

ISSN 1514259-0

Analecta Veterinaria

Publicación de la Facultad de Ciencias Veterinarias

Volumen 22 n° 2 2002



Universidad Nacional de La Plata

La Plata. Buenos Aires. Argentina



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

Autoridades

Decano

Méd.Vet. Eduardo Rafael Pons

Vicedecano

Dr. Edgardo Nosetto

Secretario Académico

Dr. Marcelo Pecoraro

Secretario de Postgrado

Dra. Pilar Peral García

Secretario de Extensión Universitaria

Méd.Vet. Alicia Antonini

Secretario de Ciencia y Técnica

Dr. Edgardo Nosetto (a cargo)

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité Editorial

(Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi (h)

Dr. Pablo E. Martino

Méd.Vet. Enrique Pennimpede

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

Responsable Versión Electrónica

Méd.Vet. Santiago Corva

Supervisión de Estilo

Méd.Vet. Julio Bernal

Prof. Nora B. Vázquez

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 22 n° 2, 2002

Publicación de la

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

Consultores:

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

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

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

ISSN 0365514-8 Versión Impresa

ISSN 1514259-0 Versión Electrónica

ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: CC 296 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

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

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

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

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

Dirección electrónica:

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

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

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

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX (www.latindex.unam.mx),
Ulrich's International Periodicals Directory (www.ulrichsweb.com)
Zoological Records
(www.biosis.org.uk/products_services/zrss.html).

Citación de la versión electrónica: La citación de los artículos aparecidos en la versión electrónica de ANALECTA VETERINARIA (VE) debería seguirse según el siguiente ejemplo:
Costa E.F. y col. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por Hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta Veterinaria* (VE) 1998; 18,1/2: 7-13 (7 pantallas). Recuperable de www.fcv.unlp.edu.ar

Citación de la versión CD-ROM: La citación de los artículos aparecidos en la versión en CD-ROM de ANALECTA VETERINARIA (CD-ROM) debería seguirse según el siguiente ejemplo:
Tittarelli C.M. y col. Efecto de las lluvias sobre la composición mineral de gramíneas y *Lotus glaber mill* del partido de Magdalena. *Analecta Veterinaria* (CD-ROM) 2001; 21,1: 54-57 (4 pantallas).

Impresión

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

Diseño

Prof.Dr. Nestor Oscar Stanchi

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

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



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

Impreso en Argentina
Printed in Argentina

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

Artículos de Investigación

Research articles

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

Artículos de Revisión

Review articles

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

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

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

Comunicaciones breves

Short communications

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

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

Artículos de Investigación

Research articles

ENSAYO DE TOXICIDAD DE UN POLÍMERO NATURAL PARA SU POSIBLE APLICACIÓN COMO IMPLANTE EN ANIMALES. The toxicity of a natural polycarbonate as a potential tissue implant in animals. An investigation. MM Luna, MC Brusa, A Stornelli, A Massone **7-14**

FRESH CITRUS PULP SUPPLEMENTATION EFFECTS ON WEIGHT GAIN AND PLASMA PROTEIN OF WINTERING COWS. Efectos de la suplementación con pulpa fresca de citrus sobre las ganancias de peso y proteínas plasmáticas de vacas de invernada. JA Coppo, NB Coppo, MA Revidatti, A Capellari, JM Navamuel, SA Fioranelli **15-21**

MODIFICACIONES DE LOS RESIDUOS AZUCARES EN LOS GLUCOCONJUGADOS DE LAS GLANDULAS SALIVALES LINGUALES DEL POLLO DURANTE SU DESARROLLO Y CRECIMIENTO. Changes in sugar residues of glycoconjugates of chicken salivary lingual glands during development and growth. ME Samar, RE Avila, A Massone, L Olmedo, FP Marino **22-31**

