

Es necesario monitorear rigurosamente diversos parámetros para identificar precozmente los posibles efectos colaterales generados por la medicación inmunosupresora; los GCTC producirían elevación de la uremia por efectos catabólicos (16, 26, 34). El tratamiento con la ciclofosfamida puede causar cistitis hemorrágica estéril, especialmente en pacientes con acceso

restringido al agua de bebida o al sitio habitual de micción. Es importante la evaluación periódica del hemograma y del recuento plaquetario en los individuos que reciben citotóxicos (17).

La *inmunoestimulación* sería una alternativa terapéutica que posibilitaría el aumento en la formación de anticuerpos para potenciar la eliminación antigénica. Algunos autores consideran que no hay suficientes fundamentos que confirmen la existencia de hiperreactividad inmune en los pacientes con glomerulonefritis y postulan que algunos pacientes estarían inmunosuprimidos y requerirían de esta alternativa terapéutica. El levamisol (Meglum®) sería de utilidad en estos casos (19, 26, 34).

3) Las medidas que se imparten para el control de la *hipercoagulabilidad* tienen como propósito minimizar la coagulación y el depósito de fibrina intraglomerulares, procesos que contribuyen al desarrollo de la glomeruloesclerosis (26). La indicación para implementar la terapia anticoagulante de rutina en los gatos es incierta porque el tromboembolismo es raro en esta especie (16). Se sugiere que aquellos animales que presenten una importante reducción en sus valores de antitrombina III plasmática, iguales o menores al 70 % del valor normal, o de la fibrinogenemia superiores a 300 mg/dl debieran recibir tratamiento anticoagulante preventivo (5, 7, 12, 16, 34).

Se utilizan drogas anticoagulantes como la warfarina o la heparina con la finalidad de evitar la progresión de la lesión renal, y drogas antiagregantes, como la aspirina, la indometacina y el dipiridamol, que además tienen efecto antiproteinúrico (7, 10, 12, 16, 34).

El uso de la aspirina en dosis bajas inhibiría selectivamente la ciclo-oxigenasa plaquetaria sin impedir la síntesis de prostaciclina, un eicosanoide que contribuye a mantener el VFG normal por su efecto vasodilatador de la arteriola aferente. Su utilización se ha generalizado ya que no requiere vigilancia intensiva, si bien la creatinina plasmática y el NUS deben valorarse periódicamente (5, 16, 34).

La heparina sería poco efectiva en pacientes con niveles subnormales de antitrombina III, ya que requiere de este compuesto como cofactor (12, 16, 34).

Se describe el alto nivel de efectividad de la warfarina; sin embargo, su margen de seguridad es muy estrecho y requiere de monitorización rigurosa difícil de implementar en pacientes ambulatorios. Si el tiempo de protrombina es 50% mayor que el normal se interpreta que la dosis utilizada ha sido la correcta (16, 34).

Los inhibidores de la enzima tromboxano sintetasa, como el 1-benzilimidazol o el CGS 12970 (16, 22, 31, 34), los antagonistas del re-

ceptor de tromboxano (16, 32, 34) y los antagonistas del factor de agregación plaquetaria pueden ser una alternativa eficaz como protectores renales y antiproteínúricos, sin los efectos colaterales nocivos de la aspirina. Estos compuestos aún no se encuentran disponibles comercialmente (33, 34).

4) Para el tratamiento de los edemas las siguientes medidas terapéuticas deben ser implementadas en forma secuencial:

*Corregir la hipoalbuminemia mediante dietas hiperproteicas (7, 10) (ver "Consideraciones dietéticas").

*Restringir el sodio dietético (7, 10, 12, 16): la dosis diaria máxima recomendada es de 40 mg/kg (7), que equivale a una dieta con 0,1 % a 0,3 % de sodio en el extracto seco del alimento (12, 16) o de hasta 0,4% (7). La restricción debe ser gradual porque los pacientes con enfermedad renal no pueden regular rápidamente la excreción renal de solutos (12).

*Inducir natriuresis: el diurético de elección es la furosemida (Lasix®) (7,10,12,16,26). La hipocaliemia es una complicación potencial del tratamiento crónico con furosemida (7,10); sin embargo, este desequilibrio no se ha presentado en medicina veterinaria (10). Otros diuréticos que se prescriben, con resultados variables, son las tiazidas (Moducrem®) (7), el ácido etacrínico y la espironolactona (Aldactone®) (26). El tratamiento con diuréticos y la restricción salina dietética simultáneos pueden comprometer el volumen vascular normal y empeorar la azoemia, por consiguiente la hidratación debe ser evaluada periódicamente (7, 10, 16, 26).

*La remoción de los líquidos pleural o ascítico mediante toracocentesis o paracentesis será necesaria si provocan disnea. El drenaje de estos líquidos debe ser parcial para evitar remover gran cantidad de proteínas, agravar la hipoalbuminemia y, en consecuencia, la ascitis (16, 26).

*Con el objeto de restaurar el balance de albúmina se realizan transfusiones plasmáticas con resultados transitorios (16).

Aproximadamente el 80% de los perros con glomerulopatías es hipertenso (10, 12, 34). La falta de métodos exactos y accesibles para la medición de la presión es una de las razones por las que se minimiza la importancia de esta alteración (12). La medición por técnicas de ultrasonido Doppler parece ser la más conveniente. Los valores normales promedio son: 148 mm Hg para la presión sistólica y 87 mm Hg para la presión diastólica, medidos por punción directa en la arteria femoral (12).

La hipertensión se corrige en algunos pacientes solamente mediante restricción gradual de sodio (10,12,16) y en otros mediante la adición de diuréticos (10,12,16,34). Si estos tra-

tamientos no corrigen el problema entonces se administran vasodilatadores como beta-bloqueantes (16,19), inhibidores de la enzima convertasa de angiotensina (inhibidores de la ECA) o bloqueantes de los canales de calcio (2,5,6,7,16,34).

Se ha intentado reducir la presión sistémica empleando β-bloqueantes (10) sin ningún cambio favorable en la presión capilar glomerular (34).

Los agentes antihipertensivos de elección son los inhibidores de la ECA (2, 5, 6, 7, 16, 34). Si bien Zoja postula que los efectos protectores de estos fármacos se deben solamente a la inhibición de la angiotensina II (36), otros autores sostienen que los inhibidores de la ECA podrían reducir la proteinuria (7, 8, 14, 16, 23, 28, 29) y prevenir la glomeruloesclerosis a través de otros efectos distintos de la reducción de la presión (7, 14, 16, 23, 29, 30). Entre ellos el mecanismo más importante sería el incremento en la selectividad de la barrera glomerular (7, 16) ya que se le ha atribuido a la angiotensina II algún papel en el aumento de la permeabilidad selectiva del glomérulo (16); estaría involucrada, además, en la regulación de la síntesis de la matriz extracelular mesangial y de la proliferación de las células glomerulares (27). A nivel experimental se postula que la proteinuria tendría un ciclo circadiano, produciéndose durante el día la máxima excreción coincidentemente con el pico de actividad antiproteínúrica de los inhibidores de la ECA. La relativa resistencia nocturna a la acción de estos compuestos sería una determinación de importancia para establecer regímenes posológicos alternativos futuros (8).

La elección preferencial de uno de estos inhibidores de la ECA sobre otros fármacos del mismo grupo no está avalada por estudios clínicos controlados (7). El enalapril (Lotrial®) es el único inhibidor de la ECA que ha sido probado en ensayos clínicos, aplicado al tratamiento de la insuficiencia cardíaca. En principio se aconseja administrar una dosis pequeña e incrementarla hasta lograr la acción terapéutica deseada. El captoprilo (Capoten®) se cita como causa probable de glomerulopatía inducida por drogas (2).

Los inhibidores de la ECA en elevadas dosis pueden provocar proteinuria, glomerulonefropatías, hipotensión, astenia y síncope (16, 34).

Los bloqueantes de canales de calcio solos, o administrados en forma conjunta con los inhibidores de la ECA, tendrían un efecto beneficioso en el tratamiento de la hipertensión, en razón de reducir la respuesta a la angiotensina de las células de la corteza adrenal (6, 7, 29). Estos fármacos reducirían la proteinuria en for-

ma significativa (7, 23, 29); no obstante, su prescripción no se recomienda porque se estima que induciría glomeruloesclerosis (6, 7). Las dosis indicadas se hallan en la tabla 2.

5) Se ha visto que las dietas con elevada concentración proteica aumentarían la capacidad sintética proteica hepática y de manera concomitante la proteinuria. La reducción de la ingesta proteica tendría efectos opuestos. Los resultados netos de estos cambios no se conocen con certeza (7, 16, 34).

Acercas del manejo de la proteína en individuos azotémicos la mayoría de los autores consultados coinciden en sugerir su restricción para minimizar la producción de metabolitos nitrogenados tóxicos (5, 6, 7, 10, 16, 19, 26, 34). Estas dietas podrían ser suplementadas con aminoácidos esenciales y anabólicos para optimizar la conversión del nitrógeno a proteínas estructurales (10, 26).

En los pacientes sin evidencia de insuficiencia renal la restricción proteica es motivo de controversia. Quienes apoyan esta medida postulan que retrasaría la glomeruloesclerosis inducida por hipertensión (5, 6, 7, 10, 19). La hiperaminoacidemia post-prandial eleva la presión capilar glomerular en individuos sanos sin consecuencias clínicas. En individuos con enfermedad renal esta elevación sería perjudicial,

y la ingestión de dietas hipoproteicas evitaría la hiperaminoacidemia y restablecería la habilidad renal para auto-regular su presión (6,7). Además, la proteína dietética reducida y la administración de inhibidores de la ECA tendrían efecto aditivo en la reducción de la proteinuria (16).

Los valores sugeridos son de 2 a 3 g/kg de peso vivo de proteína bruta para los perros (dietas comerciales con 14% a 20% de proteína en materia seca), y de alrededor de 4 g/kg pv para los gatos (dietas comerciales con 28% a 32% de proteína en materia seca) (7) .

Entre las consecuencias perjudiciales consecutivas a la restricción proteica se observan la reducción de la masa corporal magra y de la albuminemia, la caída del hematocrito, (más habitual en los gatos) y la inmunosupresión. La caída súbita de los valores de albúmina plasmática o la consunción son signos que indicarían la necesidad de elevar la cantidad y la calidad de las proteínas de la dieta (5, 6, 10).

Otros autores sugieren la necesidad de aumentar la concentración proteica en la ingesta para restablecer el balance positivo de albúmina, y controlar la proteinuria consecuente mediante la prescripción de inhibidores de la ECA (5,7,10).

Tabla 2. Dosis indicadas de los fármacos usados en el tratamiento de la glomerulonefritis (adaptado de Grauer y Di Bartola, 1997).

Table 2 . Dose of the drugs used to treat the glomerulonephritis (adapted from Grauer and Di Bartola, 1997).

Fármaco	Dosis para perros, vía oral	Dosis para gatos, vía oral
Aspirina	0,5 mg/kg p.v. cada 12-24 h	80 mg totales cada 48 h
Azatioprina	2 mg/kg p.v. cada 24 h; luego 0,5 a 1 mg/kg cada 48 h	Solo se administra en perros
Ciclofosfamida	2,2 mg/kg p.v. cada 24 h durante tres días, suspender 4 días, repetir	12,5 mg/animal cada 24 h durante 4 días, suspender 3 días, repetir
Ciclosporina	15 mg/kg p.v. cada 24 h	Solo se administra en perros
Dipiridamol	4-10 mg/kg p.v. cada 24 h	
Enalapril	0,1-0,5 mg/kg p.v. cada 12-24 h	
Espironolactona	2-4 mg/kg p.v. cada 24 h	
Furosemida	1- 6 mg/kg p.v. cada 8 h	1-2 mg/kg p.v. cada 12 h
Levamisol	0,5 - 2 mg/kg p.v. cada 48 h	-
Prednisona	1,5 - 2 mg/kg p.v. en días alternados	2-4 mg/kg p.v. en días alternados

ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EXPERIMENTALES

Las medidas terapéuticas descritas en este apartado se encuentran en etapa experimental o bien, siendo utilizadas actualmente en pacientes humanos, no han sido probadas aún en animales domésticos.

La suplementación con ácidos grasos omega-3 (eicopentanoico y docosahecanoico-Derm Caps[®]) reduciría la formación de las IL-1 y 2, la proteinuria, la formación de TX y la trigliceridemia (6, 11, 16). Por el contrario, la administración de estos compuestos no ha corregido la hiperlipoproteinemia (21).

Se ha intentado bloquear la función de los linfocitos T o la interacción T-B mediante antagonistas de los receptores de IL-1, de IL-2 o mediante anticuerpos anti IL-1-β, obteniéndose como resultado la reducción de la proteinuria (19).

Los anticuerpos anti-selectinas reducirían la infiltración tisular leucocitaria (19).

El compuesto WEB 2170, antagonista del receptor de PAF ha sido efectivo en la preservación de la función renal (19).

Los inhibidores de sustancias oxidantes reducirían la lesión hística (19,27).

Los antagonistas de los receptores de la angiotensina II y de la endotelina I (vasoactivo y estimulante de la proliferación de las células mesangiales) han postergado la glomeruloesclerosis (19).

En el tratamiento de la hiperlipemia de los humanos se han utilizado fibratos como el gemfibrozil (Lopid[®]) y resinas fijadoras de ácidos grasos, como el colestipol (Colestid[®]) que han resultado efectivos para reducir la concentración de triglicéridos y en menor medida la del colesterol. Otras drogas que consiguen importantes reducciones del colesterol (del orden del 25% al 45%) son los inhibidores de la hidroximetil-glutaril-Co-A reductasa, como la lovastatina (Mevacor[®]) (2, 4).

SEGUIMIENTO

La evaluación periódica de la evolución del paciente es de fundamental importancia para estimar la respuesta al tratamiento y discontinuarlo o modificarlo en caso de detectar efectos colaterales perjudiciales. Las modificaciones diarias en los parámetros de importancia no deben ser interpretados como evidencia de respuesta al tratamiento; en cambio, la variación en las mediciones de tres días consecutivos puede determinar la modificación de los

regímenes de dosificación de las drogas o, eventualmente, la continuidad del tratamiento vigente. Los principales parámetros que deben ser medidos periódicamente son: la excreción proteica urinaria diaria, la relación proteína urinaria/creatinina (dos mediciones separadas por dos días), la concentración de albúmina y creatinina séricas, y el nitrógeno ureico sérico (7, 10, 16, 26, 34).

CONCLUSIONES

Se deberá en todos los casos identificar la enfermedad que origina la respuesta inmune, ya que mediante su resolución la glomerulopatía tiende a revertir.

Es importante enfatizar la trascendencia de realizar el diagnóstico histopatológico previo a la planificación del tratamiento, debido a que a partir de la clasificación morfológica de la glomerulopatía surgen no solo las distintas alternativas terapéuticas sino además diferentes pronósticos.

Tradicionalmente se ha indicado la inmunosupresión como pilar del tratamiento de ciertas glomerulopatías por inmunocomplejos. En la actualidad existe controversia acerca del estado exacerbado o deprimido del sistema inmune, por tal motivo ciertos autores proponen la inmunoestimulación como alternativa de la clásica terapia con glucocorticoides.

Con respecto al tratamiento de la hipercoagulabilidad y de la hipertensión se resalta la importancia del reconocimiento de estos problemas en el paciente, en cuyo caso será pertinente indicar su corrección médica. Es de destacar que no se propone su tratamiento como parte de un protocolo de rutina para todos los casos.

Si bien la mayoría de los autores consultados coincide en la necesidad de restringir la ingesta proteica, otros se encuentran en desacuerdo ya que postulan la necesidad de aumentar la ingesta proteica para corregir la hipoproteinemia. Argumentan además el riesgo de pérdida ponderal que puede resultar de las dietas hipoproteicas.

Las alternativas terapéuticas que están en período experimental son numerosas. A manera de ejemplo se cita la suplementación con ácidos grasos omega-3, cuya administración ha logrado reducir la formación de IL-1 y la proteinuria. Si bien no han sido probadas en animales domésticos resultan propuestas promisorias para el futuro tratamiento de la entidad descrita.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Inmunología Celular y Molecular, Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana (España), 1995; p.445.
- 2- Alcazar R, Egido J. Síndrome nefrótico: fisiopatología y tratamiento general. En: Avendaño, L. H. Nefrología Clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid (España), 19477; p. 245-254.
- 3- Brahm M, Brammer M, Balslov JT, Brun C, Jorgensen HE, Gerstoft J, Lorenzen I., Thomsen A. Prognosis in glomerulonephritis. III. A longitudinal analysis of changes in serum creatinine and proteinuria during the course of disease: effect of immunosuppressive treatment. Report from Copenhagen Study Group of Renal Diseases. Rev J Int. Med 1992; 231: 339-347.
- 4- Brown MS, Goldstein J. Agentes Usados en el Tratamiento de las Hiperlipoproteinemias. En: Goodman Gilman, A y col, Las bases Farmacológicas de la Terapéutica, ed. 8. Ed. Médica Panamericana. México D.F. (México), 1991; p. 851-872.
- 5- Brown SA. Afecciones urogenitales. En: Lorenz, M. D. ; Cornelius, L. M. y Ferguson, D. C. Manual de terapéutica en Animales Pequeños. Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina),1993; p.255-282.
- 6- Brown SA, Crowell WA, Brown CA, Barsanti JA, Finco DR. Pathophysiology and Management of Progressive Renal Disease, Rev Vet J 1997; 154: 93-109.
- 7- Brown SA. Primary Diseases of Glomeruli. En: Osborne, C. A. y Finco, D. R. Canine and Feline Nephrology and Urology. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore (USA), 1995; p.368-385.
- 8- Buter H, Hemmeler MH, Van Paassen P, Navis G, De Zeeuw D, De Jong PE. Is the antiproteinuric response to inhibition of the renin-angiotensin system less effective during the night ?. Rev Nephrol Dial Transplant 1997; 12:2: 53-56.
- 9- Confer AW, Panciera RJ. 1990. Sistema Urinario. En: Thomson, R. G. Patología Veterinaria Especial, Ed. Manole Ltda. São Paulo (Brasil), 1990; p. 510-512.
- 10- Cowgill LD. Enfermedades del riñón. En: Ettinger, S. J.(ed.) Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del Perro y el Gato. Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina), 1990; p. 1702-1717.
- 11- De Caterina R, Capriolo R, Giannessi D, Sicari R, Galli C, Lazznerini G, Bernini W, Carr L, Rindi P. n-3 fatty acids reduce proteinuria in patients with chronic glomerular disease. Rev Kid Int 1993; 44: 843-850.
- 12- Di Bartola SP, Chew DJ. Glomerular disease in the dog and cat. En: Kirk, R.(ed.) Current Veterinary Therapy. Small Animal Practice IX. Ed. W. B. Saunders Co. Philadelphia (USA), 1986; p. 1132-1138.
- 13-Egido J, Alcázar R. Clasificación de las enfermedades glomerulares. En: Avendaño, L. H. Nefrología Clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid (España), 1997; p.242-244.
- 14- Fabbri A, Cocchi R, Degli Esposti E, Lucatello A, Sturani A, Tampieri G, Fusaroli M. Antiproteinuric Effect of Angiotension-Converting-Enzyme Inhibitors in Patients with Primary Glomerular Disease and Normal Renal Function. Rev Nep Dial Trans, 1990; 5: 81-83.
- 15- Frenier SL, Dhein CR. Diagnóstico y Tratamiento de la Falla Renal Aguda. En: August, J. R. Consultas en Medicina Interna Felina.Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina), 1993; p. 300-309.
- 16- Grauer GF, Di Bartola SP. Glomerulopatía. En: Ettinger, S. J. y Feldman, E. C.(eds.) Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del Perro y el Gato. Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina), 1997; p. 2125-2140.
- 17- Handschumacher RE. Fármacos Usados Para Producir Inmunosupresión. En: Goodman Gilman, A y col Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Médica Panamericana. México D.F. (México), 1991; p.1224-1235.
- 18- Janeway CA, Travers P.Hipersensitivity Diseases. En Inmuno Biology. The Immune System in Health and Disease. Ed. Garland Publishing Inc, 1997; p. 11:17- 11:21.
- 19- Johnson RJ. Role of Cytokines and Growth Factors in Glomerulonephritis: a Chance for Future Therapeutic Intervention.Rev Nep 1996; 173: 506-514.
- 20- Jones TC, Hunt RD, King NW. Veterinary Pathology. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore (USA), 1997; 1116-1125.
- 21- Lenzi S, Capriolo R, Rindi P, Lazznerini G, Bernini W, Pardini E, Lucchetti A, Galli C, Carr L, De Caterina R. Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Lipoprotein(a) Concentrations in Patients with Chronic Glomerular Diseases.Rev Nep 1996; 72: 383-390.
- 22- Longhofer SL, Johnson H, Culham C, Schultz K, Grauer GF. Effects of a specific thromboxane synthetase inhibitor on thromboxane generation and excretion in healthy dogs.Rev Am J Vet Res 1990; 51: 1746-1750.
- 23- Maki D, Ma JZ, Louis TA, Kasiske BL. Long-term effects of antihypertensive agents on proteinuria and renal function. Rev Arch Intern Med 1995; 155: 1073-1080.
- 24- Mampaso F. Bases morfológicas de la lesión glomerular. En: Avendaño, L. H. Nefrología Clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid (España), 1997; p. 237-241.
- 25- Mowry JA, Mc Carthy ET. Cyclosporine in Glomerular Disease. Rev Seminars in Nephrology, 1996; 16: 548-554.
- 26- Osborne CA, Jeraj K. Glomerulonephropathy and the Nephrotic Syndrome. En: Kirk, R. (ed). Current Veterinary Therapy. Small Animal Practice VII. Ed.W. B. Saunders Co. Philadelphia (USA), 1980; p. 1053-1062.
- 27- Ortiz A, Egido J. Etiopatogenia de las enfermedades glomerulares. En: Avendaño, L. H. Nefrología Clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid (España), 1997; p.228-236.
- 28- Perico N, Amuchástegui SC, Colosio V, Senzogni G, Bertani T, Remuzzi G . Evidence that an angiotensin-converting enzyme inhibitor has a different