Comunicaciones breves

Short communications

ANALISIS DEL RENDIMIENTO DE LOS ESTUDIANTES DEL CURSO DE GENÉTICA Y BIOMETRÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, EN EL PERIODO LECTIVO 2000. Performance evaluation of the students of the genetics and biometrics, Faculty of Veterinary Sciences, National University of La Plata, 2000 AG Antonini, CA Grillo, FN Dulout **32-37**

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENOS EN VACUNAS ANTIRRÁBICAS DE USO VETERINARIO POR UNA PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA. Enzyme linked immunoassay for determination of antigens of veterinary rabies vaccine. G Miceli, ENosetto, J Esteves Madero, AM Díaz **38-41**

CAMPYLOBACTER JEJUNI EN UNA GRANJA DE POLLOS CAMPEROS. *Campylobacter jejuni* in a free-range poultry farm. G Giacoboni, C López, D Tellechea, A Agostini **42-47**

ENSAYO DE TOXICIDAD DE UN POLÍMERO NATURAL PARA SU POSIBLE APLICACIÓN COMO IMPLANTE EN ANIMALES

MM Luna¹, MC Brusa¹, A Stornelli², A Massone³

¹Servicio Central de Cirugía, ²Servicio Laboratorio,

³Instituto de Patología «B. Epstein». Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: El policarbonato (PC) es una extrusión de resina, polímero termoplástico duro, transparente en su forma natural, resistente al impacto, posee las propiedades de un biomaterial. Las aplicaciones más comunes del PC incluyen elementos de óptica, catéteres, dispositivos para biopsias e injertos óseos y envases de medicamentos y alimentos. El objetivo es establecer y comprobar la habilidad del PC para desarrollar una respuesta tisular apropiada como posible implante orgánico en un período de 180 días. Se trabajó con conejos de raza New Zealand para determinar si el implante induce toxicidad aguda o crónica. Para ello se implantó el material de estudio en tejido subcutáneo, abdomen y se fijo en el fémur utilizando tornillos convencionales de osteosíntesis. Los estudios hematológicos, los procedimientos quirúrgicos y exámenes histopatológicos se llevaron a cabo en los Servicios de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. El resultado de dichos estudios permite descartar la presencia de efectos tóxicos agudos o crónicos en los animales de experiencia. El aumento transitorio en los valores de las enzimas, pueden ser atribuidos al stress quirúrgico pues los mismos son similares a los hallados en el animal testigo. Se necesita repetir los estudios para determinar su posible utilización en otras especies animales.

Palabras clave: policarbonato, implante, biomaterial, toxicidad, canino

THE TOXICITY OF A NATURAL POLYCARBONATE AS A POTENTIAL TISSUE IMPLANT IN ANIMALS. AN INVESTIGATION.

ABSTRACT: Polycarbonate (PC) is an extrusion of a resin, a hard thermoplastic polymer, transparent in its natural form and impact resistant. It possesses the properties of a biomaterial. It is frequently used in optics, production of catheters, biopsies instruments, bone implants and containers for medicines and food. This study was designed to investigate the capabilities of PC to elicit an acceptable tissular reaction when used as an organic implants. PC plates were implanted in the subcutaneous tissue, abdomen and femur of pure bred New Zealand rabbits, regardless of age and sex, to determine acute and chronic toxicity. The plates were left in place up to 180 d. The results of this study indicate the absence of both acute or chronic toxicity, although a transient increase of certain serum enzymes, possibly due to the surgical stress, was observed. Further studies are needed in order to determine the potential use of PC in other species.

Key word: polycarbonate, implant, biomaterial, toxicity, dog

Fecha de recepción: 07/03/01

Fecha de aprobación: 28/11/02

Dirección para correspondencia: M.Brusa, Servicio Central de Cirugía. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

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

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de materiales alternativos para la fabricación de implantes de cirugía, surge de la necesidad de encontrar aquel que reúna las mejores características para una utilidad específica, sea su resistencia, fuerza, flexibilidad o valor económico. Además de los metales, acero inoxidable, titanio, aleaciones de cromo-cobalto, se utilizan polímeros, polietileno, polipropileno, nylon, cianoacrilatos, teflón, poliuretano, caucho, siliconas y también materiales cerámicos y carbón.

El policarbonato (PC) es una extrusión de resina, polímero termoplástico duro, transparente en su forma natural, resistente al impacto, posee las propiedades de un biomaterial (13). Los productores* de PC lograron estabilizar las uniones de los grupos hidocarbonos, otorgándole propiedades de compatibilidad sanguínea, resistencia a la abrasión, coeficiente de fricción, resistencia y degradación en implantes (11).

El Instituto Nacional de Salud en 1987 define al término *biomaterial* como: "cualquier sustancia o droga, o combinación de sustancias sintéticas o naturales que pueden ser usadas en un periodo de tiempo como un todo o en una parte de un sistema para reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo" (12). Se denomina *biocompatibilidad* a la habilidad del material de no producir alteraciones en los tejidos circundantes ni originar respuesta inmunológica en su aplicación específica (12).

Las aplicaciones más comunes del PC incluyen elementos de óptica, catéteres, dispositivos para biopsias e injertos óseos y envases de medicamentos y alimentos.

El objetivo es establecer y comprobar la habilidad del PC para desarrollar una respuesta tisular apropiada como posible implante orgánico en un período de 180 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con cuatro conejos de raza New Zeland provistos por el bioterio de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata. Se destinaron: conejo N° 1 testigo; conejo N° 2 para determinar toxicidad aguda; conejos N° 3 y 4 para determinar toxicidad crónica. El examen clínico de los animales confirmó su buen estado general y sanitario. Previa iniciación de las experiencias se les realizó la correspondiente evaluación hematológica y serológica. Los estudios sanguíneos se llevaron a cabo en el Servicio Central

de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena marginal de la oreja con etilen diamino tetracético (EDTA) y sin anticoagulante para la obtención de suero. Se realizó recuento de glóbulos rojos (GR), de glóbulos blancos (GB), hematocrito (Hto), dosaje de concentración de hemoglobina (Hb) por método colorimétrico \bar{A} y frotis teñido con May Grunwald Giemsa (MGG) para la observación de morfología celular y fórmula leucocitaria relativa. Las enzimas aspartato amino transferasa (AST), alanino amino transferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FA) se dosaron por test cuantitativo colorimétrico \wedge .

Los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en las instalaciones del Servicio Central de Cirugía de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata., ajustándose a los principios de la cirugía aséptica.

Experiencia: Pruebas pre-clínicas de toxicidad aguda y crónica.

Los conejos se prepararon para cirugía con un ayuno de sólidos de seis horas. Los animales se anestesiaron con una combinación de clorhidrato de ketamina (35 mg/kg), xilazina (5 mg/kg) y maleato de acepromacina (0,75 mg/kg) administrados por vía intramuscular.

Conejo N° 1.

Se realizó una laparotomía por línea media, de seis centímetros de longitud. Para la síntesis de la pared abdominal se utilizó poligalactina 910 3/0 y para la sutura de la piel nylon monofilamento 3/0. Se administró oxitetraciclina 200 mg, por vía subcutánea como dosis única y total

Conejo N° 2.

Se realizó una laparotomía por línea media de seis centímetros de longitud. Se implantó una placa rectangular de policarbonato compacto de 4 x 20 x 50 mm, con dos orificios de 2 mm de diámetro. La placa se esterilizó en autoclave. La misma se colocó en la cavidad peritoneal y se fijó a la pared abdominal mediante un punto de sutura con poligalactina 910 3/0 pasado a través de los dos orificios. Para la síntesis de los tejidos se procedió de manera similar al conejo N° 1.