- effect on glomerular injury according to the different phase of the disease at which the treatment is started. *Rev J Am Soc Nephrol*, 1994; 5: 1139-1146.
- 29- Ritz E, Orth SR, Strzelczyk P. Angiotensin converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers, and their combination in the treatment of glomerular disease. *Rev Journal of Hipertension* 1997; 15: suppl. 2, S21-S26, 1997.
- 30- Remuzzi A, Imberti O, Puntorieri S, Malanchini B, Macconi D, Magrini L, Bertani T, Remuzzi G. Dissociation between antiproteinuric and antihypertensive effect of angiotensin converting enzyme inhibitors in rats. *Rev Am J Physiol*, 1994; 267: 6 Pt 2 1034-1044.
- 31- Salvati P, Ferti C, Ferrario RG, Lamberti E, Duzzi L, Bianchi G, Remuzzi G, Perico N, Benigni A, Braidotti P. Role of enhanced glomerular synthesis of thromboxane A2 in progressive kidney disease. *Rev Kid Int* 1990; 38:3, 447-458.
- 32- Spurney RF, Fan PY, Ruiz P, Sanfilippo E, Pisetsky DS, Coffman TM. 1992. Thromboxane receptor blockade reduces renal injury in murine lupus nephritis. *Rev Kid Int*, 1992; 41:4, 973-982.
- 33- Stahl RA, Thaiss F, Oberle G, Brecht HM, Schoeppe W, Wenzel U, Helmchen UM. The platelet activating factor receptor antagonist WEB 2170 improves glomerular hemodynamics and morphology in a proliferative model of mesangial cell injury. *Rev J Am Soc Nephrol* 1991; 2:1, 37-44.
- 34- Vaden SL, Grauer GF. Tratamiento Médico de la Glomerulonefritis Canina. En: Kirk, R. y Bonagura (eds.), *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales XI*. Ed. Interamericana -McGraw-Hill. (USA), 1994; p. 955-959.
- 35- Werner LL, Gorman NT. Alteraciones Inmunomediadas en los Gatos. En: August, J. y Loar, A. S. *Avances en Medicina Felina Parte I. Clínicas Veterinarias de Norteamérica. Práctica en Pequeños Animales*. Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina), 1988; p. 114-122.
- 36- Zoja C, Donadelli R, Corna D, Testa D, Facchinetti D, Maffi R, Luzzana E, Colosio V, Bertani T, Remuzzi G. The renoprotective properties of angiotensin-converting enzyme inhibitors in a chronic model of membranous nephropathy are solely due to the inhibition of angiotensin II : evidence based on comparative studies with a receptor antagonist. *Rev Am J Kidney Dis* 1997; 29: 2, 254-64.
- 37- Zollinger HU, Mihatsch MJ. Clinical and Procedural Aspects. En: *Renal Pathology in Biopsy. Light, Electron and Immunofluorescent Microscopy and Clinical Aspects*. Ed. Springer Verlag. Heidelberg (Alemania), 1978; p. 1-4; p.155-165; p. 177-187.

INDUCCIÓN DE ANEUPLOIDÍA POR METALES PESADOS: SU EVALUACIÓN A TRAVÉS DE TÉCNICAS CITOGÉNÉTICAS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

A. Seoane¹, F. Dulout²

¹Jefe de Trabajos Prácticos. ²Profesor Titular
Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA).
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: Entre las alteraciones que puede sufrir el complemento cromosómico de una especie, la aneuploidía (pérdida o ganancia de uno o varios cromosomas) reviste particular importancia por su relación etiológica con abortos espontáneos, malformaciones congénitas y transformación neoplásica. Sin embargo, no existen pruebas para la identificación de agentes aneugénicos (capaces de inducir aneuploidía) que hayan sido convalidados a nivel internacional mediante ensayos coordinados entre varios laboratorios. El presente trabajo analiza las diversas pruebas que han sido propuestos en años recientes y desarrolla el análisis crítico de uno de ellos –el de anafase-telofase– describiendo experimentos llevados a cabo con sales de metales pesados. Así, se evidencia que la prueba tiene suficiente sensibilidad como para diferenciar efectos de sustancias que, si bien poseen un modo de acción semejante, no actúan de la misma manera sobre el material genético. Por ejemplo, el cadmio (II) y el cromo (VI) fueron aneugénicos y clastogénicos mientras que el níquel (II) fue sólo aneugénico. Lo mismo puede decirse con respecto a la citotoxicidad ya que en la prueba se pudieron discriminar los efectos de las diferentes sales en función de su velocidad de ingreso a las células y de las reacciones involucradas en la formación de reactivos intermedios. Además, en todos los casos se pudieron establecer claras relaciones dosis-respuesta. Finalmente, dada su sencillez y bajo costo en términos de infraestructura necesaria y tiempo de análisis, el test puede ser recomendable para el abordaje inicial del estudio de sustancias de sospechada genotoxicidad.

Palabras Clave: aneuploidía, ensayos breves, metales pesados.

ANEUPLOIDY INDUCTION BY HEAVY METALS: EVALUATION USING CYTOGENETIC TECHNIQS IN MAMMALIAN CELLS

ABSTRACT: Among the alterations that can be induced in the chromosome complement of any specie the aneuploidy (loss or gain of one or more chromosomes) has a high relevance due to its ethiological relation with spontaneous abortus, congenital malformations and neoplastic transformation. Nevertheless, the tests proposed to identify aneugenic agents (agents able to induce aneuploidy) had no been convalidated internationally through interlaboratory coordinate assays. This work analyze the different tests proposed in recent years and develop a critical analysis of one of them –the anaphase-telophase test– describing the experiments carried out with heavy metal salts. Results obtained showed that the test has sensitivity enough to differentiate the effects of compounds that, having similar mechanisms of action do not act in the same way on the genetic material. For example, whereas cadmium (II) and chromium (VI) were aneugenics and clastogenics, nickel (II) was only aneugenic. Similarly, this test discriminated the different cytotoxic effects of the heavy metal salts in relation with the different uptake of each one by the cells and the reactions involved in the formation of reactive intermediates. Moreover, in all the cases it was possible to clearly establish dose-response relationships. Finally, due to its simplicity and low cost in terms of the necessary infrastructure and time consuming, the test can be recommended for the primary screening of suspected genotoxicants.

Key Words: aneuploidy, short term tests, heavy metals.

Fecha de recepción: 03/11/98

Fecha de aceptación: 02/09/99

Dirección para correspondencia:

Seoane Analía CC 296 (B1900AVW) La Plata, Argentina Fax: 0221-4211799.

E-mail: aseoane@fcv.medvet.unlp.edu.ar

CONSIDERACIONES GENERALES

Los seres vivos están expuestos a agentes físicos, químicos o biológicos a lo largo de toda su vida. Cuando la exposición de un organismo a un agente determinado tiene como consecuencia efectos nocivos se dice que el efecto es tóxico (del latín *toxicum* y éste del griego *toxicon*: veneno) (1). Los efectos de los agentes tóxicos sobre los animales pueden variar según la naturaleza del agente, la ruta de exposición, la duración de la exposición y la dosis recibida. Se llaman agentes genotóxicos a aquellas sustancias que producen efectos tóxicos, letales y heredables sobre el material hereditario nuclear o extranuclear en células germinales y somáticas (2).

Uno de los tipos posibles de daño al material genético es la aneuploidía, que consiste en la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas enteros en las células de un organismo y que se origina en la no disyunción de uno o más cromosomas en anafase. La aneuploidía es una de las principales causas de mortalidad prenatal y de trastornos congénitos en los seres vivos, tal como la fertilidad y además, parece jugar un papel importante en la patogénesis de la transformación celular, es decir en el desarrollo de tejido tumoral (3).

La aneuploidía se produce por la no disyunción de uno o más cromosomas durante la división celular. Los mecanismos que la originan pueden ser diversos: por un lado, pueden ocurrir alteraciones en el huso acromático debido a trastornos en la polimerización de las tubulinas o la división errónea de los centríolos. Ejemplos clásicos de estos efectos están representados por la colchicina, un alcaloide que inhibe la polimerización de las tubulinas o por el taxol, un compuesto que acelera la polimerización de las tubulinas. Dosis muy bajas de colchicina hacen que uno o varios cromosomas no puedan migrar hacia los polos, permaneciendo en la placa ecuatorial. Otra causa de aneuploidía puede ser la no separación de las cromátidas hermanas a nivel del centrómero al comenzar la anafase, en este caso parece existir una relación con la aparición de alteraciones a nivel de los cinetocoros.

Los ensayos tradicionales de genotoxicidad, que constituyen esencialmente el análisis de aberraciones cromosómicas estructurales o intercambios de cromátidas hermanas, evalúan la capacidad de los productos químicos para causar daño en el ADN, mutaciones génicas, o rotura y rearrreglos cromosómicos. Por ello es importante el desarrollo de tests que permitan evaluar con certeza la capacidad aneugénica de agentes físicos y químicos.

PRUEBAS DE ANEUGÉNESIS

A pesar de que la identificación de agentes aneugénicos es de gran importancia, no existe ningún ensayo convalidado a nivel internacional que pueda ser utilizado de manera estándar. Un ejemplo de ello es que entre las pruebas recomendadas por la Comisión de la Comunidad Europea no se incluye ninguna para aneugénesis (4). Por ello es necesario comprobar los métodos hasta ahora propuestos y, al mismo tiempo, desarrollar ensayos nuevos que con el tiempo puedan ser convalidados.

Las pruebas propuestas para analizar la inducción de aneuploidía se basan en el conteo de cromosomas en células diploides (5, 6) o, más recientemente, en el empleo de la técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*). En el primer caso es necesario utilizar líneas celulares diploides, ya que la mayoría de las líneas celulares establecidas tienen un considerable nivel basal de aneuploidía que disminuye la sensibilidad de los ensayos. Por ese motivo se emplean los primeros pasajes de líneas originadas en cultivos primarios de embriones, como por ejemplo la línea CHED (*Chinese hamster embryonic diploid*) (6). En el ensayo propuesto las células se cultivan en monocapa sobre cubreobjetos colocados en cajas de Petri. Dado que la no disyunción de los cromosomas se produce en la primera mitosis después del tratamiento con el agente que se ensaya, el análisis se hace en la segunda mitosis. Por ello es necesario determinar la duración del ciclo celular con exactitud. El tratamiento hipotónico se hace con cloruro de sodio al 0,17% a fin de lograr una dispersión tal de los cromosomas que permita el conteo en forma rápida y exacta. Con esta solución hipotónica se consigue además que la membrana plasmática se mantenga intacta, lo que da la seguridad de que la falta de uno o más cromosomas se ha originado por fenómenos de no disyunción durante la mitosis precedente.

Mediante este ensayo se estudió la acción aneugénica de rayos X y del estrógeno sintético dietilestilbestrol (6), del acetaldehído (7), del aldehído propiónico y del hidrato de cloral (8).

Un inconveniente que presentan los ensayos de aneugénesis que se basan en el conteo de cromosomas es que las líneas empleadas al cabo de un cierto número de subcultivos comienzan a incrementar la frecuencia de cambios cromosómicos numéricos. Por otra parte, estos ensayos son costosos en términos del tiempo necesario para contar los números cromosómicos de una cantidad significativa de metafases por cada punto experimental.

La técnica de FISH se basa en el empleo de sondas fluorescentes de ADN para cromoso-

mas específicos. Generalmente se colorean de esta manera tres o cuatro pares de cromosomas contabilizando como un evento de aneuploidía la presencia de más de dos cromosomas por par, o la ausencia de uno o ambos miembros del par. Considerando el contenido de DNA de los cromosomas coloreados con las sondas se pueden extrapolar los resultados al complemento cromosómico total (9). Un ejemplo de la aplicación de esta técnica fue el estudio de alteraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica de individuos expuestos a arsénico en forma crónica (10).

Una alternativa promisoriosa como ensayo breve de aneugénesis es el análisis de alteraciones en anafase-telofase de la mitosis. Se basa en la observación de células que se encuentran entre la parte final de la anafase y el comienzo de la telofase en las que es posible detectar anomalías tales como puentes de cromatina, fragmentos cromosómicos rezagados o cromosomas rezagados. La técnica es sumamente sencilla y consiste en cultivar células en monocapa sobre cubreobjetos adheridos con una pequeña gota de grasa siliconada al fondo de cajas de Petri de 9 cm de diámetro. La siembra se hace a partir de una suspensión celular en medio de cultivo (aproximadamente 50.000 células/ml) colocando una gota que abarque todo el cubreobjeto o lo exceda ligeramente. Al cabo de una hora, cuando las células se han adherido al cubreobjetos, se agrega medio de cultivo hasta llegar a 10 ml. Es importante determinar en ensayos piloto el lapso entre la siembra y la fijación en el que se obtiene la mayor cantidad de células en anafase-telofase, esto depende de la línea celular empleada y de la duración del ciclo celular. Con células de la línea CHO (*Chinese hamster ovary*), que tiene un ciclo celular de 12-15 horas, los cultivos se fijan a las 30 horas. Con células de la línea MRC5 (fibroblastos humanos), que tiene un ciclo celular de 22-24 horas, las células se cultivan durante 60 horas. La fijación se inicia agregando a los cultivos 1 ml de fijador (metanol-ácido acético glacial 3:1). Al cabo de 15-20 minutos se reemplazan 5 ml del contenido de la caja por 5 ml de fijador. La operación se repite a los 5 min y, transcurrido el mismo lapso, se reemplaza la totalidad del contenido de la caja. Luego de tres cambios más de fijador, los cubreobjetos se dejan secar al aire sobre papel de filtro y luego se colorean con carbol-fucsina y se montan sobre portaobjetos con DPX (11).

Las anomalías que se pueden observar en anafase-telofase son consecuencia de distintas alteraciones cromosómicas. Los puentes de cromatina pueden originarse en aberraciones tipo intercambio que dan lugar a cromátidas dicéntricas cuyos centrómeros migran hacia

polos distintos. Los fragmentos rezagados son consecuencia de fracturas de cromátidas y permanecen en la placa ecuatorial por carecer de cinetocoros. Los cromosomas rezagados, que serían los indicadores de inducción de aneuploidía, se producirían por alteraciones en los cinetocoros que impiden la correcta migración hacia los polos celulares.

Un dato interesante que avala indirectamente el concepto de que los cromosomas rezagados constituyen eventos de aneuploidía fue la evaluación del acetaldehído como agente aneugénico. Tratando células de la línea CHED con distintas dosis del compuesto, y analizando la inducción de aneuploidía por conteo de cromosomas, se comprobó que incrementaba la frecuencia de células hipodiploides sin el concomitante incremento de células hiperdiploides (como sería de esperar si la aneuploidía se originase por no disyunción de los cromosomas). Paralelamente se observó un aumento significativo de cromosomas rezagados en células CHO analizadas en anafase tardía-telofase temprana con lo cual quedaría demostrado que esta última técnica es útil para la evaluación de posibles agentes aneuploidizantes (11).

GENOTOXICIDAD DE METALES PESADOS

Los metales elegidos para realizar los estudios son ampliamente utilizados en la industria: fundiciones, fábricas de pigmentos y cubiertas metálicas, industria electrónica y fertilizantes en el caso de cadmio; fundición y refinación, fundiciones pesadas, fábricas de acero inoxidable, etc. el níquel; y en curtiembres, plantas de aleación e industria de joyería con plata el cromo. Los mismos han sido ampliamente evaluados en cuanto a su capacidad genotóxica (12, 13, 14, 15, 16, 17) pero no hay datos concluyentes en cuanto a sus mecanismos de acción que es uno de los puntos de mayor interés.

En la tecnología moderna el cadmio tiene un amplio espectro de aplicaciones, tal como en fundiciones, fábricas de pigmentos y cubiertas metálicas, en la industria electrónica y en fertilizantes, inclusive se lo puede encontrar en varios componentes de la dieta. Desde su descubrimiento a principios de siglo, el empleo de cadmio se ha incrementado dando como resultado la contaminación ambiental en ciertas áreas.

Según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (18) hay limitada evidencia sobre la carcinogenicidad del cadmio en humanos pero hay suficiente evidencia de su carcinogenicidad en animales.

El cloruro de cadmio induce tumores testiculares y sarcomas locales en ratas inyectadas

subcutáneamente (19) y produce un aumento dosis-dependiente en la incidencia de carcinomas pulmonares en ratas luego de una exposición por inhalación (20, 21). Además, se vio que el tratamiento continuo de células con cloruro de cadmio origina anomalías mitóticas tales como formación de micronúcleos, y puentes de cromatina entre los juegos de cromosomas en separación, siendo los cambios más significativos, la aparición de células gigantes multinucleadas, núcleos heteroploídicos y degeneración de células (22). Selyes y colaboradores (23) informaron la inducción de aneuploidía por cloruro de cadmio en ratones. En nuestro laboratorio se comprobó el mismo tipo de daño en células CHO en concentraciones entre 0,5 a 4 mM (11). También se ha informado la capacidad de esta sal de producir inhibición en el ensamblaje de microtúbulos en dosis entre 10 y 1000 mM (24, 25).

En el caso del sulfato de cadmio, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (18) informa la producción de sarcomas testiculares cuando es inyectado en forma subcutánea en ratas y también produce aberraciones cromosómicas *in vivo*. No hay evidencia de que produzca aneuploidía *in vivo* en ratones pero sí en hámster.

La toxicidad del níquel se ha transformado en un tema de gran interés debido a su amplia aparición en el ambiente. La exposición ocurre principalmente por inhalación e incluye los procesos de minería, fundición y refinación del mismo a partir de sulfuros y óxidos minerales.

Se han realizado numerosos estudios para evaluar la toxicidad y genotoxicidad del níquel y se ha encontrado una gran evidencia acerca de su genotoxicidad. Puede producir: rotura de DNA, puentes DNA-proteína, aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas (26, 27, 28), también provoca mutagénesis en células CHO, lesiones cromosómicas, principalmente "gaps" en células de carcinoma mamario de ratón C3H (29) y en otras células de mamífero, tanto *in vivo* como *in vitro*, y en células vegetales. Se han obtenido evidencias de la toxicidad del níquel en estudios epidemiológicos en individuos expuestos ocupacionalmente (30, 31) y se ha observado incremento del riesgo de contraer cáncer de pulmón y sinusal (17).

Una de las sales que ha sido ampliamente estudiada en distintos sistemas experimentales es el cloruro de níquel. Se ha observado la inducción de un aumento en el número de focos displásicos inducidos por N-etil-N-hidroxietilnitrosamina en ratas F344 (17), con mitosis dispersas o con un huso parcialmente desarrollado en raíces de *Allium*, nefro y hepatotoxicidad (32, 33).

El sulfato de níquel cuenta con abundantes antecedentes de genotoxicidad (17, 34, 35, 36). Christie y colaboradores (37) observaron su capacidad de inducir transformación celular en células de hámster sirio, y su efecto mutagénico en células CHO en dosis de 0,1 mM al actuar en combinación con radiación UV. También se ha informado el aumento de la frecuencia de roturas de ADN de cadena simple y la inducción de puentes cruzados ADN-proteína (27, 38).

El cromo es un metal utilizado en una amplia variedad de industrias tales como: producción de pigmentos, curtido de cueros, elaboración de productos refractarios, preservantes de madera, anticorrosivos y fungicidas, también se utiliza en la industria metalúrgica y en fundiciones (39). Puede actuar como Cr III o Cr VI, pero la mayoría de los resultados positivos en ensayos de genotoxicidad han sido obtenidos empleando Cr VI, probablemente debido a su mayor poder oxidante o a su transporte a través de membrana. Según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) la evidencia de la carcinogenicidad en animales y humanos es inadecuada para el cromo en general pero suficiente para los cromatos en particular.

Hay una gran evidencia acerca de la clastogenicidad (intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas estructurales) del Cr VI (23, 34, 40, 41, 42, 43, 44, 45) aunque no específicamente de su capacidad aneugénica. Sora y colaboradores (46) informaron la inducción de aneuploidía en *Saccharomyces cerevisiae* con dosis que iban de 0,07 a 0,85 mM, y Biederman (47) encontró que dicha sal era capaz de inducir transformación celular con dosis de hasta 10 mM.

Se sabe que el dicromato de potasio es mutagénico en *Salmonella* sp. y en *Escherichia coli* (48), y que produce citotoxicidad, mutagenicidad y clastogénesis *in vitro* (49). También se conoce su capacidad de aumentar la frecuencia de micronúcleos tanto *in vitro*, en células CHO (40) como *in vivo*, en ratas y hámster chino (50). Tsuda (51) encontró que puede producir transformación morfológica en dosis de 0,1-0,3 mg Cr/ml como también aberraciones y citotoxicidad.

EVIDENCIAS EXPERIMENTALES

Tipo celular

Se utilizaron células CHO (Chinese Hamster Ovary) obtenidas de la American Type Culture Collection. Las mismas se cultivan en medio Ham F10 (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal y antibióticos (penicilina 50 UI y estreptomycin 50 mg/ml).

Metodología. Ensayo de anafase-telofase

El análisis citogenético de células en anafase-telofase ha sido propuesto por diversos autores para estudiar el daño cromosómico o citológico inducido por productos químicos (52, 53, 54, 55, 56). Consiste en el análisis de la presencia de cromosomas o fragmentos rezagados y de puentes de cromatina en dichos períodos de la división celular.

Las células se cultivan en monocapa sobre cubreobjetos de 24 x 36 mm, en cajas de Petri, desarrollándose el cultivo en estufa con atmósfera controlada con 5% de CO₂ a 37°C durante 30 h. El medio de cultivo utilizado es HAM F10 suplementado con suero bovino fetal y antibióticos. Cuando las células están en su fase logarítmica de crecimiento, 8 horas antes de sacrificar el cultivo se realiza el tratamiento con la droga a probar.

Las dosis se obtienen buscando la mayor concentración del agente a ensayar que permita la sobrevivencia de un número adecuado de células de modo de poder llevar a cabo el análisis. Las otras dos dosis se obtiene diluyendo a la mitad la inmediata superior. Cada experimento se realiza por cuadruplicado.

Para fijar las células se utiliza la mezcla metanol:ácido acético 3:1 en forma gradual y luego se guardan a 4° C durante 24 horas. La coloración se realiza con carbol fucsina y, luego de un secado suave, los cubreobjetos se montan con DPX sobre portaobjetos limpios.

El análisis se realiza con microscopio óptico. Se observan aproximadamente 1000 células por tratamiento. Se analiza la primera mitosis después del tratamiento y se observan solamente las células que se hallan cursando la anafase tardía-telofase temprana; no se analizan en anafase temprana porque pueden con-

fundirse los brazos de los cromosomas con puentes de cromatina o cromosomas rezagados.

El análisis estadístico se realiza con el método "G" Sokal y Rohlf (57) para comparar las frecuencias de células con aberraciones en los distintos tratamientos (dosis) y en el control sin tratar. Las variaciones del índice mitótico (células en división de cada mil) con las distintas dosis se evaluaron a través de un análisis de regresión.

RESULTADOS*Cloruro de cadmio*

Se observaron aumentos en la incidencia de puentes de cromatina y fragmentos y cromosomas rezagados en las células tratadas respecto a los controles (Tabla 1). En cuanto a cromosomas rezagados se observaron diferencias significativas $G = 14,55$ ($P < 0,01$) especialmente entre las dosis 4 (4 μM) y el control $G = 8,45$ ($P < 0,01$). Para las otras dosis las diferencias no fueron significativas $G = 0,04$ ($P > 0,75$), $G = 0,15$ ($P > 0,5$) y $G = 0,18$ ($P > 0,5$) para las dosis 1, 2, y 3, respectivamente.

Las diferencias en cuanto a puentes de cromatina fueron significativas $G = 12,15$ ($P < 0,025$) lo cual puede atribuirse a la dosis 4 $G = 9,86$ ($P < 0,01$) mientras que para las otras dosis los resultados fueron $G = 0,6$ ($P > 0,25$), $G = 2,05$ ($P > 0,1$) y $G = 4,77$ ($P > 0,25$) para las dosis 1, 2 y 3 respectivamente.

En el caso de los fragmentos rezagados también hubo diferencias significativas $G = 9,74$ ($P < 0,025$) atribuibles a las dosis 2, $G = 5,55$ ($P < 0,025$) y 4, $G = 8,95$ ($P < 0,01$), para las dosis 1 y 3 el resultado fue $G = 2,66$ ($P > 0,01$).

La evaluación del índice mitótico mostró una disminución dosis-dependiente con un valor de $R = 0,96$ ($P < 0,01$).

Tabla 1. Alteraciones en anafase-telofase inducidas por cloruro de cadmio en células CHO. El error estándar se indica entre paréntesis debajo de los valores correspondientes.

Table 1. Anaphase-telophase alterations induced by cadmium chloride in CHO cells. Standard error is indicated between parentheses below the corresponding values.

Tratamiento	Alteraciones en anafase-telofase cada 100 células			Índice mitótico %
	Puentes de cromatina	Cromosomas rezagados	Fragmentos rezagados	
--	0,66 (0,08)	1,33 (0,11)	0,66 (0,08)	2,97
CC 0,5 μM	1,00 (0,09)	1,44 (0,11)	1,44 (0,11)	2,63
CC 1,0 μM	1,33 (0,11)	1,55 (0,12)	0,88 (0,13)	2,16
CC 2,0 μM	1,77 (0,14)	1,11 (0,10)	1,44 (0,11)	2,11
CC 4,0 μM	2,44 (0,15)	3,33 (0,17)	2,33 (0,15)	1,40

CC: Cloruro de Cadmio (CdCl₂)

Sulfato de cadmio

Se observaron aumentos en la incidencia de todas las aberraciones analizadas: puentes de cromatina y cromosomas y fragmentos rezagados (Tabla 2). Las diferencias entre las células tratadas respecto a los controles sin tratar fueron significativas en cuanto a la incidencia de cromosomas rezagados $G = 11,6$ ($P < 0,025$) esto fue ocasionado únicamente por la mayor de las dosis utilizadas: $G = 9,7$ ($P < 0,01$).

Con respecto a los fragmentos rezagados también hubo diferencias significativas entre las distintas dosis y los controles sin tratar $G = 15,95$ ($P < 0,01$) siendo éstas atribuibles a la mayor de las dosis utilizadas: $G = 6,88$ ($P < 0,01$).

Finalmente, considerando los puentes de cromatina, también se hallaron diferencias significativas entre la células tratadas con sulfato de cadmio y las no tratadas $G = 9,08$ ($P < 0,05$); estas diferencias son atribuibles únicamente a

la dosis mayor: $G = 8,41$ ($P < 0,01$) al igual que lo observado en el análisis de los otros tipos de alteraciones.

La disminución del índice mitótico fue dosis-dependiente lo que queda demostrado por el $R = 0,93$ ($P < 0,1$).

Cloruro de níquel

Se observaron aumentos en la incidencia de cromosomas y fragmentos rezagados pero no así en la frecuencia de puentes de cromatina en las células tratadas con respecto a los controles sin tratar (Tabla 3).

En el caso de los cromosomas rezagados las diferencias fueron significativas entre las 3 dosis mayores y los controles sin tratar: $G = 9,73$ ($P < 0,01$), $G = 5,05$ ($P < 0,025$) y $G = 7,78$ ($P < 0,01$), respectivamente.

En cuanto a los fragmentos rezagados, su incremento no fue significativo $G = 2,09$ ($P > 0,5$).

Con respecto al índice mitótico, el mismo

Tabla 2. Alteraciones en anafase-telofase inducidas por sulfato de cadmio en células CHO. El error estándar se indica entre paréntesis debajo de los valores correspondientes.

Table 2. Anaphase-telophase alterations induced by cadmium sulfate in CHO cells. Standard error is indicated between parentheses below the corresponding values.

Tratamiento	Alteraciones en anafase-telofase cada 100 células			Índice mitótico %
	Puentes de cromatina	Cromosomas rezagados	Fragmentos rezagados	
--	0,66 (0,07)	1,00 (0,09)	0,80 (0,08)	2,32
SC 0,033 M	1,84 (0,13)	1,07 (0,10)	1,15 (0,03)	2,40
SC 0,067 M	2,00 (0,14)	1,60 (0,12)	0,60 (0,07)	2,00
SC 0,0134 M	4,28 (0,20)	5,71 (0,23)	4,28 (0,20)	0,45

SC: Sulfato de Cadmio (SO_4Cd)

Tabla 3. Alteraciones en anafase-telofase inducidas por cloruro de níquel en células CHO. El error estándar se indica entre paréntesis debajo de los valores correspondientes.

Table 3. Anaphase-telophase alterations induced by nickel chloride in CHO cells. Standard error is indicated between parentheses below the corresponding values.

Tratamiento	Alteraciones en anafase-telofase cada 100 células			Índice mitótico %
	Puentes de cromatina	Cromosomas rezagados	Fragmentos rezagados	
--	0,40 (0,06)	0,40 (0,06)	0,00 (0,00)	2,35
CN 0,013 mM	0,30 (0,05)	1,00 (0,09)	0,10 (0,03)	2,35
CN 0,027 mM	0,20 (0,04)	1,80 (0,13)	0,20 (0,40)	2,35
CN 0,040 mM	0,40 (0,06)	1,30 (0,11)	0,30 (0,05)	2,35
CN 0,054 mM	0,50 (0,07)	1,60 (0,12)	0,30 (0,05)	1,55

CN: Cloruro de Níquel ($NiCl_2$)

disminuyó con las dosis utilizadas pero no lo hizo en forma estadísticamente significativa $R = 0,70$ ($P > 0,5$).

Sulfato de níquel.

Se observaron aumentos en la incidencia de todas las aberraciones analizadas (Tabla 4). Las diferencias fueron significativas en el caso de los cromosomas rezagados $G = 13,8$ ($P < 0,01$) y de los puentes de cromatina $G = 15,24$ ($P < 0,01$). Las dosis a las que pueden atribuirse dichas diferencias fueron las dos más altas en el caso de los cromosomas rezagados $G = 6,61$ ($P < 0,025$) y $G = 14,7$ ($P < 0,001$), respectivamente, y todas en el caso de los puentes de cromatina $G = 15,24$ ($P < 0,01$); $G = 5,85$ ($P < 0,025$); $G = 6,90$ ($P < 0,01$) y $G = 15,08$ ($P < 0,001$).

Con respecto a los fragmentos rezagados el análisis estadístico de la totalidad de los datos mostró valores de probabilidad cercanos al

límite de significancia. Cuando comparamos separadamente cada dosis con el control sin tratar observamos que sólo había diferencias significativas entre la primera dosis y el mismo $G = 5,82$ ($P < 0,025$), mientras que las otras dosis si bien mostraban una frecuencia aumentada, carecían de significancia estadística.

El análisis de regresión del índice mitótico mostró una disminución dosis-dependiente estadísticamente significativa $R = 0,97$ ($P < 0,05$).

Dicromato de potasio.

Se observaron aumentos en la incidencia de todas las aberraciones analizadas: puentes de cromatina y cromosomas y fragmentos rezagados (Tabla 5).

Las diferencias entre las células tratadas respecto a los controles sin tratar fueron altamente significativas en cuanto a la incidencia de cromosomas rezagados $G = 25,8$ ($P < 0,001$) y

Tabla 4. Alteraciones en anafase-telofase inducidas por sulfato de níquel en células CHO. El error estándar se indica entre paréntesis debajo de los valores correspondientes.

Table 4. Anaphase-telophase alterations induced by nickel sulfate in CHO cells. Standard error is indicated between parentheses below the corresponding values.

Tratamiento	Alteraciones en anafase-telofase cada 100 células			Índice mitótico %
	Puentes de cromatina	Cromosomas rezagados	Fragmentos rezagados	
--	0,20 (0,04)	0,70 (0,08)	0,30 (0,05)	2,90
SN 0,2 mM	1,00 (0,09)	1,30 (0,11)	1,20 (0,10)	2,85
SN 0,4 mM	1,10 (0,10)	2,00 (0,14)	0,80 (0,08)	1,90
SN 0,8 mM	1,40 (0,11)	2,00 (0,14)	0,60 (0,07)	0,97

SN: Sulfato de Níquel (SO_4Ni)

Tabla 5. Alteraciones en anafase-telofase inducidas por dicromato de potasio en células CHO. El error estándar se indica entre paréntesis debajo de los valores correspondientes.

Table 5. Anaphase-telophase alterations induced by magnesium dichromate in CHO cells. Standard error is indicated between parentheses below the corresponding values.

Tratamiento	Alteraciones en anafase-telofase cada 100 células			Índice mitótico %
	Puentes de cromatina	Cromosomas rezagados	Fragmentos rezagados	
--	0,99 (0,09)	1,10 (0,10)	0,10 (0,03)	1,18
DP 1 μ M	1,40 (0,11)	3,10 (0,17)	0,80 (0,08)	2,08
DP 2 μ M	1,60 (0,12)	3,90 (0,19)	1,20 (0,10)	1,27
DP 3 μ M	2,60 (0,15)	3,60 (0,18)	0,90 (0,09)	1,18
DP 4 μ M	4,60 (0,20)	4,50 (0,20)	1,10 (0,10)	0,96

DP: Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$)

esto ocurrió con todas las dosis utilizadas: $G=10,12$ ($P<0,01$) para la dosis 1; $G = 17,02$ ($P<0,001$) para la dosis 2; $G = 14,32$ ($P<0,001$) para la dosis 3 y $G = 22,74$ ($P<0,001$) para la dosis 4.

Con respecto a los fragmentos rezagados también hubo diferencias significativas entre las distintas dosis y los controles sin tratar $G = 12,74$ ($P<0,025$) siendo estas atribuibles a las 4 dosis utilizadas: $G = 6,22$ ($P<0,025$) para la dosis 1; $G = 11,03$ ($P<0,001$) para la dosis 2; $G = 7,39$ ($P<0,01$) para la dosis 3; $G = 9,80$ ($P<0,01$) para la dosis 4.

Finalmente, considerando los puentes de cromatina, también hallamos diferencias altamente significativas entre las células tratadas y las no tratadas $G = 36,48$ ($P<0,001$); estas diferencias son atribuibles únicamente a las 2 dosis mayores: $G = 8,76$ ($P<0,01$) para la dosis 3 y $G = 27,92$ ($P<0,001$) para la dosis 4.

La disminución del índice mitótico en relación a la concentración de cromo arrojó un $R = 0.90$ ($P<0.05$).

DISCUSIÓN

Asumiendo que el incremento de las frecuencias de cromosomas rezagados en anafase-telofase puede ser indicativo de habilidad aneugénica (11), este ensayo puede ser considerado útil para distinguir compuestos aneugénicos de clastogénicos, siendo los fragmentos rezagados y los puentes de cromatina indicadores de actividad clastogénica.

La carcinogenicidad y genotoxicidad del cadmio, cromo y níquel dependen en gran medida del ligando al que estén unidos lo cual modifica la biodisponibilidad y reactividad con los eventuales blancos celulares. De acuerdo con Beyersman (58), los compuestos metálicos son levemente genotóxicos, con excepción del cromo hexavalente. A pesar de esta aseveración nosotros encontramos que los tres cationes son genotóxicos: el cadmio y el cromo son clastogénicos y aneugénicos, y el níquel sólo es aneugénico.

En el caso de las sales de cadmio, podemos inferir que el cloruro es más tóxico que el sulfato ya que fue efectivo en concentraciones menores.

El dicromato de potasio fue utilizado en una concentración molar mayor que las sales de cadmio y su capacidad genotóxica se observó en dosis mayores que las necesarias para inducir aneuploidía en *Saccharomyces cerevisiae* (46) y similares o menores que las que ocasionan transformación celular en células de hámster sirio y en fibroblastos BHK (59).

Los compuestos de níquel indujeron aumento de la frecuencia de cromosomas rezagados, y sólo en el caso del sulfato, de la de puen-

tes de cromatina. Ninguna de las dos sales probadas tuvo efecto sobre la frecuencia de fragmentos rezagados. Estos resultados indican que o bien estos compuestos no son clastogénicos, o tienen un efecto muy débil que no pudo apreciarse bajo las condiciones experimentales empleadas. De todas maneras otros autores han encontrado resultados positivos utilizando dosis mayores de cloruro de níquel (0,5 - 2 mM por 5 h) (60) o combinando el sulfato de níquel con radiación UV o benzo-a-pireno. Littlefield y colaboradores (28) encontraron que el ion Ni^{+2} fue menos tóxico que el Cd^{+2} en la misma concentración.

La disminución del índice mitótico, estadísticamente significativa en todos los casos, excepto uno, indica que estos compuestos metálicos tienen actividad citotóxica dosis-dependiente. El cloruro de níquel fue el único compuesto que no arrojó un R significativo probablemente debido a que si bien tiene actividad citotóxica, las dosis más bajas fueron poco efectivas.

La principal causa de aneuploidía es la no-disyunción, aunque hay otras causas que también deben ser tenidas en cuenta como el retraso cromosómico, la segregación errónea de las cromátidas y las divisiones monopares (61). Aún no sabemos cuáles son el o los mecanismos utilizados por los metales pesados. Se sabe que el cloruro de cadmio (tal como otros inductores de aneuploidía) produce modificaciones en la morfología de los microtúbulos en *Hordeum vulgare* (62). El cromo VI entra rápidamente a la célula por canales aniónicos, formándose reactivos intermedios durante su reducción intracelular que podrían ser responsables de su genotoxicidad (43, 42, 47). Sin embargo hay más de una explicación posible para la aneugénesis del cromo. Li y colaboradores (63) sugieren que la misma podría estar relacionada con el daño en la síntesis de proteínas de citoesqueleto. Otra explicación fue propuesta por Bridgewater y colaboradores que sugieren que el cromo puede inducir uniones DNA-DNA interfiriendo en la replicación y originando eventualmente cromosomas rezagados cuando esto ocurre a nivel del centrómero.

Finalmente podemos afirmar que los resultados descritos contribuyen a validar la prueba de anafase-telofase para la evaluación de agentes aneugénicos y clastogénicos de acuerdo a las siguientes evidencias: la prueba es lo suficientemente sensitiva como para detectar relaciones dosis-respuesta, es útil para diferenciar compuestos aneugénicos de clastogénicos, los resultados obtenidos con otros compuestos (datos no mostrados) concuerdan con los del conteo de cromosomas por ejemplo en el caso del aldehído propiónico (11).

BIBLIOGRAFÍA

1. Dulout FN. Mutagénesis y carcinogénesis ambiental. En: Elementos de política ambiental. F. Goñi y R. Goñi (Eds.) Honorable Cámara de Diputados de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, 1993; pp. 693-704.
2. Ehrenberg L, Brookes P, Druckrey H, Lagerlof B, Litwin J, Williams G. The relation of cancer induction and genetic damage. En: Evaluation of genetic risks of environmental chemicals, Ramel, C. (De.) Ambio Special Report N°3, Royal Swedish Academy of Sciences, Universitetsforlaget, Estocolmo, 1973; pp. 15-25.
3. Epstein C. Mechanisms of the effects of aneuploidy in mammals. Annual Reviews of Genetic 1988; 22: 51-75.
4. OECD/OCDE. Ninth addendum to the OECD guidelines for the testing of chemicals. (ISBN 92-64-16054-X) 1998.
5. Danford N. Tests for chromosome aberrations and aneuploidy in Chinese hamster fibroblast cell line CH1-L. In Ashby J, De Serres F, Draoer M, Ishidate M Jr, Margolin B, Matter B y Shelby M (eds), Progress in Mutation Research, Elsevier, Amsterdam, 1985; vol. 5 pp 397-411.
6. Dulout F, Olivero O. Anaphase-telophase analysis of chromosomal damage induced by chemicals. Environ Mutagen 1984; 6: 299-310.
7. Dulout F, Furnus C. Acetaldehyde-induced aneuploidy in cultured Chinese hamster cells, Mutagenesis 1987; 3: 207-211.
8. Furnus C, Ulrich M, Terreros M, Dulout F. The induction of aneuploidy in cultured Chinese cells by propionaldehyde and chloral hydrate. Mutagenesis 1990; 5: 323-326.
9. Natarajan AT, Boei JJ, Darroudi F, Van Diemen P, Dulout F, Hande M, Ramalho A. Current cytogenetic methods for detecting exposures and effects of mutagens and carcinogens. Environ. Health Perspect. 1996; 104 (Suppl.3): 445-448.
10. Dulout FN, Grillo CA, Seoane AI, Maderna CR, Nilsson R, Vahter M, Darroudi F, Natarajan AT Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from Andean women and children from Northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. Mutation Research 1996; 370: 151-158.
11. Seoane AI y Dulout FN. Use of anaphase-telophase test to detect aneugenic compounds: effects of propionaldehyde and cadmium chloride. Bull Environ Contam Toxicol 1994; 53: 924-929.
12. Anttila S. Biological effects of occupational and environmental exposure to chromium. Metal Ions in Biology and Medicine 1990; pp. 315-319.
13. De Flora S y Wetterhahn K. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. Life Chemical Report 1989; 7: 169-244.
14. Hansen J, Gron P, Jespersen B, Voigt J, Simonsen J, Dalgaard J y Hansen E. Cadmium exposure in Denmark, Danish Medical Bulletin 1989; 36: 499-502.
15. Oberdorster G. Pulmonary toxicity and carcinogenicity of cadmium. Journal Amer Coll Toxicol 1989; 8 (7): 1251-1263.
16. Sunderman F. Recent advances in metal carcinogenesis. Annals on Clinical and Laboratory Science 1989; 14 (2): 93-122.
17. Coogan T, Bare R, Waalkes M. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. Toxicol Appl Pharmacol 1992; 113(2): 227-233.
18. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. Supplement 7. Lyon, France. 1987.
19. Reddy J, Svoboda S, Azarnoff D y Dawar R. Cadmium-induced cell tumors of rat testis: morphologic and cytochemical study, J. Natl. Cancer Inst. 1973; 51: 891-903.
20. Takenaka S, Oldiges H, Konig H, Hochrainer D y Oberdorster G. Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in W rats, J. Natl. Cancer Inst. 1983; 70: 367-373.
21. Oldiges H, Hochrainer D, Takenaka S, Oberdorster G y Konig H. Lung carcinomas in rats after low level cadmium inhalation, Toxicology and Environmental Chemistry, 1984; 9: 41-51.
22. Lakkad B, Nigam S, Karnik A, Thakore K y Chatterjee B. Effect of cadmium chloride on cell division and chromosomes in Chinese hamster ovary cells. Bull Environ Contam Toxicol 1984; 36: 342-349.
23. Selyes A, Serényi P, Boldog F, Bokros F, Takács S. Acute and long term genotoxic effects of CdCl₂ on testes of mice. J Toxicol Environ Health 1992; 36: 401-409.
24. Wallin M, Fridén B, Billger M. Studies of the interaction of chemicals with microtubule assembly in vitro can be used as an assay for detection of cytotoxic chemicals and possible inducers of aneuploidy. Mutation Research 1985; 201: 303-311.
25. Andersen O, Ronne M. Spindle-inhibiting effects of metal compounds studied by chromosome length measurement. Scandinavian Cell Toxicology Congress 1990; 2: 163-167.
26. Klein C, Frenkel K, Costa M. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. Chem Res Toxicol 1991; 4: 592-604.
27. Patierno SR, Costa M. DNA-protein cross-links induced by nickel compounds in intact cultured mammalian cells. Chem. Biol. Interact. 1985; 55:75-91.
28. Littlefield N, Hass B, James S y Poirier S. Protective effects of magnesium on DNA strands breaks induced by nickel or cadmium. Cell Biol Toxicol 1984; 10: 127-135.
29. Sharma A y Talukder G. Effects of metals on chromosomes of higher organisms. Environmental Mutagenesis 1987; 9:191-193.
30. Barret J. Annual Report of the Chief inspector of factories for the year 1948. Her's Majesty's Stationary Office, London 1949 pp.158.
31. Doll R, Matthews J y Morgan L. Cancers of the lung and nasal sinuses in nickel workers. British Journal of Industrial Medicine 1977; 34:102-105.
32. Foulkes E y Blanck S. The selective action of nickel on tubule function in rabbit kidneys. Toxicology 1984; 33: 245-247.
33. Donskoy E, Donskoy M, Faripour F, Gillies C,