En el mismo procedimiento operatorio se implantó otra placa de policarbonato de las mismas características que la anterior en el tejido subcutáneo de la región de la espalda, accediendo por una incisión cutánea de seis centímetros de longitud. Se fijó al tejido subcutáneo con el

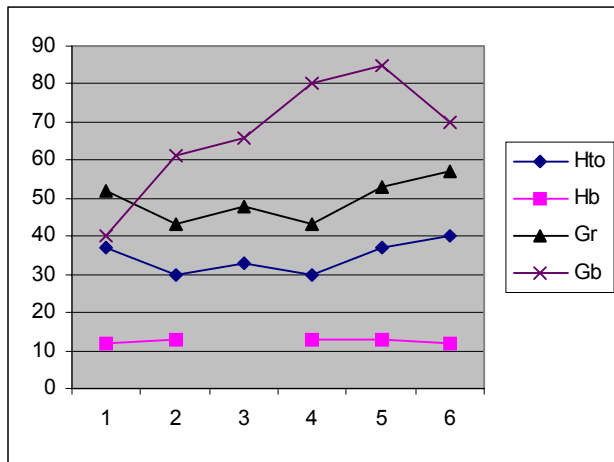


Figura 1. Registro de las principales variables hematológicas en el conejo n° 1

Fig.1 Main changes in hematologic parameters i rabbit n° 1

mismo material de sutura.

En el postoperatorio se aplicó 200 mg de oxitetraciclina por vía subcutánea. El conejo se mantuvo en las mismas condiciones que el testigo

Conejo N° 3:

Se abordó el cuerpo del fémur a través de una incisión lateral. Se implantó en la cara craneal de la diáfisis femoral una placa de policarbonato compacto de 3 x 10 x 40 mm, con dos orificios de 4 mm de diámetro. Se fijó al hueso utilizando la técnica convencional para la colocación de placas de osteosíntesis, con dos tornillos corticales de acero de 3,5 x 15 mm. En el momento de realizar los agujeros para la colocación de los tornillos se produjo una fractura laminar longitudi-

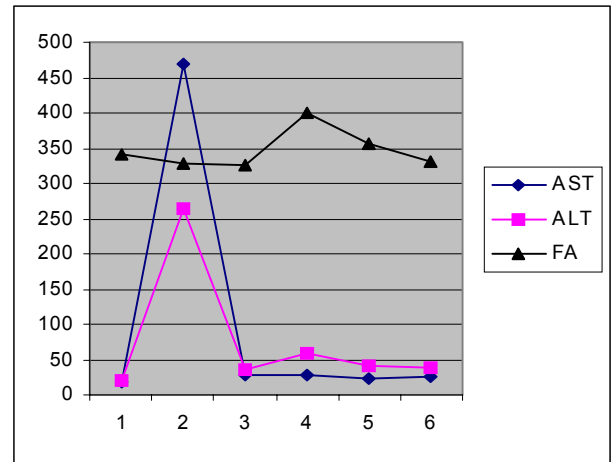


Figura 1. Registro de las principales variables enzimáticas en el conejo n° 1

Fig.1 Main changes in enzymes parameters i rabbit n° 1

nal del hueso, la cual se redujo e inmovilizó con la misma placa. El material de síntesis utilizado fue poligalactina 910 3/0 para la fascia y nylon monofilamento 3/0 para la piel. En el post operatorio se administró 200 mg de oxitetraciclina y 2 mg de clorhidrato de nalbufina por vía subcutánea. El conejo se mantuvo en las mismas condiciones de manejo que el resto de los animales.

Conejo N° 4:

Se realizaron los mismos procedimientos quirúrgicos detallados en el conejo N° 3. En este caso el hueso no se fracturó. En el postoperatorio se administró 200 mg de oxitetraciclina y 2 mg de clorhidrato de nalbufina por vía subcutánea. El conejo se mantuvo en las misma condiciones de manejo que el resto de los animales.

Tabla 1. Variación en los valores del hemograma y enzimas plasmáticas previos (azul) y posteriores (negro) a la cirugía del conejo n° 1.

Table 1. Changes in hematologic and chemical parameters before (blue) and after (black) surgery in rabbit n° 1.