- Marzouk A, Reid M, Zaharia O y Sunderman F Jr. Hepatic toxicity of nickel chloride in rats. *Annals of Clinical Laboratory Sciences* 1986; 16: 108-117.
34. Costa M. Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacol Toxicol* 1991; 31: 321-337.
35. Dunnick J, Elwell M, Benson J, Hobbs C, Hahn F, Haly P, Cheng YS y Eidson A. Lung toxicity after 13-week inhalation exposure to nickel oxide, nickel subsulfide, or nickel sulfate hexahydrate in F344/N rats and B6C3F₁ mice. *Fundamental and Applied Toxicology* 1988; 12: 584-594.
36. Benson J, Burt D, Cheng YS, Hahn J, Haley P, Henderson R, Hobbs C, Pickkrell J y Dunnick J. Biochemical responses of rat and mouse lung to inhaled nickel compounds. *Toxicology* 1989; 57: 255-266.
37. Christie NT, Sen P y Costa M. Chromosomal alterations in cell lines derived from mouse rhabdomyosarcomas induced by crystalline nickel sulfide. *Biol. Metals* 1988; 1: 43-45.
38. Patierno SR, Sugiyama M, Basilion JB y Costa M. Preferential DNA-protein cross-linking by NiCl₂ magnesium-insoluble regions of fractionated Chinese hamster ovary cell chromatin. *Cancer Research* 1985; 45: 5787-5794.
39. Baruthio F. Toxic effects of chromium and its compounds. *Biological Trace Element Research* 1991; 32: 145-153.
40. Howard W. Induction of chromosome changes by metal compounds in cultured CHO cells. *Toxicol Letters* 1991; 56: 179-186.
41. Elías Z, Poirot O, Pezerat H, Suquet H, Schneider O, Daniere M, Terzetti F, Baruthio F, Fournier M, Cavalier C. Cytotoxic and neoplastic transformation effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 1989; 10: 2043-2052.
42. Katz S y Salem H. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *Journal of Applied Toxicology* 1993; 13 (39): 217-224.
43. De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zancacchi P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutation Research* 1990; 238: 90-172.
44. Gao M, Binks S, Chipman J, Levy L, Braithwaite R y Brown S. Induction of DNA strand breaks in peripheral lymphocytes by soluble chromium compounds. *Human and Experimental Toxicology* 1992; 11: 77-82.
45. Gao M, Binks S, Chipman S y Levy L. Hexavalent chromium produces DNA strand breakage but not unscheduled DNA synthesis at sub-cytotoxic concentrations in hepatocytes. *Toxicology* 1993; 77: 171-180.
46. Sora S, Agosti Carbone ML, Pacciarini M, Magni G. Disomic and diploid meiotic products induced in *Saccharomyces cerevisiae* by the salts of 27 elements. *Mutagenesis* 1996; 1: 21-28.
47. Biederman K, Landolph J. Role of valence state and solubility of chromium compounds on induction of cytotoxicity, mutagenesis and anchorage independence in diploid human fibroblasts. *Cancer Research* 1990; 50:7835-7842.
48. Petrilli F y De Flora S. Interpretation on chromium mutagenicity and carcinogenicity. *Mutagens in our environment*. Alan R. Liss, New York 1982; pp. 453-464.
49. Venier P, Montaldi A, Majone F, Bianchi V y Levis A. Cytotoxic, mutagenic and clastogenic effects of industrial chromium compounds. *Carcinogenesis* 1982; 3 (11): 1331-1338.
50. Chorvatovicova D, Ginter E, Kosinova A y Zloch Z. Effects of vitamins C and E on toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in rat guinea pig. *Mutation Research* 1991; 262: 41-46.
51. Tsuda H, y Kato K. Chromosomal aberrations and morphological transformation in hamster embryonic cells treated with potassium dichromate in vitro. *Mutation Research* 1977; 46: 87-94.
52. Coutiño E. Determinación del daño genético mediante análisis de anafases en células de mamíferos. *Manual de métodos para identificación de mutágenos y carcinógenos químicos ambientales* 1980; pp.119-132.
53. Hsu T, Collie C, Lusby A y Johnston D. Cytogenetic assays of chemical clastogens using mammalian cells in culture. *Mutation Research* 1977; 45: 233-247.
54. Mc Gill M, Pathak S y Hsu T. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickness. *Chromosoma* 1974; 47: 157-167.
55. Nichols W, Moorhead P y Brewen G. Chromosome methodologies in mutation testing. Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen Society and the Institute for Medical Research. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1972; 22: 269-275.
56. Dulout F y Olivero O. Anaphase-telophase analyses of chromosomal damage induced by chemicals. *Environmental Mutagenesis* 1984; 6: 299-310.
57. Sokal R y Rohlf F. *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. Madrid, H. Blume eds. 1979.
58. Beyersman D. Interactions in metal carcinogenicity. *Toxicology Letters* 1984; 72 (1-3): 333-338.
59. Lanfranchi G, Paglialunga S y Levis L. Mammalian cell transformation induced by chromium (VI) compound in the presence of nitrilotriacetic acid. *Journal of Toxicol Environ Health* 1988; 24: 251-260.
60. Hartwig A y Beyersmann S. Enhancement of UV-induced mutagenesis and sister-chromatid exchanges by nickel ions in V79 cells: evidence for inhibition of DNA repair. *Mutation Research* 1989; 217: 65-73.
61. Ford J y Correl A. Chromosome errors at mitotic anaphase. *Genome* 1991; 35: 702-705.
62. Voutsinas G, Zarani F y Kappas A. The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. *Cell Biol Int* 1997; 21(7): 411-418.
63. Li W, Zhao Y and Chou I. Cytoskeletal injury induced by hexavalent chromate. *Toxicology in vitro* 1992; 6 (5): 433-444.

HERPESVIRUS BOVINOS 1 y 5

C. L. Pidone¹, C. M. Galosi^{2,3}, M. E. Etcheverrigaray³

¹Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de Rosario

²Investigador Adjunto de CIC Provincia de Buenos Aires

³Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: los virus herpes bovino 1 y 5 (BHV-1 y 5) afectan naturalmente al bovino, especie en la que provocan diversas manifestaciones clínicas: rinotraqueítis, vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis (IPB), conjuntivitis, aborto y encefalitis. La distribución de la infección es mundial, con incidencias que varían de un país a otro. En los últimos años se han conformado importantes grupos de investigación y los conocimientos acerca de estos virus se han visto incrementados. El presente trabajo es una revisión que actualiza dichos conocimientos y señala aquellas líneas de investigación de relevancia en la actualidad.

Palabras Clave: herpesvirus bovino 1, herpesvirus bovino 5

BOVINE HERPESVIRUS 1 AND 5

ABSTRACT: Bovine herpesvirus 1 and 5 (BHV-1 and 5) affect naturally to cattle, in which they cause a variety of clinical entities: rinotracheitis, infectious pustular vulvovaginitis (IPV), balanoposthitis (IPB), conjunctivitis, abortion and encephalitis. The distribution of the infection is worldwide, and the incidence vary from a country to another. Recently, it has been conformed important investigation groups around the world and the knowledge about these virus has been increased. The present work is a review that modernizes this knowledge and it points out those lines of investigation of relevance at the present time.

Key Words: bovine herpesvirus 1, bovine herpesvirus 5

Fecha de recepción: 08/06/99

Fecha de aceptación: 02/09/99

Dirección para correspondencia:

C. L. Pidone, Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias. Av. Ovidio Lagos y Ruta 33 Casilda (S2170), Santa Fe, Argentina. Tel/Fax: (03464) 422050

E-mail: cpidone@fveter.unr.edu.ar

*Parte del presente trabajo corresponde a la Tesis «Estudio comparativo de cepas de virus herpes bovino-1 aisladas en la Argentina mediante patrones de restricción de ADN» (Pidone, C.L. Maestría en Salud Animal, Universidad de Buenos Aires, 1995).

INTRODUCCIÓN

El Herpesvirus bovino 1 (BHV-1), integrante de la familia Herpesviridae, afecta naturalmente al bovino, especie en la que provoca un amplio espectro de manifestaciones: rinotraqueítis (IBR), vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis (IPB), conjuntivitis, aborto, enteritis y encefalitis.

La distribución de la infección es mundial y la prevalencia de reactores serológicos indica que prácticamente todos los bovinos mayores de tres años estuvieron en contacto con el virus. Se han registrado brotes de la forma respiratoria en EE.UU. y Canadá; la IPV es común en Europa y se notificaron importantes brotes de meningoencefalitis en Argentina y Australia (1), en EE.UU. (2), Canadá, Siria, Hungría, Uruguay, Italia y Brasil (3).

En Argentina, durante los años 1980-1982, un estudio demostró que BHV-1 se encuentra difundido en todo el país, con índices de prevalencia entre 36 y 66 %. También indicó que no existen diferencias significativas entre el ganado lechero y el de carne y que los índices de prevalencia aumentan progresivamente conforme aumenta la edad de los animales (1), hecho éste último que se repite en otros lugares del mundo (4).

Las epizootias clínicamente manifiestas como meningoencefalitis registradas en Australia por French en 1962 (5) y en California por Barenfus y col. (6) aproximadamente en igual período son las primeras descritas atribuidas a este agente. Posteriormente se notificó de casos clínicos en la Argentina a partir de 1980 (7).

En relación a otros datos estadísticos, Blood y col describen para la IBR una morbilidad del 20-30 %, con una tasa de letalidad usual del 1 % (8, 9). En Argentina, en tanto, la edad de los animales con enfermedad nerviosa varía entre los 5 y 8 meses y, si bien es variable, se describe un brote con un 15 % de mortalidad (7).

A partir de los datos expuestos, es fácil comprender por qué el BHV-1 es uno de los miembros de la familia Herpesviridae de mayor interés en Medicina Veterinaria.

HERPESVIRUS BOVINOS 1 Y 5

Clasificación

El BHV-1 pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae*, género *Variellovirus* (10). Las distintas variantes antigénicas del BHV-1 no pueden ser distinguidas por métodos serológicos convencionales (virusneutralización). Sin embargo, han podido demostrarse diferencias entre polipéptidos y glicoproteínas por técnicas tales como la electroforesis en geles de poliacrilamida (7, 11), el estudio de

la reactividad de paneles de anticuerpos monoclonales (11) y el análisis de restricción del ADN viral (11, 12). Con esta información ha sido posible clasificar al BHV-1 en tres subtipos: BHV-1.1, BHV-1.2 y BHV-1.3, los cuales se asocian con IBR, IPV/IPB y enfermedad neurológica (encefalitis) respectivamente (13, 14). Este último subtipo (BHV-1.3), en base a estudios bioquímicos y genéticos, entre otros, actualmente se ha reclasificado y se denomina Herpesvirus bovino tipo 5 (BHV-5) (10, 15, 16). Sin embargo, esta clasificación de las cepas no refleja estrictamente un determinado organotropismo o cierto grado de virulencia (17).

El BHV-1.2 puede a su vez subdividirse en los subtipos BHV-1.2a y 2b en base a la digestión con enzimas de restricción y el perfil proteico. También el BHV-5 presenta una similar subdivisión: a y b (cepas N569 y A663 respectivamente), en base al comportamiento electroforético subtipo-específico de al menos una glicoproteína.

El estudio con anticuerpos monoclonales marca notorias diferencias entre los tipos 1 y 5 (3, 11). En este sentido, resultados obtenidos *in vitro* por cinética de neutralización mostraron que BHV-1.1 y BHV-1.2 tienen muchas semejanzas antigénicas, mientras que las diferencias que existen con la cepa nerviosa A663 (BHV-5) son significativas. A pesar de estas diferencias entre BHV-1.1 y BHV-5, la protección *in vivo* no se altera ante el desafío con el tipo nervioso (13).

En la actualidad, se clasifica al BHV-5 como integrante de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* y no tiene género asignado (10).

Estructura del ADN: el genoma

La doble cadena lineal del genoma del BHV-1 posee aproximadamente de 135.000 a 140.000 pares de bases (pb). Alrededor del 10 % del ADN viral transporta en el extremo terminal derecho una «cola» de ADN celular, lo que indicaría que el ADN del BHV-1 puede recombinarse frecuentemente con el ADN de la célula (18). Engels y col estimaron un 85 % de similitud entre los BHV-1 y BHV-5 (17) y Seal y col estimaron más del 95 % de similitud entre los BHV-1.1 y 1.2 (19).

No se ha observado correlación entre el patrón de restricción enzimática y las manifestaciones clínicas (12, 17, 19, 20). Misra y col por esta razón sugieren que el tipo de enfermedad causada por el virus puede ser determinado más por la ruta de infección y las prácticas de manejo que por propiedades inherentes de ciertos tipos de BHV. House (1972), en esta línea, encontró que aislamientos genitales pueden causar infecciones respiratorias y viceversa (20).

Proteínas virales

Entre las más de 43-48 proteínas específicas virales se encuentran las glicoproteínas de la envoltura. Actualmente se acepta que el genoma del BHV-1 codifica para 4 glicoproteínas o complejos glicoproteicos principales, designados gI (gB), gII (gE), gIII (gC) y gIV (gD), algunos de los cuales presentan importante homología con sus pares del virus Herpes simplex (HSV) y del virus de la Pseudorrabia Porcina (PRV) (21).

La gIV (gD) es la glicoproteína más importante involucrada en la neutralización (18). Aparentemente es esta glicoproteína la responsable de la penetración del virus en la célula huésped (22) y también se le atribuye participación en la adsorción viral y la fusión celular (23). Por su parte gIII (gC) participa como responsable de la unión inicial del virus a receptores similares a la heparina sobre la superficie de las células permisivas (24) y la gI (gB) interferiría con proteínas celulares responsables de efectos citopáticos (ECP) ocasionados por la infección con el BHV-1 (25).

LATENCIA

Una vez que el BHV-1 ingresa al organismo y se multiplica en el sitio de infección se desplaza a través de prolongaciones nerviosas hacia los ganglios trigémino y sacro, en donde permanece en un estado latente. Esta ubicación del virus fue demostrada usando la técnica de hibridación *in situ* con sondas radioactivas (1, 18) y, en un trabajo experimental, con la inmunofluorescencia específica (26). Por otra parte, otros autores informan haber aislado el BHV-1 a partir de muestras de ganglio trigémino provenientes de bovinos adultos que no presentaban signos clínicos de enfermedad (27). Otros sitios en el organismo, como tejido epitelial y leucocitos, también se citan como lugares de acantonamiento viral (28).

La reactivación del virus puede ocurrir o ser inducida por estímulos naturales o artificiales, como ser: parto, transporte, tratamientos inmunosupresores con corticoides, superinfección con otros virus o microorganismos, irradiación ultravioleta, tratamiento con ciclofosfamida, etc. La reactivación inducida por los glucocorticoides (dexametasona) se origina como consecuencia de un mecanismo indirecto vía supresión de funciones de neutrófilos y linfocitos, según indicarían experimentos *in vitro*. Generalmente no se presentan signos clínicos durante la reexcreción de virus latente (18).

La latencia en los alfa herpesvirus involucra el mantenimiento del ADN viral en forma extracromosomal, típicamente en las neuronas de los ganglios sensoriales (trigémino y sacro) (16, 29). En contraste con los 70 u 80 genes virales que se expresan durante una infección

lítica de células bovinas, la expresión de estos genes disminuye drásticamente durante la latencia. Sólo una pequeña región del genoma es activamente transcripta en las neuronas infectadas por virus latente, región denominada «gen relacionado a la latencia (LR)». Los transcriptos originados del gen LR se acumulan en el núcleo de las células neuronales sensoriales. Factores específicos neuronales y genes tempranos inmediatos del BHV-1 regulan positivamente la expresión del gen LR (30).

La principal función de los mecanismos de inmunidad en este tema está relacionada a la recrudescencia de la infección. Animales con niveles bajos de inmunidad específica muestran signos clínicos más severos y excretan mayores niveles de virus luego de la reactivación (18).

La latencia es una de las características principales que condicionan la patogenia del BHV.

PATOGENIA

Una vez en el organismo el virus replica en el sitio de inoculación para luego diseminarse por medio de la sangre, el sistema nervioso o a través de puentes intercelulares y así alcanzar los órganos blanco. En el sistema nervioso periférico el virus avanza sin estar expuesto a la actividad neutralizante de los anticuerpos, igual que cuando lo hace por medio de los puentes intercelulares (18). Algunos autores sugieren que los virus son transportados por los leucocitos (8).

A nivel respiratorio, el virus destruye el epitelio del tracto superior lo que, sumado a la inmunosupresión que provoca en el organismo, favorece el asentamiento de infecciones bacterianas secundarias. Entre otros factores, el BHV-1 inhibe la migración de polimorfonucleares neutrófilos, la citotoxicidad mediada por células y la respuesta mitótica de los linfocitos sanguíneos periféricos, como así también algunas actividades funcionales del macrófago alveolar (18).

IPV/IPB es una típica enfermedad venérea en donde BHV-1 alcanza directamente las células blanco, que son las células de las mucosas de la vulva, vagina y prepucio (18).

En relación al tema del aborto, existen datos experimentales y de campo que sugieren que el virus permanece latente en la placenta, y cuando pasa al feto, si lo infecta, produce lesiones necróticas diseminadas. Bajo ciertas circunstancias aún no determinadas, según esta hipótesis, el virus se reactivaría, invadiría el feto y ocasionaría su muerte (31).

En el caso de las meningoencefalitis, el virus llega al cerebro a través de las ramas maxilar y mandibular del nervio trigémino (18) o bien puede hacerlo a través de los bulbos ol-

fatorios y/o de las meninges a partir del hueso etmoides (32).

Las cepas N569 y A663 (BHV-5) han demostrado causar encefalitis experimentalmente, mientras en circunstancias similares los tipos respiratorio y genital (BHV-1.1/2) no pueden hacerlo (1, 7, 11). El Sistema Nervioso Central (SNC) del bovino posee receptores para todas las variantes del BHV-1 estudiadas, no solo para la cepa nerviosa (33). Sin embargo, un estudio reciente comprobó diferencias entre los BHV 1 y 5 en el gen IE1 y en los genes que codifican las proteínas bTIF y VP8, lo cual podría explicar el tropismo diferencial que caracteriza a estas cepas (34).

Experimentalmente se comprobó que, inoculado por vía intranasal a terneros, el BHV-5 afecta fundamentalmente al sistema nervioso y el BHV-1.1 sólo al aparato respiratorio; y que estos animales se infectan pero no desarrollan enfermedad si están protegidos con calostro con anticuerpos neutralizantes (35).

Las características propias de las cepas y la puerta de entrada al organismo dan como resultado los diferentes signos clínicos y patológicos.

SIGNOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS

BHV-1 y BHV-5 pueden originar 3 diferentes cuadros clínicos:

a) Enfermedad respiratoria - Aborto:

La IBR es una enfermedad contagiosa y aguda de los bovinos caracterizada por fiebre (40.5-42 °C) y depresión general, descenso en la producción láctea y emaciación. La virosis afecta el tracto respiratorio superior y las lesiones patológicas suelen describirse como rinitis aguda, faringitis y laringotraqueobronquitis. Luego puede complicarse con una invasión bacteriana secundaria y derivar en una bronconeumonía (8, 18). La histopatología puede revelar la presencia de cuerpos de inclusión, pero éstos no son constantes (18).

Algunos animales con IBR desarrollan también una conjuntivitis uni o bilateral (18), que puede confundirse fácilmente con queratoconjuntivitis causada por *Moraxella bovis* (9). Cuando en el rodeo existen vacas preñadas, la enfermedad puede incluir abortos luego de una incubación de 3 a 6 semanas, principalmente entre el 5° y el 8° mes de preñez (18). Los fetos abortados presentan autólisis, coloración parduzca, tejidos friables y fluidos en las cavidades corporales como hallazgos característicos (36).

b) Enfermedad genital:

Un segundo síndrome causado por BHV-

1 es la IPV en las hembras o la IPB en los machos, que se caracteriza, en el primero de los casos, por una vulva edematosa e hiperémica en donde se observan pequeñas pústulas diseminadas sobre la superficie mucosa, acompañadas a veces con una descarga vaginal mucopurulenta, pues la invasión bacteriana secundaria es una secuela frecuente. La fase aguda de la enfermedad dura 2-4 días y las lesiones desaparecen 10-14 días después (18). En los toros, la sintomatología clínica incluye también el área genital en la forma de inflamación de pene y prepucio (28).

c) Enfermedad nerviosa:

Los signos neurológicos se caracterizan por depresión, anorexia, ptialismo, amaurosis, rechimiento de dientes, incoordinación, temblor muscular, ceguera y eventualmente muerte (18). Muchos de los casos tienen un diagnóstico presuntivo de poliencefalomalasia.

La encefalitis usualmente ocurre sin otros signos clínicos de enfermedad por BHV-1 (37).

Aunque los episodios de meningoencefalitis fatal en bovinos jóvenes ya descritos y acaecidos en Australia y Argentina se han asociado al BHV-5, Ludwig (1983), Seal y col. (1985) y d'Offay y col. (1993), todos en América del Norte, encontraron que aislamientos provenientes de animales con signos nerviosos, analizados con enzimas de restricción, tenían un patrón de migración similar al del BHV-1.1 (2). Los hallazgos patológicos en el SNC fueron similares en todos los casos: encefalitis acompañada por marcadas áreas de malasia y leptomeningitis no purulenta. Se observan delgados manguitos perivasculares, gliosis difusa y nodular y citonecrosis.

También se han descrito casos de mastitis, enteritis, metritis, dermatitis, tonsilitis (18) e infecciones sistémicas en animales jóvenes (9) causados por el BHV-1.

El tipo de respuesta inmune desencadenada en el huésped dependerá, en gran medida, de la enfermedad provocada por el Herpesvirus bovino (BHV).

RESPUESTA INMUNE

a) Respuesta inmune inespecífica

El interferón (IFN) tipo 1 aparece tanto en secreciones nasales como vaginales en el bovino expuesto a la infección con BHV-1. Su producción inmediata puede ser importante para la rápida protección local en estadios tempranos de la infección. El BHV-1 es un inductor de IFN muy eficaz, pero no es tan susceptible a él como lo son muchos otros virus (38). Las células NK también incrementan su número luego de la infección por BHV-1. Finalmente, se sabe que *in vitro* el BHV-1 altera la capacidad fun-

cional del macrófago alveolar bovino (18).

b) Respuesta inmune específica

Los anticuerpos neutralizantes, dirigidos contra las glicoproteínas de la envoltura, probablemente tengan importancia en la inmunidad a largo plazo (16). Sin embargo, el papel de los anticuerpos humorales es cuestionable en relación a la prevención de la diseminación del virus, fundamentalmente porque, al igual que otros herpesvirus, el BHV-1 puede escapar de la acción de éstos debido a su progreso a través de puentes intercelulares y dentro de ramas nerviosas. La detección de anticuerpos es posible por medio de la virusneutralización a los 8-12 días pos infección (pi) y persisten 5 años y medio, aunque esta persistencia requiere alguna reestimulación. La actividad neutralizante puede ser también detectada en secreciones nasales y genitales debido a la presencia de inmunoglobulina A (IgA) (18).

Los bovinos recién nacidos se proveen de anticuerpos vía calostro principalmente en las primeras 12 h pos parto (fundamentalmente IgG1) y, si bien no producen una protección absoluta, disminuyen la agresividad de la infección.

La lisis mediada por anticuerpo-complemento participa tempranamente en la infección y puede también ser importante en la fase tardía de recuperación o durante la recrudescencia de infecciones latentes. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y ADCC facilitada por complemento (ADCC-C) participan también en este proceso. Estos mecanismos son efectivos *in vitro*, pero su funcionalidad *in vivo* aún es especulativa (18).

c) Inmunidad mediada por células (IMC) e inmunoreguladores

La recuperación de las infecciones en donde hay diseminación intercelular del virus está particularmente basada en la IMC, siendo gIV (gD) quien estimula una mayor respuesta. La eliminación de virus depende en gran proporción de los factores mediadores solubles producidos por los linfocitos sensibilizados, tanto las interleuquinas como los IFNs, la linfotóxina, el factor quimiotáctico y las prostaglandinas (18).

Las características propias del BHV impiden que el sistema inmune lo elimine por completo del organismo, hecho que juega un papel fundamental en la epizootiología de esta enfermedad.

EPIZOOTIOLOGÍA

El BHV-1 se transmite fácilmente en forma directa de un animal a otro, pues gran cantidad de virus se disemina principalmente por

secreciones respiratorias, oculares y reproductivas de animales infectados (18), pero también puede hacerlo en forma indirecta, a través de personas o equipos (28). El período de incubación varía entre 2 y 6 días, pues depende de la dosis, ruta de inoculación y otros factores (36). Aunque se acepta que, para el caso de la IBR, el virus se disemina en las secreciones nasales por aproximadamente 12-14 días pi (8), se ha recuperado el virus en forma intermitente por un período de hasta 578 días (29).

Otras fuentes importantes de diseminación son el semen (18) y la transferencia embrionaria (39). Se ha podido comprobar que toros serológicamente positivos sin sintomatología son portadores del virus, el que se ha logrado aislar de muestras de semen congelado (40, 41), incluso 12 meses después de su almacenamiento a -196° C (9). Sin embargo, el riesgo de transmisión de BHV-1 en hembras fertilizadas con semen de toros seropositivos proveniente de centros de inseminación artificial no se considera muy alto, y el tratamiento del semen infectado -con gammaglobulinas de suero hiperinmune (42) o con una solución de tripsina (Bielanski y col., 1988)- puede reducir el riesgo de transmisión de BHV-1 en la inseminación artificial.

El bovino es el principal reservorio del BHV-1; sin embargo, muchas especies de ruminantes -caprinos, ovinos, etc.-, e incluso el cerdo, son susceptibles a este virus (18). El conejo, por su parte, es la especie que actualmente se estudia como modelo experimental (43).

El diagnóstico con técnicas de avanzada permitirá, en el futuro, conocer con mayor precisión la epidemiología de esta enfermedad.

DIAGNÓSTICO

a) Aislamiento viral:

Esta técnica se realiza en cultivos celulares, identificándose luego al agente por medio de otras técnicas inmunológicas (18).

b) Microscopía electrónica:

Es una buena alternativa para el diagnóstico rápido, pero necesita de confirmación por microscopía inmunoelectrónica (18).

c) Inmunofluorescencia:

Es una técnica muy empleada (1), cuya principal ventaja es la rapidez del diagnóstico, el cual no necesita posterior caracterización viral. Puede, en desventaja, ser algo menos sensible que el aislamiento (18).

d) Inmunohistoquímica:

Estos procedimientos, fundamentalmente empleando anticuerpos monoclonales, han probado ser tanto o más sensibles que las técnicas convencionales (como el aislamiento viral) y reúnen algunas ventajas en su haber, como rapidez en el diagnóstico y el no requeri-

miento de cultivos celulares (44).

e) *Hibridización de ácidos nucleicos:*

Esta técnica ha sido investigada por Giavedoni y col., y demostró ser específica y altamente sensible (44).

f) *Hemoaglutinación pasiva (HAP):*

Esta prueba evita la utilización de cultivos celulares y permite una rápida ejecución (45). Sin embargo, es importante mencionar que con esta técnica existen problemas de especificidad y por eso son más aconsejables las pruebas inmunológicas.

g) *ELISA:*

Es una técnica que ha reemplazado rápidamente a las demás pruebas serológicas, debido a que prescinde del uso de cultivo celular y a que ha demostrado ser sensible, rápida y económica. Se ha informado del estudio de muchas variantes de esta técnica, que incluyen: ELISA competitivo, ELISA «sandwich» y el desarrollo de un ELISA para detección de antígenos en muestras de leche (18). También se ha desarrollado experimentalmente un «ELISA blocking» que permite distinguir animales infectados de otros inmunizados con una cepa mutante gIII (gC) negativa; el desarrollo de una prueba de estas características facilitaría la implementación de un programa de control/erradicación (46).

La estandarización de la técnica es fundamental y se disponen de «kits» comerciales ya estandarizados (18); sin embargo, se comprobaron diferencias de sensibilidad entre ellos (47).

h) *Virusneutralización:*

Es la técnica más comúnmente utilizada para la detección de anticuerpos específicos a BHV-1 a lo largo del tiempo (18).

i) *PCR (reacción en cadena de la polimerasa):*

Vilcek y col. comunican el desarrollo de una prueba de este tipo para la detección de BHV-1, basada en la utilización de «primers» que reconocen al gen que codifica a la glicoproteína I (gB). Esta prueba fue capaz de detectar el virus a partir de muestras clínicas, suero fetal bovino contaminado y muestras de semen (48). Otros investigadores obtuvieron también óptimos resultados empleando «primers» de la región genética codificante de la timidina quinasa (Tk), y la prueba mostró ser de valor para la detección del BHV-1 en cultivos celulares (49). Distintos autores concluyen que la prueba de PCR es al menos tan sensible como el aislamiento viral y es una práctica alternativa interesante para la detección rápida del BHV-1 (48, 50). Estos estudios continúan en la actualidad e incluso se ensayan para diferenciar el BHV-1 del BHV-5 (51, 52).

j) *Análisis con enzimas de restricción (REA):*

El estudio con enzimas de restricción del

BHV-1 ha sido extensamente utilizado como técnica diagnóstica, dado que la estabilidad de los genomas del BHV-1 permanece sin afectarse por pasajes *in vitro* en células huésped homólogas o por latencia (17). Sin embargo, Whetstone y col. comprobaron cambios en el genoma de una cepa vacunal de BHV-1 (virus vivo modificado) luego de un pasaje *in vivo*, al recuperarse el virus durante la infección aguda, luego de la reactivación de la latencia y pos superinfección (53).

El desarrollo de estas y otras posibles técnicas de diagnóstico es fundamental para lograr la prevención, el control y la erradicación de esta enfermedad.

PREVENCIÓN, CONTROL Y ERRADICACIÓN

Una de las principales diferencias para el control de esta enfermedad es que los animales infectados transportan al virus de por vida, ya que el BHV permanece integrado por un período indefinido en células preferenciales (28).

En primer lugar es necesario definir la decisión de controlar la enfermedad clínica o eliminar la infección. La vacunación protege contra la primera pero no contra la segunda. Si se decide vacunar se debe considerar que la vacunación no previene la superinfección con cepas de campo, el estado inmunitario que provee una vacuna influye en la reexcreción de virus latente, la posibilidad de eventos tales como recombinación entre cepa vacunal y de campo y la reversión a cepa virulenta no puede ser excluida, y salvo que existan marcadores específicos en las cepas vacunales o diferentes patrones de restricción de ADN, los anticuerpos resultantes de la vacuna no permiten la utilización de análisis serológicos que diferencien cepas vacunales de cepas de campo en los programas de control y erradicación.

MEDIDAS DE CONTROL

1) Inmunización activa con vacuna viva atenuada, 2) Inmunización activa con vacuna inactivada, 3) Inmunización activa con vacuna polivalente, 4) Inmunización pasiva, vía la administración de calostro, suero inmune o preparaciones de gammaglobulinas y 5) Quimioterapia con drogas inhibitoras de la síntesis de macromoléculas, de la replicación viral, del ADN o de la síntesis proteica (28).

Vacunas

Desde hace ya mucho tiempo existen comercialmente vacunas convencionales contra este virus y se utilizan en muchos países en sus distintas variantes: a virus vivo modificado o inactivado, mono o polivalente. Dependiendo de la capacidad del producto de inducir inmunogenicidad, la vacuna puede ser efectiva en

reducir las manifestaciones clínicas y en consecuencia las pérdidas económicas, pero no logra proteger completamente de la infección.

Las vacunas vivas modificadas producidas a partir de virus de la IBR son también efectivas contra IPV/IPB y viceversa. Aquellas producidas con virus de la IPV/IPB eventualmente no son abortigénicas (18).

a) Vacunas vivas modificadas para aplicación parenteral

Las ventajas más importantes de este tipo de vacunas son su forma de administración y la posibilidad de realizar combinaciones con otros virus (18). La necesidad de revacunación está sujeta a opiniones diversas, pues se ha comprobado que la duración de la inmunidad pos vacunación intramuscular (IM) persiste de 3 a 6 años, y ocurre algo similar pi con virus de campo (36).

Su empleo también tiene sus desventajas. La principal de ellas es la imposibilidad de aplicarlas a vacas preñadas, dado el peligro de aborto (18, 31, 36). También se ha informado de la aparición de enfermedad en animales inoculados con vacunas atenuadas, lo que en definitiva obliga a evaluar su uso al momento de proponerla como potencial vacuna (32, 54).

b) Vacunas vivas modificadas para aplicación intranasal

Estas vacunas confieren una rápida protección local sin generalización del virus. La gran ventaja de este tipo de vacunas, comparada con aquellas de aplicación parenteral, es su seguridad para las hembras preñadas (18, 31). El empleo de mutantes termosensibles (Ts) como cepa vacunal es aún más ventajoso, pues esta característica garantiza la replicación estrictamente local y permite que las cepas vacunales puedan ser distinguidas de las cepas de campo gracias al marcador Ts (18).

Sin embargo, las vacunas vivas modificadas para aplicación intranasal también tienen sus desventajas, relacionadas principalmente con la impracticidad de la vía de administración, la transmisión de virus vacunal a animales no inmunizados y algunas posibles reacciones adversas, como fiebre o descenso temporario de la producción láctea (18). Se han descrito signos neurológicos en bovinos jóvenes 7-10 días después de una segunda vacunación por vía intranasal de una vacuna polivalente (32) y Nettleton y col (1984) demostraron que la recombinación entre una cepa vacunal mutante Ts y una cepa de campo puede ocurrir (18).

c) Vacunas vivas modificadas producidas por ingeniería genética

Estudios realizados confirmaron que la

vacunación de bovinos (incluso hembras preñadas) con una cepa de BHV-1 mutante Tk negativa protegía contra el aborto, reducía los signos clínicos y la diseminación viral después del desafío (18, 31), sin provocar efectos deletéreos significativos (55). Otros autores demostraron que las mutantes con delección del gen de la glicoproteína E (gE) son buenas candidatas como vacuna viva modificada (56, 57). Estas vacunas pueden ser distinguidas de las cepas de campo, pero el problema concerniente al establecimiento de latencia por la vacuna o el virus salvaje no ha sido resuelto (18).

d) Vacunas inactivadas

Se han producido vacunas de este tipo con tratamientos con formalina, etanol o etilnamina y por inactivación con calor o luz UV; pero no son eficientes sin adyuvante. Las ventajas de estos productos radica en el hecho que no provocan aborto ni diseminación viral luego de la vacunación y el establecimiento de infección latente por la cepa vacunal es imposible, además de permitir la fabricación de vacunas múltiples, pues no hay interferencia con la producción de anticuerpos contra otro antígeno. Son perfectamente toleradas y, a pesar que la eficacia de estas vacunas está sujeta a controversia (18, 58), según algunos resultados concretos serían efectivas para el control de la infección con BHV-1 (1).

Las desventajas que presentan, por su parte, incluyen la observación de reacciones de hipersensibilidad que pueden ser fatales (anafilaxia), urticaria, nódulos en la piel y fiebre luego de la vacunación. También es imposible diferenciar animales infectados de vacunados.

La duración de la protección alcanzada con la administración de estos productos es desconocida, pero en todos los casos son necesarios dos ciclos de vacunación y revacunaciones anuales (18, 36).

e) Vacunas a subunidades

Los problemas concernientes a las vacunas vivas modificadas y las vacunas inactivadas impulsaron la producción de vacunas que contienen sólo determinados componentes virales inmunogénicos (18). Este tipo de productos tiene las siguientes ventajas: no contiene virus vivo y por lo tanto no puede ser transmitido a otros animales, causar aborto o establecer infección latente; podría, previo empleo de pruebas serológicas, permitir la diferenciación de animales vacunados de no vacunados; y sería posible su aplicación a animales jóvenes aún en presencia de anticuerpos calostrales (58).

En cuanto a la fabricación de recombinantes, se han logrado productos de este tipo en células de mamífero e insecto, incorporando

a ellas una determinada secuencia codificante del virus (23, 59).

f) Vacunación en presencia de anticuerpos calostrales

La duración de la inmunidad calostrual varía de 1 a 6 meses y depende del nivel inicial de anticuerpos que se transfiere al ternero (9). Como los anticuerpos maternos pueden interferir con la producción activa de anticuerpos luego de la vacunación, es necesaria una revacunación luego de los seis meses de edad. El valor de la protección producida por los anticuerpos maternos es, sin embargo, motivo de controversia (18, 36).

Durante una epizootia, la administración de calostro con niveles adecuados de anticuerpos neutralizantes del BHV-1 a animales recién nacidos puede ser un procedimiento recomendable, mientras que la vacunación con virus de la IBR vivo modificado por vía IM a esos mismos animales que reciben un nivel de anticuerpos calostrales desconocido puede resultar en pérdidas innecesarias de terneros (54).

TRATAMIENTOS

En la rinotraqueítis la terapia debe estar dirigida a controlar las complicaciones bacterianas y/o fúngicas, y para ello se emplean antibióticos de amplio espectro (9, 36). La IPV/IPB puede ser tratada localmente con antisépticos o con ungüentos de penicilina-estreptomina (36).

Drogas antivirales: muchas de ellas, efectivas *in vitro*, no lo son a dosis atóxicas *in vivo*. El uso de IFN, por su parte, se dificulta dado su costo económico (18).

ERRADICACIÓN

Según autores europeos, sólo olvidando para siempre la vacunación se puede pensar en erradicar la enfermedad. Para mantener el «status» de libre es absolutamente esencial adoptar medidas higiénicas, tales como supervisión de los movimientos de los animales, cuarentena (28) y análisis serológicos anuales con eliminación de los animales seropositivos (60).

Sin embargo, en países con alta incidencia de la infección es imposible pensar en no vacunar. En estos casos, las vacunas inactivadas comercialmente disponibles logran controlar la enfermedad; la erradicación con vacunación sería factible con la llegada de vacunas a subunidades como las previamente descritas, que nos permitirían distinguir animales vacunados de infectados.

Es importante que recordemos que la vacunación no prevé la reactivación en casos en donde el balance nutricional y la inmunidad están alterados. Se admite que la inmunidad vacunal protege contra la reinfección con la cepa virulenta de campo pero no contra la reactivación de una infección latente en el mismo animal (28).