Fecha	Hto.	Hb.	GR	GB	Fórmula leucocitaria						Ind. Hemat.			Bioquímica		
					NS	NB	E	B	L	M	hcm	vcm	chcm	AST	ALT	FA
18/8	37	12.6	5291x10 ³	4000	36	0	4	0	55	5	24.2	71	34	18	21	341
23/8	30	13.2	4290x10 ³	6100	64	0	2	0	34	0	31.4	71.4	44	470	265	329
27/8	33	---	4779x10 ³	6600	26	0	1	0	72	2		70		29	35	325
31/8	30	12.8	4290x10 ³	8050	26	0	0	0	73	1	30.4	71.4	42.6	28	60	400
2/9	37	13.4	5291x10 ³	8550	47	0	0	0	48	5	25.7	71.1	36.2	23	41	356
6/9	40	12	5720x10 ³	7050	42	0	0	0	55	3	21	70.1	30	25	39	330

Tabla 2 Modificación de los valores del hemograma y enzimas pre (azul(y post (negro) cirugía del conejo n° 2.

table 2.Changes in hematological and chemical parameters before (blue) and after (black) surgery in rabbit n°2.

Fecha	Hto.	Hb.	GR	GB	Fórmula leucocitaria						Ind. Hemat.			Bioquímica		
					NS	NB	E	B	L	M	hc m	vcm	chc m	AST	ALT	FA
18/8	43	15.3	6149x10 ³	4800	20	1	1	0	72	6	25	70.4	35.5	20	21	338
23/8	31	13.7	4433x10 ³	7000	76	0	1	0	22	0	31	70.4	44.1	740	265	319
27/8	31	-----	4433x10 ³	8300	21	0	2	0	77	0		70.4		23	35	298
31/8	32	11	4576x10 ³	10000	49	1	6	0	44	0	24.4	71.1	34.3	30	24	408
2/9	38	13.6	5434x10 ³	6250	36	0	3	1	60	0	25.1	70.3	35.7	8	19	129
14/9	30	10.8	4290x10 ³	8150	28	2	0	0	65	5	25.7	71.4	36	13	26	228
30/9 (zz)	28	11.6	4004x10 ³	7750	33	1	1	0	51	4	29	70	41.1	35	38	180

(zz) eutanasia

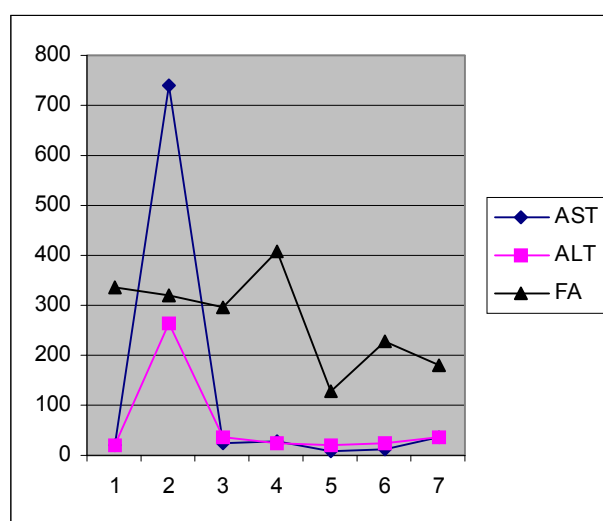
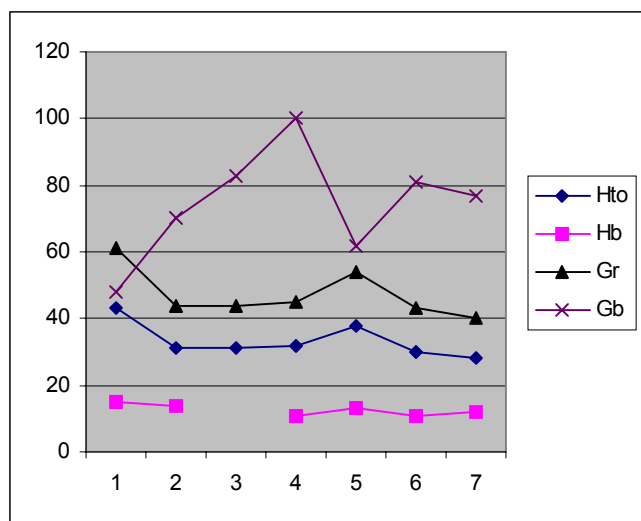