Consideramos necesario desarrollar en el futuro estudios epidemiológicos, clínicos y patológicos que ayuden a comprender el comportamiento y distribución de los BHV-1 y BHV-5. Esta información permitirá, profilaxis mediante, controlar las enfermedades que a ellos se asocian y que tanto perjuicio causan a la producción bovina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schudel AA, Rodríguez M y Carrillo BJ. Biotecnología en el diagnóstico, caracterización y prevención de la encefalitis bovina a BHV-1. CICV - INTA - Castelar, 1987.
2. d'Offay JM, Mock RE, Fulton RW. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am J Vet Res* 1993; 54, 4: 534-539.
3. Suárez Heinlein A, Metzler AE, Weiblen R, Berrios P, Schudel AA and Rodríguez M. Molecular Characterization of South American Bovine Herpesvirus-1 Isolates with Monoclonal Antibodies and SDS-Page. *J Vet Med B*. 1993; 40: 125-130.
4. Hochstein-Mintzel V, Riedemann S, Reinhardt G, Niedda M. Rinotraqueítis Infecciosa Bovina. Relación entre títulos de anticuerpos y dos índices reproductivos en un plantel lechero. *J Vet Med B*. 1986; 33:697-703.
5. Studdert MJ. Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet Rec* 1989; 125, 58 ll:584.
6. Mc Kercher DG Bibrack B, Richards WPC. Effects of the Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus on the Central Nervous System of Cattle. *JAVMA* 1970; 156, 10:1460-1467.
7. Schudel AA, Carrillo BJ, Wyler R and Metzler AE. Infectious of Calves with Antigenic Variants of Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) and Neurological Disease. *J Vet Med B* 1986; 33: 303-310.
8. Yates WDG. A Review of Infectious Bovine Rhinotracheitis, Shipping Fever Pneumonia and Viral-Bacterial Synergism in Respiratory Disease of Cattle. *Can J comp Med* 1982; 46: 225-263.
9. Blood DC, Radostits OM, Henderson JA. Rinotraqueítis bovina infecciosa (nariz roja) (RIB). En: *Medicina Veterinaria*. Nva. 6º ed. Editorial Interamericana. México, D.F. 1988: 873-879.
10. Büchen-Osmond C.. Alphabetical List of ICTV approved Virus Families and Genera. Created April, 1995. Ultima actualización: 8 de abril de 1998.
11. Metzler AE, Schudel AA and Engels M. Bovine Herpesvirus 1: Molecular and Antigenic Characteristics of Variants Viruses Isolated from Calves with Neurological Disease. *Arch Virol*. 1986; 87: 205-217.
12. Pidone CL. Tesis. Estudio comparativo de cepas de virus herpes bovino-1 aisladas en la Argentina mediante patrones de restricción de ADN. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias, 1995.
13. Bratanich AC, Sardi SI, Smitsaart EN and Schudel AA. Comparative Studies of BHV-1 Variants by *In vivo* - *In Vitro* Tests. *J Vet Med B*. 1991; 38: 41-48.
14. Collins JK, Ayers VK, Whetstone CA and van Drunen Littel-van den Hurk S. Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. *J of Gen Virol* 1993; 74: 1509-1517.
15. Seal BS, Whetstone CA. Immediate-Early Gene-Expression and Gene-Mapping Comparisons Among Isolates of Bovine Herpesvirus-1 and Herpesvirus-5. *Vet Microbiol* 1994; 38: 4:369-384.
16. Studdert MJ. Bovine herpesvirus. En: *Encyclopedia of Virology*. Edited by R.G. Webster and A. Granoff (Academic Press), Great Britain, 1994; 1: 155-158.
17. Engels M, Giuliani C, Wild P, Beck TM, Loepfe E and Wyler R. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to know BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Research* 1986; 6 [86/87]:57-73.
18. Wyler R, Engels M, Schwyzer M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). En: G. Wittman and Y. Becker (ed.), *Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs*. Developments in veterinary virology ser. Kluwer Academics Publishers, Boston, 1989: 1-72.
19. Seal BS, St. Jeor SC and Lee Taylor RE. Restriction Endonuclease Analysis of Bovine Herpesvirus 1 DNA and Nucleic Acid Homology between Isolates. *J gen Virol* 1985; 66: 2787-2792.
20. Misra V, Babiuk LA, and Darcel C le Q. Analysis of Bovine Herpes Virus-Type 1 Isolates by Restriction Endonuclease Fingerprinting. *Archives of Virology* 1983; 76: 341-354.
21. Liang X, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, Fitzpatrick DR; Zamb TJ. Bovine Herpesvirus 1 Attachment to Permissive Cells Is Mediated by Its Major Glycoproteins gI, gII, and gIV. *Journal of Virology* 1991; 65, 3: 1124-1132.
22. Chase CCL Letchworth GJ. Bovine Herpesvirus-1 GIV-Expressing Cells Resist Virus Penetration. *Journal of General Virology* 1994; 75: Part 1: 177-181.
23. van Drunen Littel-van den Hurk S, van Donkersgoed J, Kowalski J, van den Hurk JV, Harland R, Babiuk LA and Zamb TJ. A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine* 1994; 12, 14: 1295-1302.
24. Okazaki K, Matsuzaki T, Sugahara Y, Okada J, Hasebe M, Iwamura Y, Ohnishi M, Kanno T, Shimizu M, Honda E, Kono Y. BHV-1 Adsorption Is Mediated by the Interaction of Glycoprotein gIII with Heparinlike Moiety on the Cell Surface. *Virology* 1991; 181: 666-670.
25. Chase CCL, Carter-Allen K, and Letchworth GJ. The Effect of Bovine Herpesvirus Type 1 Glycoproteins gI and gIII on Herpesvirus Infections. *J Gen Virol* 1989; 70: 1561-1569.
26. Narita M, Inul S, Nanba K and Shinizu Y. Detection of Virus Particles in Trigeminal Ganglion cells in a Calf Recurrently Infected with Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Jpn J Vet Sci* 1983; 45 (5): 691-693.
27. Homan EJ, Easterday BC. Isolation of Bovine Herpesvirus-1 from Trigeminal Ganglia of Clinically Normal Cattle. *Am J Vet Res* 1980; .41, 8: 1212-1213.
28. Thielscher H and Huth F. IBR/IPV: Vaccination or Culling?. *Landbauforschung Völknerode* 1986; 36: 171-176.
29. Studdert MJ. A brief review of studies of bovine and equine herpesvirus. *Aust Vet J* 1989; 66, 12: 401-402.

30. Bratanich AC, Jones CJ. Localization of cis-Acting Sequences in the Latency-Related Promoter of Bovine Herpesvirus 1 Which are Regulated by Neuronal Cell Type Factors and Immediate-Early Genes. *Journal of Virology* 1992; 66, 10: 6099-6106.
31. Miller JM, Whetstone CA, Bello LJ, Lawrence WC. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am J Vet Res* 1991; 52, 7:1038-1043.
32. Furuoka H, Izumida N, Horiuchi M, Osame S, Matsui T. Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR) vaccine. *Acta Neuropathol* 1995; 90: 565-571.
33. Bagust TJ, Clark L. Pathogenesis of Meningoencephalitis produced in Calves by Infectious Bovine Rhinotracheitis Herpesvirus. *J Comp Path* 1972; 82:375-383.
34. Bratanich AC, Weber EL, Giglio C, Lager IA. Caracterización de genes de HVB que regulan su patogenicidad. *Rev Med Vet* 1996; 77, 4:277.
35. Belknap EB, Collins JK, Ayers VK, Schultheiss PC. Experimental-Infection of Neonatal Calves with Neurovirulent Bovine Herpesvirus Type-1.3. *Veterinary Pathology* 1994; 31 (3): 358-365.
36. Kahrs RF. Infectious Bovine Rhinotracheitis: A Review and Update. *JAVMA* 1977; 171 (10): 1055-1064.
37. Brake F, Studdert MJ. Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesvirus 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Aust Vet J* 1985; 62 (10): 331-334.
38. House JA. Prevención y control de la rinotraqueítis infecciosa bovina. *Bol. of Sanit. Panam.* 1980; 88 (1): 35-43
39. Bielanski A, Dubuc C. In-Vitro Fertilization and Culture of Ova from Heifers Infected with Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1). *Theriogenology* 1994; 41 (6):1211-1217.
40. Bielanski A, Loewen KG and Hare WCD. Inactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from in vitro infected bovine semen. *Theriogenology* 1988; 30, (4):649-656.
41. van Oirschot JT, Straver PJ, van Lieshout JAH, Quak J, Westenbrink F, van Exsel ACA. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *The Veterinary Record* 1993; 132:32-35.
42. van Oirschot JT. Bovine Herpesvirus 1 In Semen of Bulls and the Risk of Transmission: a Brief Review. *Veterinary Quarterly* 1995; 17, (1):29-33.
43. Silva AM, Brum MCS, Canto MC, Weiblen R, Roehe PM, Flores EF. Pathogenesis of Meningoencephalitis in Weanling Rabbits by Bovine Herpesvirus type-5 (BHV-5). *Simpósio Internacional sobre Herpesvirus Bovino (tipo 1 y 5) e virus da Diarréia Viral Bovina (BVDV)*, 1998.
44. Giavedoni LD, Ruiz M, Fijtman N, Schudel AA and Rodríguez M. Rapid Diagnosis of Bovine Herpesvirus Encephalitis: Comparison of Nucleic Acid Hybridization and Immunoperoxidase Methods using Clinical Samples. *J Vet Med B.* 1988; 35: 280-285.
45. González ET, Oliva GA, Etcheverrigaray ME, Schudel AA, Nosetto E. Aplicación de las técnicas de hemoaglutinación pasiva (HAP) e inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de rinotraqueítis infecciosa bovina. *Rev Med Vet (Argentina)* 1985; 66 (21):26-30.
46. Kit S, Otsuka H and Kit M. Blocking ELISA for distinguishing infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV)-infected animals from those vaccinated with a gene-deleted marker vaccine. *Journal of Virological Methods* 1992; 40:45-56.
47. Kramps JA, Quak S, Weerdmeester K and van Oirschot JT. Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet Microbiol* 1993; 35:11-21.
48. Vilcek S, Nettleton PF, Herring JA, Herring AJ. Rapid Detection of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) Using the Polymerase Chain-Reaction. *Vet Microbiol* 1994; 42:1:53-64.
49. Kibenge FSB, Harris LM, Mckenna PK, Wadowska D, Yason CV. Amplification of Strains of Bovine Herpesvirus-1 by Use of Polymerase Chain-Reaction with Primers in the Thymidine Kinase Region. *Am J Vet Res* 1994; 55 (9):1206-1212.
50. Xia J, Yason C, Kibenge S. Comparison of Dot Blot Hybridization, Polymerase Chain reaction, and Virus Isolation for Detection of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) in Artificially Infected Bovine Semen. *Can J Vet Res* 1995; 59: 102-109.
51. Kataria R, Tiwari K, Gupta P, Mehrotra M, Rai A, Bandyopadhyay S. Detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genomic sequences in bovine semen inoculated with BHV-1 by polimerasa chain reaction. *Acta virologica* 1997; 41: 311-315.
52. Ashbaugh K, Thompson K, Belknap E, Schultheiss P, Chowdury S, Collins J. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9: 387-394.
53. Whetstone C, Miller J, Bortner D and Van Deer Maaten M. Changes in the restriction endonuclease patterns of four modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) vaccines after one passage in host animal. *Vaccine* 1989; 7:527-532.
54. Bryan LA, Fenton RA, Misra V, Haines DM.. Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves. *Can Vet J* 1994; 35:223-228.
55. Smith GA, Young PL, Rodwell BJ, Kelly MA, Storie GJ, Farrah CA, Mattick JS. Development and Trial of a Bovine Herpesvirus-1-Thymidine Kinase Deletion Virus as a Vaccine. *Australian Vet J* 1994; 71 (3):65-70.
56. Kaashoek MJ, Moerman A, Madic J, Rijsewijk FAM, Quak J, Gielkens ALJ, Vanoirschot JT. A Conventionally Attenuated Glycoprotein E-Negative Strain of Bovine Herpesvirus Type 1 Is an Efficacious and Safe Vaccine. *Vaccine* 1994; 12 (5):439-444
57. Kaashoek MJ, Moerman A, Madic J, Weerdmeester K, Marisveldhuis M, Rijsewijk FAM, Vanoirschot JT. An inactivated vaccine based on a

glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine* 1995; 13 (4): 342-346.

58. Lupton HW and Reed DE. Evaluation of Experimental Subunit Vaccines or Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Am J Vet Res* 1980; 41, 3: 383-390.

59. van Drunen Littel-van den Hurk S, Parker MD, Massie B, van den Hurk JV, Harland R. Babiuk LA and Zamb TJ. Protection of cattle from BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV. *Vaccine* 1993; 11 (1):25-35.

60. Ackermann M, Müller HK, Bruckner L., and Kihm U. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Vet Microbiol* 1990; 23: 365-370.

RIESGO DE LA SALUD PÚBLICA POR EXPOSICIÓN A ANIMALES DE PELETERÍA

P.E. Martino^{1,2}, N.O. Stanchi¹, D.O. Arias¹, E.M. Gatti¹

¹Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

²Comisión de Investigaciones Científicas. Provincia de Buenos Aires

RESUMEN: La cría de pelíferos en cautividad se ha desarrollado durante este siglo como una industria multimillonaria en dólares y en nuestro país la radicación de criaderos se remonta a varias décadas atrás, concentrando gran cantidad de hombres y mujeres como operarios y profesionales (veterinarios, biólogos e ingenieros agrónomos) en las distintas tareas. A pesar de ocupar un segundo plano actualmente con respecto a otros animales domésticos, existe un particular interés por estos valiosos animales, no sólo por la producción de pieles finas sino por su creciente utilización como animales de laboratorio y modelos de experimentación en Medicina Humana, en busca de similitudes de mecanismos patogénicos, ofreciendo un sorprendente panorama de riesgo potencial de contagio al hombre por distintas enfermedades. El propósito de este artículo es asistir a los profesionales y personal en relación con esta actividad productiva, en la identificación de los riesgos ocupacionales de salud a los que se enfrentan diariamente.

Palabras Clave: animales pelíferos, salud pública, zoonosis.

PUBLIC HEALTH RISK BY EXPOSITION TO FUR-BEARING ANIMALS

ABSTRACT: Fur bearing-animals represent a worldwide multimillion industry in dollars, widely developed since several decades around the world included our country, and concentrate a lot of people engaged in diverse aspects of the industry from operaries to professionals. Although ranked in a second place after the traditional domestic animals, these animals are particularly considered of the highly interest not only because of the production of fine furs, but as laboratory animals and experimental models for human pathologies taking into account the outstanding similarities in the pathogenic mechanistic. The aim of this review of the most important diseases the fur-bearing animals and the human being share, is to help the people engaged in this industry to identify the various occupational risks involved.

Key Words: fur bearing animals, public health, zoonosis

Fecha de recepción: 31/05/99

Fecha de aprobación: 02/09/99

Dirección para correspondencia:

P.E.Martino, Comisión de Investigaciones Científicas. Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata, Argentina. Tel/Fax: 0221-4257980
E-mail: martino@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los animales de peletería: visones (*Mustela vison*), hurones (*Mustela putorius*), nutrias (*Myocastor coypus*), zorros (*Alopex lagopus*, *Vulpes vulpes*), chinchillas (*Chinchilla lanigera*) y conejos (*Oryctolagus cuniculi*) representan un relativamente nuevo objeto de producción animal. Desafortunadamente estos animales no han sido el blanco sistemático de científicos (bioquímicos, patólogos y fisiólogos), por consiguiente existe un cierto desconocimiento de sus características biológicas.

RIESGOS TRAUMÁTICOS Y MISCELÁNEOS

Debido al manipuleo de animales, sobre todo por personal no bien entrenado en el manejo especial de estos pelíferos, se provocan frecuentes mordidas, arañazos y caídas. Incluso existe un grupo de riesgos misceláneos, como la posibilidad de contraer urticaria y dermatitis por contacto con pelos de animales, fotodermatitis por uso de fármacos (antibióticos, estrógenos), y carcinosis por uso de antisépticos (formaldehído, glutaraldehído y óxido de etileno) (1).

ZOONOSIS

Las zoonosis son enfermedades que afectan al hombre y a uno o más vertebrados animales. Los animales de peletería comparten el mismo ecosistema con el hombre y son reservorio de infección de diversas enfermedades. Por lo tanto, se recomienda incluirlos en todo programa de control de zoonosis no sólo a los animales provenientes de crianza artificial sino también a aquellos en estado salvaje, como nutrias y zorros grises o colorados, que representan poblaciones altamente significativas de nuestra fauna autóctona y que son objeto de continua persecución y cacería por parte de la gente de campo y cazadores profesionales. Además hay que agregar a este núcleo, aquellos animales criados en cautiverio y escapados al medio natural en donde se reorganizan poblacionalmente, como es el caso de visones en el Parque Nacional Los Alerces. En este contexto reciben una particular importancia las zoonosis emergentes: enfermedades zoonóticas causadas bien por nuevos agentes o por aquellos conocidos pero de aparición en lugares o especies en los cuales la enfermedad era desconocida. Los reservorios animales naturales representan una fuente más frecuente de infección de nuevas enfermedades para el hombre, que la aparición súbita de un

nuevo agente (2). La emergencia de nuevas patologías zoonóticas es usualmente compleja y está asociada a modificaciones en el estado inmunológico de los individuos, hábitos alimenticios y cambios en las condiciones medio-ambientales. Junto con los agentes patógenos zoonóticos, existe un número de patógenos facultativos que amenazan al hombre inmunosuprimido por tratamiento con drogas específicas o infectados con HIV (3, 4).

Algunos aspectos de la patología de estos mamíferos son complejos y poco estudiados. Tal es el caso de la distrofia muscular hereditaria en visones, similar a la distrofia autosomal recesiva y a la clásica de Duchene en el humano, de las cuales existe aún profundo desconocimiento de la mecanística básica que desencadena el proceso (5). La Colágeno-Displasia hereditaria del hombre y la de los visones comparten asombrosas similitudes (6). Otros ejemplos son la Gastroenteritis eosinofílica focal o difusa, descrita en el hombre y en hurones, que hasta ahora no ha revelado agentes infecciosos (7), y la TME o Encefalopatía espongiiforme transmisible de los visones, ocasionada por un prión, con gran semejanza a la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob del hombre (8).

A) ZOONOSIS VIRALES

La enfermedad del Aleutian (ADV) es una parvovirus fatal en los visones caracterizada por una plasmacitosis sistémica e hipergamaglobulinemia (9, 10, 11). Posibles casos de infección en el hombre se han descrito desde 1963 en EE.UU., sobre todo el famoso caso de un obrero manipulador de visones, muerto a los 66 años de mieloma múltiple con repetidas mordeduras de animales infectados; o el caso de otro operario de 19 años con sospecha original de Hodgkin (12). Por otro lado esta infección está asociada al síndrome de Chediak-Higashi (CHS) autosomal recesivo, que afecta no sólo a visones, gatos y otros animales sino al hombre también. Los infectados sufren severas y repetidas infecciones bacterianas por anomalía en los lisosomas de los granulocitos (13). La posibilidad que esta enfermedad produzca infección asintomática es sostenida por expertos de la Universidad de Washington (16) y se recomienda mucha precaución en el manipuleo del virus y altas concentraciones de antígeno, sobre todo para aquellos que realizan las pruebas serológicas en animales de criadero. A la luz de la evidencia de implicar a los virus como agentes etiológicos de neoplasias humanas, es importante observar la ocurrencia de mielomas por prolongadas exposiciones a visones y a este parvovirus, a la vez que los clínicos deben estar alertas y los

sueros de casos sospechosos deberían ser estudiados por contrainmunolectroforesis o ELISA para ADV. Las lesiones de riñón en visones con esta infección son altamente semejantes a la glomerulonefritis membranosa del Lupus eritematoso del hombre, como también la infiltración linfocitaria y plasmocelular en bazo y linfonódulos (15). Más aún, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en el hombre y la enfermedad del Aleutian comparten asombrosas similitudes: pérdida de peso, linfadenopatía, hepato-esplenomegalia, complejos inmunes circulantes, depleción T-linfocitaria, respuesta mitógena T-celular disminuida, trombocitopenia, etc. (3).

La rabia en zorros, visones y nutrias continúa siendo una amenaza fatal por mordeduras de animales salvajes y de los animales escapados de criadero (16). En nuestro país, J.L.Villa y col. en 1960 describen el primer aislamiento de virus rábico en zorro gris en los alrededores de Mendoza (17). Del total de casos informados en América del Norte y el Caribe durante 1990-92, predominan ampliamente los diagnósticos en animales silvestres (18).

También los hurones, mascotas de tradicional crianza en el campo para exterminio de roedores, son altamente susceptibles al rhabdovirus rábico. De acuerdo con informes del *Center for Disease Control* de EE.UU., 9 casos de rabia en hurones fueron detectados entre 1980 y 1987 (19). No existen vacunas antirrábicas para estos animales pero sí para visones y zorros. Además en los casos de humanos mordidos, se recomienda sacrificar humanitariamente a estos hurones y analizarlos para el diagnóstico de rabia, ya que el período de 10 días de observación de signos en perros y gatos no se aplica al hurón, pues todavía no hay estudios sobre el período de incubación, porcentajes de infecciones clínicamente inaparentes y duración de la eliminación del virus por la saliva.

Todavía persiste un panorama no del todo determinado para la salud humana con ciertos virus como rotavirus grupo C atípicos que generan diarreas en hurones neonatales (20), adenovirus productores del síndrome de hepatitis/nefritis fatal en nutrias, reovirus, calicivirus y coronavirus responsables de enteritis en visones y papilomavirus de nutrias, la infección viral más importante en estos animales (11, 21, 22, 23). Y no olvidemos que en los visones se encuentran títulos muy altos de anticuerpos contra los principales agentes de la influenza o gripe humana: A/Bangkok/1/79 y A/Kanamoto/37/79 (24).

Otra patología vírica que ha despertado gran interés en los últimos tiempos es la infección natural por el virus La Crosse, sobre todo a partir

de la publicación de Amundson y Yuil en 1991 (25) que describe casos espontáneos en zorros colorados y grises y en mapaches, con altos títulos de anticuerpos y simultáneas infecciones en la población humana de Wisconsin en EE.UU.

Como corolario del capítulo vírico mencionamos que la Encefalopatía del visón (TME) o Scrapie (producida por un prión), por un lado, y el Kuru, Creutzfeldt-Jakob y la enfermedad de Alzheimer en el hombre por el otro (todas pertenecientes al grupo de enfermedades a virus lentos que ocasionan encefalopatías espongiiformes subagudas), tienen en común características epidemiológicas, histopatológicas y neurológicas (26). Por ejemplo, en Dinamarca se informó un caso de Creutzfeldt-Jakob en una mujer de 47 años que había tenido contacto regular con visones (27).

B) ZONOSIS BACTERIANAS

Dentro del capítulo bacteriano es frecuente observar en nuestros criaderos, visones enfermos de Neumonía Hemorrágica por *Pseudomonas aeruginosa* serotipos 3 y 6 (22, 28, 29) y zorros azules con metritis/piómetras también por *Pseudomonas* (30). Tanto el manipuleo de estos animales enfermos fuera de sus jaulas como el de los cadáveres debe ser cuidadoso, con uso de guantes protectores y soluciones antisépticas. Incluso a partir de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de septicemias fatales en nutrias, en el *Institute for Hygiene* de Praga, desarrollaron una vacuna para uso humano que cuenta con el efecto protector del OEP (*original endotoxin protein*) (31). Infecciones por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y *Escherichia coli* son muy frecuentes en nuestros criaderos, especialmente entre los animales jóvenes (22, 32).

Con respecto a la Tuberculosis (TBC) de zorros y visones, es una enfermedad de alta incidencia en los criaderos de nuestro país (23, 33). Estos carnívoros se contagian por consumo de subproductos de mataderos bovinos y aviares afectados (pulmones e hígados). En nuestros estudios fue aislado de los pelíferos muertos, *Mycobacterium bovis* en la casi mayoría de los casos y, en 2 ocasiones, *Mycobacterium avium* (33). Las pruebas de tuberculina son altamente aconsejables para la detección y sacrificio de los animales enfermos. El personal de criaderos con alto índice de TBC en sus animales, debería recibir vacunación con BCG y ser regularmente estudiado por dermorreacción. Wenzel (11) alerta sobre el gran riesgo humano de contagio por estrecho contacto con chinchillas enfermas de TBC.

La Rodenciosis de las nutrias por *Yersinia pseudotuberculosis* es una enfermedad mundial-

mente conocida (11, 31) y de ocurrencia esporádica en nuestros criaderos (35). Del primer diagnóstico de la enfermedad en nutrias de la Argentina (35), se aisló *Yersinia pseudotuberculosis* serotificada en el *Institute Pasteur* como n°1, a partir de lesiones de hígado y bazo fundamentalmente, siendo el manejo de animales enfermos y de órganos en las autopsias de sumo riesgo de contagio para el hombre.

Aparte del virus rábico, la mordedura de zorros puede transmitir otros patógenos: *Pasteurella multocida*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Aeromonas hydrophyla*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* β-hemolíticos y *Proteus morgagni* (36).

También es conocido el hurón como reservorio potencial de *Campylobacter fetus* var. *jejuni* y trasmisor de la infección al hombre por materia fecal (37) mientras se investigan las posibilidades de usar distintos tipos de vacunas para humanos en estos animales.

Dentro de un extenso compendio de enfermedades bacterianas, otras patologías riesgosas para el hombre son: la Listeriosis de chinchillas y nutrias (38), Salmonelosis (*S. typhimurium*, *dublin*, *cholerasuis*, *anatum*) en zorros y nutrias (39, 40), Leptospirosis en zorros y nutrias por *L. interrogans serovar pomona e icterohaemorrhagiae* (4, 42) y Brucelosis por *Brucella abortus-ovis* en visones (43). Slawon y col (44) en un informe reciente alertan sobre la presencia muy común de 4 serotipos de *Salmonella* (*typhimurium*, *enteritidis*, *dublin* y *agona*) en heces, suelo y agua de criaderos de nutrias, y subrayan el particular peligro para la salud pública de la presencia de estos bacilos en las cloacas.

La neumonía en nutrias de criadero por *Streptococcus zooepidemicus* es la enfermedad más devastadora en nuestro medio para estos animales (45, 46). Este germen afecta también a una gran cantidad de animales (especialmente caballos) y ha sido encontrada también, aunque raramente, en el hombre causando infección en el tracto respiratorio superior, neumonía, artritis séptica, endocarditis y meningitis (47). Además existe el peligro de contagio por el descuerado de estos animales sin el uso de guantes y a través de microheridas.

Asimismo, brotes de septicemia en visones por *Neisseria meningitidis* tipo A han sido informados simultáneamente con brotes de meningitis en niños y adultos, con altos títulos de anticuerpos en suero (48).

Hoy es conocido que *Aeromonas sp* causa gastroenteritis, meningitis, endocarditis y septicemia en el hombre, y que también infecta hurones jóvenes ocasionándoles necrosis hepática focal (49).

Tanto visones como zorros son blanco de infección por *Clostridium carnis* ocasionándoles endometritis enzoóticas. En el hombre sólo se habían publicado casos de infección en heridos de guerra por proyectiles hasta que en 1976, *C. carnis* fue aislado de un niño canadiense de 8 años con septicemia (50).

Los criaderos de zorros y visones observan gran cantidad de material particulado aéreo (restos epiteliales y de excremento desecado, alimento y paja de los nidos) todas fuentes que pueden ocasionar síndromes tóxicos y alveolitis alérgicas. Durante ciertas actividades de criadero, como el descuerado y reposición de paja en las jaulas, se han encontrado altas concentraciones de hongos, bacterias (135.000 UFC/m³) y endotoxinas (1,95 µg/m³) (51).

C) ZONOSIS PARASITARIAS

Dentro de las parasitosis, la Toxoplasmosis sería una infección frecuente en nutrias (52, 53) representando una fuente de infección directa e indirecta para el hombre y sus animales domésticos.

La carne de nutria salvaje y de criadero, muy aceptada en ambientes rurales y suburbanos, puede ser inapta para consumo si está afectada con quistes de *Toxoplasma gondii*, *Trichinella spiralis* (sobre todo en músculos de la garganta, cuello y pecho) y *Sarcosporidiae* (16, 34, 54).

Las nutrias y chinchillas con enterocolitis por flagelados como *Balantidium coli*, *Giardia muris* y *Entamoeba histolytica* son potenciales transmisores para el hombre (23, 55) mientras que la Criptosporidiosis no es una entidad rara en nutrias de criadero (56). En zorros y visones se describen patologías por infección con *Encephalitozoon cuniculi* (57, 58) y por *Pneumocystis carinii* (59). *Echinococcus multilocularis* (60) provoca alta infestación en zorros jóvenes y adultos y se recomienda tomar medidas para proteger al hombre de la echinococosis alveolar, dado que todavía es un problema mayor, por ejemplo en Europa Occidental y Central (4).

También el zorro observa altas cargas de *Toxocara canis* y *cati*, responsables de infecciones subclínicas del síndrome de Larva migrans en el hombre y sobre todo niños infectados por contacto accidental con estos animales, su materia fecal o el suelo contaminado (4).

El hurón está siendo evaluado como animal modelo para reproducir la infección con cepas humanas de *Strongyloides stercoralis* con muy buenos resultados (6).

El hombre puede sufrir considerables molestias durante intensos ataques de pulgas

(*Chaetopsylla globiceps*, *Ctenocephalides canis* y *felis*), garrapatas (*Ixodes* spp) de visones, zorros y martas, y micosis por *Microsporium canis* o *Trichophyton* spp o sarna sarcóptica de zorros (62, 63, 64).

CONCLUSIÓN

La cría de pelíferos en cautividad se ha desarrollado durante este siglo como una industria multimillonaria en dólares y en nuestro país la radicación de criaderos se remonta a varias décadas atrás, concentrando gran cantidad de hombres y mujeres como operarios y profesionales (veterinarios, biólogos e ingenieros agrónomos) en las distintas tareas. El conocimiento del riesgo potencial que representan estos animales para estas profesiones, los aspectos ocupacionales de salud a los que se enfrentan diariamente, conducen a la necesidad de implementar medidas de prevención y/o control de estas enfermedades.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yantsch P. Occupational health hazards and disease risks for female veterinarians. A.V A News 1993; 12:10-11.
2. Meslin FX. Surveillance and control of emerging zoonosis. World Health Status Q. 1992, 45 (2-3):200-207.
3. Bloom M. Parvovirus infections: features reminiscent of AIDS. Annals of the New York Academy of Sciences. 1985; 437:110-120.
4. Frankenhuys MT. Some zoonotic diseases of birds. Mammalian pets and captive animals (A Review). Isr J Vet Med 1991; 46:150-153.
5. Hegreberg GA, Norton SL, Gorham JR. Muscular dystrophy of mink proves an animal model of aliment in humans. Fur Rancher 1978; 8:4-6.
6. Van Leuben J. Heritable collagen-dysplasia in domestic animals and man: a comparative review. Ulaams Dieg Tijd 1987, 2:89-99.
7. Fox JG, Palley LS, Rose R. Eosinophilic gastroenteritis with splendore - Hoeppli material in the ferret. Vet Path 1992; 29 (1):21- 26.
8. Kretschmar H. (Transmissible mink encephalopathy). J of Gen Virol 1992; 73 (10):2757-2761.
9. Martino PE, Martino JJ. Incidencia de la Plasmacitosis viral en visones (*Mustela vison*) en cautividad. Aspectos clínicos, patológicos y serológicos. Rev Arg Prod Anim (AAPA) 1986; 6 (3):223-227.
10. Martino PE, Martino JJ, Villar JA. A note on diseases on mink. J of Vet Med (B) 1991; 38:227-230.
11. Wenzel U. Pelztiergesundheitsdienst. Veb Gustav Fischer Verlag Berlin. 1982.
12. Henry LW. Multiple myeloma in a mink handler following exposure to Aleutian disease. Cancer 1979; 44 (1):273-275.
13. Prieur DJ. An updated bibliography of the Chediak-Higashi Syndrome of man and animals. Washington St.Univ. USA. 1982.
14. Gorham JR, Henson J.B., Crawford TB, Padgett GA. The epizootiology of Aleutian Disease .En Slow Virus Diseases of Animal and Man. R.H.Kimberlin,Ed.Amsterdam,North- Holland. pp:135-158. 1976.
15. Akhnazarova VD, Nasonova VA. Aleutian disease in minks as an experimental model for studying the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Biology and pathology of fur bearing animals. Published by U.S. Dept.of Agriculture.USA.1985.
16. Scheuring W. Characteristic and specific veterinary problems and their solving in coyup production. International Scientific Conference Coyup'87. Novi Sad Yugoslavia. pp.66-70, 1987.
17. Villa LJ, Perez Arrieta C, Morris JF. Aislamiento de virus rábico de zorros en la República Argentina. Revista de Investigaciones Ganaderas. 1960, 29-38.
18. INPPAZ en Las Americas. (Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis). OPS/OMS. Marzo.Año 1, N°1. 1994.
19. Eng TR, Jenkins SR. More on ferrets as pets. JAVMA 1988; 193, 8:904-905.
20. Torres Medina A. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhoea in neonatal ferrets. Lab Anim Sci 1987, 37 (2):167-171.
21. Hansen M. Sygdome hos pelsdyr i 1990. Dansk Pelsdyravl 1991; 54 (1): 13-15.
22. Martino PE, Rule R. Some deaths causes on reproductive female mink. Small Carnivore Conservation. 1994; 10:11.
23. Martino PE, Stanchi NO. Fur bearing animals and zoonoses. World Animal Review (FAO) 1991, 72:34-36.
24. Kazaki K, Yanagawa R, Kida H. Human Influenza virus infection in mink. Vet Microb 1983; 8:251-257.
25. Amundson TE, Yuil TM. Natural La Crosse virus infection in the red fox, gray fox, raccoon and opossum. Am J of Trop Med and Hyg 1981; 30 (3):706-714.
26. Bosgiraud C, Nicolas JA, Simeon M. Les virus lents en Médecine Animale et Humain. Revue Méd Vét 1985; 136, (8/9):609-616.
27. Hojer-Pedersen E. A case of Creutzfeldt-Jakob's Sygdom. Ugeskr Laeg 1985; 142/20:1288.
28. Martino PE; Martino JJ; Villar JA. La Neumonía hemorrágica en visones (*Mustela visón*) de la República Argentina. Rev Arg Microbiología 1985; 17 (3):145-148.
29. Martino PE, Martino JJ. Descripción de un nuevo brote de Neumonía hemorrágica en visones. Rev Med Vet 1987; 68 (6):308-310.
30. Farstad W, Reiersen J, Solberg I. Utbrud av metritt hos blarev forarsaket av *Pseudomonas aeruginosa*. Norsk Vet. 1985; 97 (4):241-246.

31. Dousek J. The health situation in coypus farms in the Czech Socialist Republic. Proceedings of the International Scientific Conference Coypu'87, Novi Sad, Yugoslavia, pp 121-124. 1987.
32. Martino PE, Villar JA. A survey on perinatal mortality in young mink. *Vet Res Comm* 1990; 14:199-205.
33. Martino PE, Martino JJ, Villar JA. Tuberculosis en visones. *Vet Arg* 1986; 3 (24):374-379.
34. Scheuring W. Choroby Nutrii. Wydanie IV (IV Edition). Panstowowe Wydawnictwo Rolnicze i Lesne. Warszawa. Polska. 1989.
35. Cipolla AL, Martino PE, Villar JA. Rodenciosis en nutrias (*Myocastor coypus*). Primeros hallazgos en Argentina. *Rev Arg Prod Anim (AAPA)* 1987; 7(5):481-486.
36. Barrat J, Blancou J. Inventaire de la microflore buccale des carnivores sauvages en Lorraine. *Revue Française de la Santé Publique* 1982; 19:25-29.
37. Hunter BD, Prescott JF. Natural and experimental campylobacter diarrhoea in mink. Proceedings 2nd Internat. Workshop of *Campylobacter* infections, UK. pp:125-126. 1983.
38. Hajtós I, Malik G. Vérfertözéses listeriosis nutriában. *Magyar állategészségügyi intézet*. 1983; 38 (6):359-361.
39. Kopczewski A, Stryszak M. Analiza statystyczna wyników hodowlanych u lisow szczepionych i nie szczepionych przeciw salmonelozie. *Medycyna Weterynaryjna* 1983; 39 (12):719-722.
40. Wenzel U, Albert G. Summary of the results of Pathological and bacteriological examination of mink in the Leipzig area. *Deutsche Veterinarmedizinische Gesellschaft* 1990, 6:317-319.
41. Kingscote BF. Leptospirosis in red foxes in Ontario. *J of Wild Dis* 1986; 22 (4):475-478.
42. Stanchi NO, Martino PE, Martino JJ, Calvo JO. Leptospirosis en animales silvestres y en animales de piel. *Rev Med Vet* 1987, 68 (2):80-85.
43. Martino PE, Stanchi NO, Martino JJ. Investigación de Brucelosis en animales de peletería y silvestres. *Therios* 1987; 10 (46): 23- 26.
43. Wang SZ. Diagnosis and control of meningococcal septicaemia in mink. *Xumu Yushouyi* 1985, 17(5):222-223.
44. Slawon J, Bis-Wencel H, Saba L. *Salmonella* bacilli on nutria farm. *Scientifur* 1995, 19 (1):47-50.
45. Martino PE; Stanchi NO. Causes of death in captive nutria (*Myocastor coypus*) in Argentina. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, Vol 53 (3): 83-88, 1998.
46. Martino PE, Stanchi NO. Epizootic pneumonia in nutria. *J of Vet Med (B)* 1994, 41:561-566.
47. Barnham M, Cole G, Efstrotation A, Tagg J, Skejold S. Characterization of *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C) from human and selected animal infections. *Epidem Inf* 1987; 98:171-182.
49. Hiruma M, Ike K, Kume T. Focal necrosis in young ferrets infected with *Aeromonas* species. *Jpn J Vet Sci* 1986; 48(1):159-162.
50. Sorum H, Nordstoga K, Looftsgaard G, Brenner D, Hollis DG, Fossum K. An outbreak of septic endometritis in the Arctic blue Fox (*Alopex lagopus*) caused by *Clostridium carnis*. *Acta Vet Scand* 1988, 29: 181-191.
51. Schimberg RW, Uitti J, Kotima M, Sarantila M. Airborne articulate matter, fungi, bacteria and endotoxins in fur farming. *Staub-Reinhaltung der Luft*. 1992, 52: 457-460.
52. Martino PE, Stanchi NO, Martino JJ. Estudio serológico por aglutinación directa de Toxoplasmosis en animales de peletería y silvestres. *Therios* 1988; 12 (60):411-416.
53. Wenzel U, Keil H. Toxoplasmosis in fur-bearing animals. 3th Congress Int Sci Prod Anim Fourrure Versailles, France Comm N°59. 1984.
54. Roneus O, Christensson D. Presence of *Trichinella spiralis* in free-living red foxes in Sweden related to *Trichinella* infection in swine and man. *Acta Vet Scand* 1979, 20:583-594.
55. Verdes N, Pop T. Observatii asupra unor enzootii de enterocolita la nutrii. *Rev.de Cresterea Animalelor* 1986; 36 (4):41-44.
56. Cotofan O. Pathology of Cryptosporidiosis in calves and nutria. *Zoo-Med Veterinara (Romania)* 1982; 26:25-26.
57. Henricksen P. The prevalence of Encephalito-zoonosis in Danish farmed foxes. *Nord Vet-Med* 1986; 38:167-172.
58. Nordstoga K, Loftsgaard G. Nosematosis in mink. *NJF Seminarium Scandinavian Assoc of Agric Sci No.85*.1985.
59. Settnes OP, Elvestad K, Clausen B. *Pneumocystis carinii* Delanoe & Delanoe, 1912, found in lungs of free living animals in Denmark at autopsy. *Nord Vet-Med* 1986, 38:11-15.
60. Brocher B. Prevalence of *Echinococcus multilocularis* infection in the red fox in Belgium. *Annales de Medicine Veterinaire*. 1992; 136, 7:497-501.
61. Davidson RA *Strongyloides stercoralis* infection in the ferret. *J.Parasit*. 1988; 1:177-179.
62. Liebisch A, Walter G. Studies on the ticks of pets and wild animals in Germany. *Deutsche Tierarztliche Wochenschrift* 1980; 93 (9):447-450.
63. Loftsgaard G. Health status of norwegian fur farms in 1986. *Norsk Veterinaertidsskrift* 1987; 99 (1):25-27.
64. Sarkisov AK, Nikiforov LI. Specific prophylaxis of *Trichophyton* infection in fur-bearing animals. *Byulleten Vsesoyuznogo Instituta Veterinarii* 1981, 42:32-34.

CAMPYLOBACTER TERMOTOLERANTES EN MENUDOS Y CARCASAS DE POLLOS PROVENIENTES DE DIFERENTES COMERCIOS DE LA CIUDAD DE LA PLATA (ARGENTINA)

G. Giacoboni¹, M.C. Puchuri¹, R. Cerdá².

¹Laboratorio de Investigaciones y Diagnóstico Bacteriológico.

² Cátedra de Microbiología.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: Se cultivaron 120 muestras de menudos y carcasas de pollos comprados en 4 centros comerciales, provenientes de diferentes granjas. Los aislamientos realizados sobre medio de Skirrow y filtrados a través de membrana de poro de 0,45 µm, revelaron que 42 (35%) de las muestras procesadas contenían *Campylobacter jejuni* biotipo II de Lior y solo 1 (0,8%) *Campylobacter coli* biotipo II. Se comprueba con este estudio que, en nuestro medio, los pollos que se comercializan contienen esta bacteria, por lo que el consumidor debería tomar las medidas higiénico-sanitarias adecuadas para prevenir su probable contaminación.

Palabras Clave: *Campylobacter* termotolerantes - menudos de pollo- biotipos

THERMOTOLERANT CAMPYLOBACTER IN CARCASSES AND RETAIL POULTRY PARTS FROM DIFFERENT MARKET PLACES FROM LA PLATA CITY (ARGENTINA)

ABSTRACT: Forty-three strains of thermotolerant *Campylobacter* were isolated from 120 carcasses and retail poultry samples obtained from 4 market places (different poultry farms). Samples were processed by culture on Skirrow media overlaid with 0.45 µm pore size filter. Forty-two of them (35%) were identified as *C. jejuni* biotype Lior II and 1 (0.8%) as *C. coli* biotype II. These study confirmed the existence of thermotolerant *Campylobacter* species in commercial chicken so that care should be taken by the consumers when preparing these foods.

Key Words: Thermotolerant *Campylobacters*- retail-ready poultry parts-biotypes

Fecha de recepción: 15/05/99

Fecha de aceptación: 02/09/99

Dirección para correspondencia:

Gabriela Giacoboni CC 296.La Plata (B1900AVW) Buenos Aires, Argentina Tel/Fax: +54-221-4257980

E-mail: giacoboni@fcv.med.vet.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Campylobacter jejuni y *Campylobacter coli* son agentes causales de enteritis en el hombre tanto en países en vías de desarrollo (1) como en países desarrollados (2). Muchas especies animales silvestres y domésticas son reservorios de estas bacterias, entre ellas las aves son las más importantes (3). En esta zoonosis, el consumo de alimentos es una de las formas más comunes de infección humana. Se estima que más del 50% de los casos esporádicos de enteritis por *Campylobacter* están asociados al consumo de pollos o a su manipuleo (4). El 45 al 85% de la carne de pollo y sus vísceras listas para el consumo contienen *C. jejuni* (5).

Todos estos datos reflejan la importancia de conocer la contaminación por *Campylobacter* termotolerantes en los pollos que se consumen en nuestro medio. El objetivo de este trabajo es conocer con qué frecuencia se pueden aislar estas bacterias y a qué biotipo pertenecen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procesaron 120 muestras de menudos de pollos y carcasas expandidas como menudencias en 4 comercios de la ciudad de La Plata, con diferentes granjas proveedoras. Cada muestra fue enriquecida en 100 ml de caldo brucella adicionada con 10 mg/ml de vancomicina, 5 mg/ml de trimetoprima 10 mg/ml de cefalotina, preincubándola 6 horas a 37 °C y atmósfera microaerófila (mezcla de gases de N₂ 90%, CO₂ 7%, H₂ 3% (Hirayama incubator).

Luego se le agregó a cada una de ellas 20 UI/ml de polimixina B reincubándolas 24 horas a 42 °C. Sobre placas de agar Skirrow se colocaron filtros de poro de 0,45 µm, a través del cual se filtraron 5-6 gotas del caldo previamente descripto. Las jarras se abrieron luego de 48 horas de incubación a 42 °C.

La identificación presuntiva del género *Campylobacter* se realizó mediante la coloración de Gram de aquellas colonias sospechosas (puntiformes, como gotas de agua o bien de aspecto húmedo, transparentes o con brillo metálico, que invaden la estría de inoculación), prueba de oxidasa y catalasa. A los aislamientos presuntivamente identificados como *Campylobacter* sp. se los sometió a diferentes pruebas bioquímicas (hidrólisis del hipurato, hidrólisis del indoxil acetato, sensibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina y de crecimiento a 26, 37 y 42 °C) y a las propuestas por Lior para la biotipificación (hidrólisis de DNA, hidrólisis del hipurato, prueba rápida de SH₂ (6).

RESULTADOS

De las 120 muestras de menudos de pollo procesadas, se aislaron 43 (35,8%) cepas de *Campylobacter* termotolerantes. La identificación de especie por las pruebas bioquímicas citadas reveló que 42 (35%) cepas correspondieron a *C. jejuni* y 1 (0,8%) a *C. coli*. Los aislamientos se realizaron en las muestras provenientes de dos de los cuatro comercios donde fueron comprados los menudos (diferentes granjas de origen).

Las cepas aisladas e identificadas como *C. jejuni*, y el único aislamiento de *C. coli* correspondieron al biotipo II de Lior.

DISCUSION

En este estudio el 35,8 % de las muestras de pollo procesadas para tratar de aislar *Campylobacter* termotolerantes fueron positivas. Esta frecuencia fue baja comparada a la hallada por Fernández en Chile (7) a partir de hígado de pollos congelados (92,9%), pero similar a los aislamientos obtenidos en Canadá (8) con un 38,2% en carcasas de pollos y superior al encontrado por Notermans y col. en Holanda (9) en pollos obtenidos de supermercados (16%). Estas diferencias podrían deberse a las distintas técnicas utilizadas para procesar las muestras, como así también a las injurias sufridas por las mismas en el lugar de expendio (exposición a diferentes temperaturas, tiempo de almacenaje, etc.) factores desconocidos al obtenerlas en los comercios.

Los estudios de prevalencia de *Campylobacter* sp. en pollos muestran que la especie *jejuni* es la más frecuentemente aislada mientras que la especie *coli* es menos común y *lari* es raro de encontrar (10). Esto concuerda con nuestros hallazgos pero no con los de Chile en hígados de pollo congelados donde la especie predominante fue *C. coli* biotipo I (7). En este estudio el biotipo prevalente fue el II de Lior de *C. jejuni*. Este biotipo fue también el encontrado por los autores en cepas de *C. jejuni* aisladas de perros de la ciudad de La Plata (11).

Otro aspecto importante que hizo al porcentaje de recuperación de campilobacterias fue la diferencia hallada a partir de los distintos lugares de origen. De dos de los comercios, a su vez con diferentes granjas proveedoras, no hubo ningún aislamiento registrado. La bibliografía cita la importancia de las medidas higiénicas aplicadas en las plantas procesadoras ya que los pollos contienen naturalmente *Campylobacter* sp. que coloniza el intestino (12). Las bacterias contaminan el equipamiento, las superficies del área de trabajo y el agua de lavado

(13,14). Uno de los procesos especialmente importantes en la contaminación es el eviscerado, en el que los microorganismos se diseminan tanto en las carcasas como el resto del material (15). Aunque los niveles finales de contaminación, dependiendo de los cuidados efectuados en el procesamiento pueden llegar a ser muy bajos, son de todas maneras peligrosos para la salud humana, debido a las bajas dosis (entre 500 y 10.000 bacterias) que se necesitan para causar enfermedad (16).

Habiéndose aislado *Campylobacter* termotolerantes a partir de carcasas y menudos de pollos de comercios listos para el consumo humano, y con los antecedentes de otros países del mundo donde el consumo de carne de pollo o su manipuleo es la principal causa de enteritis esporádica por estas bacterias (17), creemos necesario que el consumidor tome las medidas higiénico sanitarias adecuadas para evitar su probable contaminación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Fernández H. Thermotolerant *Campylobacter* species associated with human diarrhea in Latin America J Braz Assoc Adv Sci 1992; 44:39-43.
- 2.- Skirrow MB. Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. Int J Food Microbiol 1991; 12:9-16.
- 3.- Blaser MJ, Taylor DN, Felman RA. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infection in humans. Epidemiol. Rev. 1983; 49:712-717.
- 4.- Deming MS, Tauxe RV, Blake PS, Dixom SE, Fowlwe BS, Jones TS, Lockamy EA, Patton CM, Sikes RO. *Campylobacter* enteritis at a university: transmission from eating chicken and from cats. Am J Epidemiol 1987; 126:526-534.
- 5.- Doyle MP. *Campylobacter* infection in man and animals. *Campylobacter* in foods 1984; 164-180. Inn J.P Butzler(de) CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- 6.- Lior H. New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lariidis*. J Clin Microbiol 1984; 20:636-640.
- 7.- Fernández H, Pisón V. Isolation of thermotolerant species of *Campylobacter* from commercial chicken livers. Int J Food Microbiol 1996; 29:75-78.
- 8.- Lammerding AM, García MM, Mann ED, Robinson Y, Dorward WJ, Truscott, RB, Tittiger, F. Prevalence of Salmonella and termophilic *Campylobacter* in fresh pork. Beef veal and poultry in Canada. J Food Prot 1988; 51:47-52.
- 9.- Notermans S, Van Erne, EHW, Beckers H J, Oosterom J. The assessment of the bacteriological condition of fresh poultry in shop and market places. Fleischwirtschaft 1981; 61:101-104.
- 10.- Kazwala RR, Collins J D, Hannan J, Crinion RAP, O'mahony H. Factors responsible for the introduction and the spread of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry production. Vet Rec 1990; 126:305-306.
- 11.- Giacoboni GI, Puchuri MC, Castellano C, Echeverria MC. Identificación mediante biotipos y perfiles proteicos de *Campylobacter* aisladas de perros. XII Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico 1998; 40.
- 12.- Berry JT, Hugdahl MB, Doyle MP. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. Appl Environ Microbiol 1988; 2365-2370.
- 13.- Genigiorgis C, Hassuneh M, Collins P. *Campylobacter jejuni* infection on poultry farms and its effect on poultry meat during slaughtering. J Food Prot 1986; 895-903.
- 14.- Oosterom J, Notermans S, Karman H, Engels GM. Origin and prevalence of *Campylobacter jejuni* in poultry processing. J Food Prot 1983; 46:339-344.
- 15.- Baker RC, Parades MDC, Qureschi RA. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in eggs and poultry meat in New York state. Poultry Science 1987; 1766-1770.
- 16.- Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. J Infect Dis 1988; 157:472-479.
- 17.- Harris N V, Weiss NS, Nolan CM. The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* enteritis. Am J Public Health 1986; 76:407-411.

CHARACTERIZATION OF BOTHROPS VENOMS OF ARGENTINA BY SDS-POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

N. O. Stanchi¹, C. Dilorenzo¹, C.M. Gómez^{1,2}, C. Grisolia³,
J. Copes¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

²Sector Sueros. Laboratorio Central de Salud Pública.

Ministerio de Salud. Provincia de Buenos Aires.

³Laboratorio y Museo de Animales Venenosos (LYMAV), Facultad de Ciencias Médicas.
Universidad Nacional de La Plata.

ABSTRACT: *Electrophoretic pattern of Bothrops alternatus, B. neuwiedi, B. ammodytoides, B. jararaca and B. jararacussu of Argentina by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis was carried out. Venoms used in this study came from animals (including juvenile) which live in different geographical zones. Special care was taken to not have cross-contamination of samples with blood and tissue fluids. All the snakes were milked with a minimum starvation period of 30 days. SDS-PAGE may be useful as a complementary method for characterization of snake venoms.*

Key Words: *Bothrops, venom, electrophoresis*

CARACTERIZACIÓN DE VENENOS DE BOTHROPS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA

RESUMEN: *Un estudio mediante electroforesis en geles de poliacrilamida fue realizado en venenos de Bothrops alternatus, B. neuwiedi, B. ammodytoides, B. jararaca y B. jararacussu procedentes de Argentina. Los venenos usados en este estudio fueron obtenidos a partir de animales procedentes de diferentes zonas geográficas, habiendo incluido animales jóvenes en este estudio. Se tomó especial precaución en el momento de extracción de los mismos evitando todo tipo de contaminación cruzada con sangre y otros fluidos animales. Todas las serpientes fueron «ordeñadas» con un período mínimo de ayuno de 30 días. Se desprende del análisis de este estudio que la técnica de SDS-PAGE puede ser de utilidad como método complementario para la caracterización de venenos de ofidios.*

Palabras Clave: *Bothrops, venenos, electroforesis*

Fecha de recepción: 20/10/98

Fecha de aceptación: 02/09/99

Dirección para correspondencia:

Carlos M. Gómez, CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA. Tel/Fax: 54-21-257980

E-mail: cgomez@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCTION

Bothrops genus comprises different species of snakes, but from medical and toxicological points of view there are five which have great importance in Argentina. *Bothrops alternatus*, *B. neuwiedi*, and *B. ammodytoides* are wide distributed in the country. On the other hand, *B. jararaca*, and *B. jararacussu* are found only in Misiones Province; this province resembles to south Brazil biogeographically. In spite that *B. mooenii* is present in Argentina, it was not included in this study because it has no importance in the production of antisera.

Electrophoretic studies of snake venoms, particularly those regarding *Bothrops* genera, have been conducted by different investigators. With the approach of more advanced electrophoretic techniques during the past decade, several studies have been carried out. These investigations used paper electrophoretic (1), cellulose acetate (2,3), and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (4, 5, 6).

As verification of venom identity is a necessity, mainly when the production of anti-snake venom serum with material from different sources is achieved, the present paper describes the electrophoretic PAGE pattern of five snake venoms of Argentina, with the purpose of its use as a guide to certify the identity and purity.

MATERIAL AND METHODS

Venoms

Snake venom samples of *Bothrops alternatus*, *B. neuwiedi*, *B. ammodytoides*, *B. jararaca*, and *B. jararacussu* were obtained from LYMAV (Laboratorio y Museo de Animales Venenosos) with the methodology described previously (7, 8) milking one animal species per day. Each lot has in composition venoms of animals of different age (including juvenile specimens) and have originated from different geographical zones of the country. Each specie comprise 50 animals for *B. alternatus*, *neuwiedii* and *ammodytoides*, and 20 for *jararaca* and 12 for *jararacussu*. Immediately after milking, venoms were desiccated under vacuum, phosphorus pentoxide and ambient temperature conditions; then it was pooled and stored at 4°C until processed (no more than 30 days). Resuspension was made on distilled water at 1% (w/v) concentration.

Electrophoresis

Sodium dodecil sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (10% w/v) in Tris-glycine buffer, pH 8.6 was performed in slab

according to the method of Laemmli (9), with 2.5% (w/v) stacking gel. Briefly, 20 µl of each venom were mixed with sample buffer (12.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 4.6 % sodium dodecil sulfate; 2%-Mercaptoethanol and 0.1 Bromophenolblue) and denatured by treatment at 95°C for 5 min. Runs were in parallel with 20 mA per slab and bromophenol blue was applied as tracking dye. Gels were stained for 30 min at room temperature with 0.05% (w/v) Coomassie brilliant blue R in 12.5% (v/v) acetic acid and 40% (v/v) methanol, and destained for 4 days with several changes of 7.5% acetic acid and 5% (v/v) methanol. Molecular weigh marker were also used (Sigma Co.). A densitometry of gel was carried out.

RESULTS

The results of SDS-PAGE are shown in Fig. I. The venoms are clearly differentiated from each other. *Bothrops alternatus* show 11 important bands, *B. neuwiedi* 9, *B. ammodytoides* 9, *B. jararaca* 8 and *B. jararacussu* 6 bands. Common bands are seen in different venoms (see arrow). All these different patterns are clearly defined by gel densitometry (Fig. II).

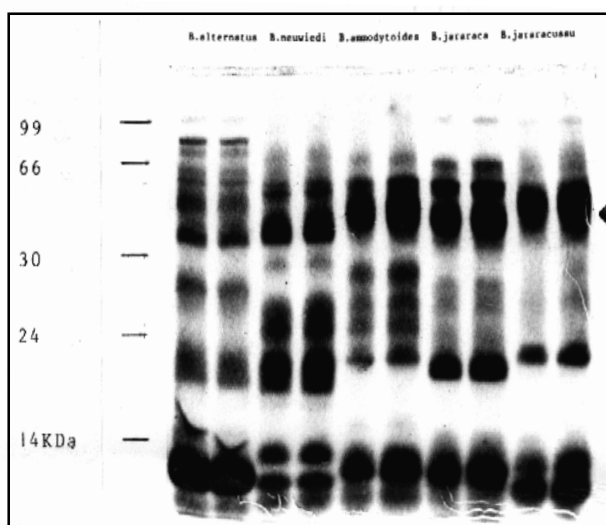


Figure I. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (12% w/v) of *Bothrops* venoms (1% w/v, sample: 10 µl). Runs were carried out in parallel.

Figura I. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con SDS (12 % p/v) de venenos de *Bothrops* (1% p/v, muestra 10 µl). Las corridas se realizaron por duplicado.

DISCUSSION

As proteins and their derivatives constitute important aspects in the toxic effectiveness of most venoms, electrophoretic techniques offer a valuable contribution to show differences in venom composition.

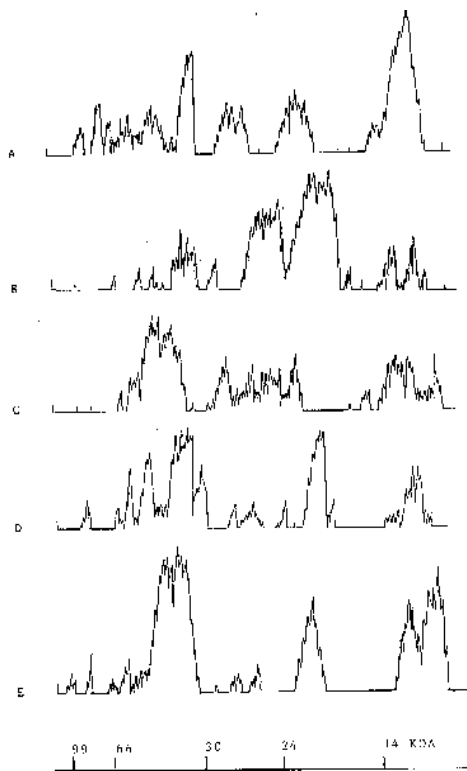


Figure II. Densitometry of SDS-Polyacrilamide gel electrophoresis: A. *B. alternatus*, B. *B. neuwiedi*, C. *B. ammodytoides*, D. *B. jararaca*, E. *B. jararacussu*.

Figura II. Densitometría de electroforesis en geles de SDS-

When animals are milked, a careful proceeding should be observed, in order to avoid the presence of contaminating proteins. Most of the reaction observed between anti-venom and snake sera can be explained by assuming that the venom used to immunize horses for antivenin production has been contaminated with snake blood or tissue fluid (10). According to this, when contaminating proteins are present, the electrophoretic pattern may change.

Juvenile and adult specimens were also included because differences in venom composition have been found in different investigations (11, 12, 13, 14). It is relevant to mention that the animals used in this study were milked once every 6 months, and with a minimum starvation period of 30 days to preserve all venom components, as described previously (7,8). There is unparalleled regeneration of snake venom components in successive milking (15) causing a decrease in the protein production of the gland and in the enzyme activity (16).

Stored venoms used for hiperimmunization of animals for anti-snake venom must be identical on antigenic properties such as fresh venom, because electrophoretic changes have been found under different storage conditions

(17). They must also comprise venoms from animals of different geographical zones. There are important differences found in the composition of venoms in animals of the same geographical zones (18, 19, 20, 21).

Electrophoresis of venoms in SDS-PAGE has a similar number of bands to those obtained by Siles Villaroel (2, 3) with cellulose acetate («Cellogel»), except for *B. jararaca*. In this venom we found 10 bands, while in Brazilian snakes 15 bands have been observed; however, the former technique allows greater resolution with a simple differentiation of bands. On the other hand, Perrone et al (6) in Brazil, found different SDS-PAGE pattern, for both *B. neuwiedi* and *B. jararacussu* in comparison with our work. Apart from the difference of the technique employed by Siles Villaroel, in both cases this disagreement may be explained through the induction of variation of venom composition mentioned above. *B. ammodytoides* is present only in Argentina and we have no other reports to evaluate differences or similarities with other papers.

SDS-PAGE may be a suitable technique to verify venom identity and/or quality, when venom arrives to the laboratory from different serpentaria. Besides from that, this method of characterization of snake venom may be a valuable help as a complement to the method described by Theakston and Reid (22) for the same purpose.

ACKNOWLEDGEMENT

We wish to thank Dr. R. de Torres their kindly advice.

REFERENCES

1. Suzuki T. Separation methods of animal venoms constituents. Mem Inst Butantan 1966, 33,2:389-410.
2. Siles Villaroel M, Rolin Rosa R., Schwindt-Furlaneto R, Zelante F., Estudio electroforetico em «Cellogel» de venenos do gênero *Bothrops*. Mem Inst Butantan 1973, 37:83-90.
3. Siles Villaroel M. Contribução ao estudo de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (*Bothrops jararaca*, *B.alternatus*, *B.insularis*, *B.jararavussu*, *B.atrox* e *B.cotiara*). Tese Doutor. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. Brasil. 1972.
4. Basu AS, Parker R, O'connor RO. Disc electrophoresis of glycoproteins in snake venoms. Toxicon 1970, 8: 279-284.
5. Mandelbaum FR, Assajura MT, Reichl AP. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from venom of *Bothrops neuwiedi* (Jararaca pintada). Toxicon 1984, 22,3: 193-206.
6. Perrone MAL, Siles Villaroel M, Furtado M de FD. Estudio comparativo entre os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* procedentes do estado de São Paulo e do Estado do Parana com algumas espécies morfológicamente duvidosas. Mem Inst Butantan 1989, 51,1: 25-32.
7. Grisolia C, Stanchi NO, Peluso F. Relación entre el periodo de ayuno y la cantidad de veneno extraída de ofidios en cautiverio. Rev Arg Prod Animal 1986, 6, 7/8:513-516.
8. Grisolia C, Peluso F, Stanchi NO. Informe sobre la actividad del Laboratorio y Museo de Animales Venenosos de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Rev Arg Prod Animal 1986, 6, 7/8:517-519.
9. Laemmly UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 1970, 227: 680.
10. Minton SA. Common antigens in snake sera and venoms. Toxicon 1970, 8,2: 143.
11. Bonilla CA, Faith MR, Minton SA Jr. L-aminoacid oxidase, phosphodiesterase, total protein and other properties of juvenile timber rattlesnake (*C.h.horridus*) venom at different stage of growth. Toxicon 1973, 11: 301.
12. Dominguez Furtado M de F, Contribução ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* (Hoge, 1965) (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) em Tese Doutor. Universidade de São Paulo, 1987.
13. Gutierrez JM, Chavez F, Bolaños R. Estudio comparativo de veneno de ejemplares recién nacidos y adultos de *Bothrops asper*. Rev Biol trop 1980, 28:341.
14. Lomonte B, Gene JA, Gutierrez JM, Cerdas L. Estudio comparativo de los ejemplares de serpiente cascabel (*Crotalus durissus durissus*) de ejemplares adultos y recién nacidos. Toxicon 1983, 21,3: 379-384.
15. Schenberg S, Pereira Lima FA, Nogueira Schiripa LN, Nagamori A. Unparalleled regeneration of snake components in successive milking. Toxicon 1970, 8,2:152.
16. Sobol Brown R, Boolah A, Kochva E, Brown MB. Secretion of enzymes in the venom glands of *Vipera palaestinae* (Viperidae, Ophidia). Toxicon 1966, 8,2:156.
17. Gene JA, Lomonte B, Gutierrez JM, Cerdas L. Cambios en el patrón electroforético del veneno de la serpiente cascabel muda (*Lachesis muta stenophys*) almacenado bajo diferentes condiciones. Rev Biol trop 1985 33,1:63-65.
18. Aragon F, Gubensek P. *Bothrops asper* venom from the Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. Toxicon 1981, 19: 797-805.
19. Glenn J, Straight RC, Wolfe MC, Haryd L. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. Toxicon 1983, 21, 1:119-130.
20. Jimenez Porras JM. Intraspecific variations in composition of venoms of the jumping viper, *Bothrops nummifera*. Toxicon 1964, 2: 187-195.
21. Jimenez Porras JM. Differentiation between *Bothrops nummifer* and *Bothrops picadori* by means of the biochemical properties of their venoms. Toxicon 1967, 4:300-322.
22. Theakston RDG, Reid MA, Development of simple standard assay procedure for the characterization of snake venoms. Bull. WHO 1983, 61,6:949-956.

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 y de extensión 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 más abajo detallado.

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 recuperados en INTERNET en la dirección electrónica:

<http://www.medvet.unlp.edu.ar/publicaciones>.

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.medvet.unlp.edu.ar/publicaciones>. La Revista constará 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 6.0® o Word Perfect 6.0®); dos de las copias no deberán contener el nombre de los autores no su filiación científica.

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 estarán a cargo de los autores. La versión electrónica de la revista podrá 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 reproducción, podrán enviarse fotografías o gráficos en formato TIF, CRD o BMP.

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 so-

meterá 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. 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 (ambos en minúscula), 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 sobresalientes 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 de los autores 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, gráficos o fotos se adjuntarán al final del manus-

crito 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 9 por 13 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, bibliografía y 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.medvet.unlp.edu.ar