Figura 1. Registro de las principales variables hematológicas en el conejo n° 2

Fig.1 Main changes in hematologic parameters i rabbit n° 2

Figura 1. Registro de las principales variables enzimáticas en el conejo n° 2

Fig.1 Main changes in enzymes parameters i rabbit n° 2

RESULTADOS

Se efectuaron estudios hematológicos y serológicos seriados de cada conejo en los días siguientes a la intervención (Tablas 1, 2, 3 y 4).

Conejo n° 1 (testigo): En el postoperatorio se lo mantuvo en jaula y no se registraran alteraciones en su estado general. La cicatrización de la herida no presentó complicaciones.

Conejo n° 2: Se efectuó la eutanasia y necropsia a los cuarenta días del posoperatorio con el fin de realizar los estudios anatómo e histopatológicos de las vísceras y del tejido circundante al material implantado. Los estudios se realizaron en el Instituto de Patología Bernardo Epstein de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

El informe de los resultados es:

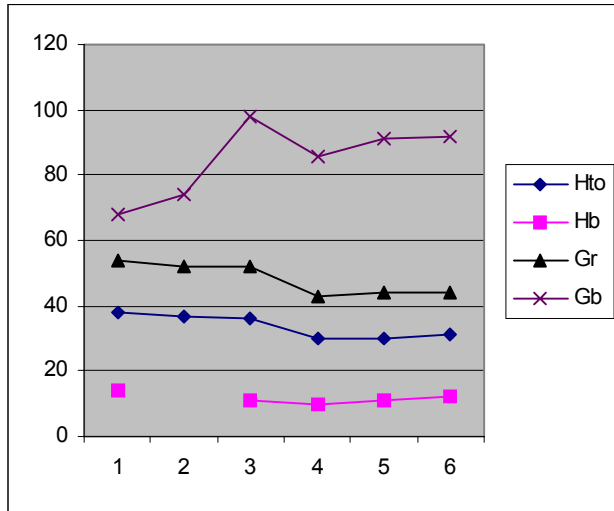


Figura 1. Registro de las principales variables hematológicas en el conejo n° 3

Fig.1 Main changes in hematologic parameters i rabbit n° 3

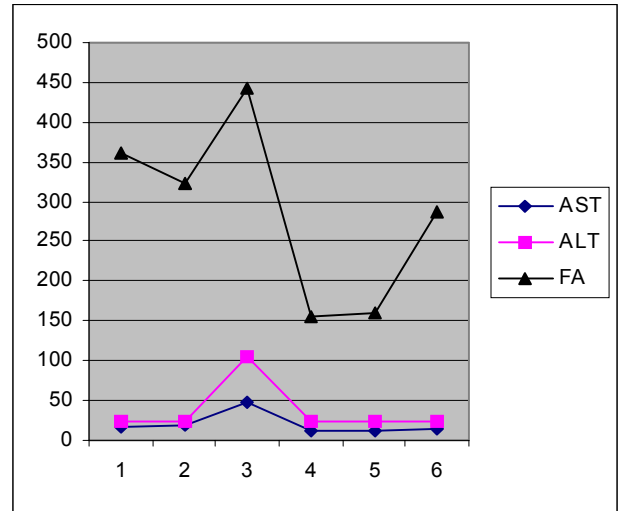


Figura 1. Registro de las principales variables enzimáticas en el conejo n° 3

Fig.1 Main changes in enzymes parameters i rabbit n° 3

Anatomopatológico: sin lesiones de carácter diagnóstico. Se hallan dos placas de policarbonato compacto en subcutáneo y cavidad peritoneal (foto n° 1).

Histopatológico de hígado, bazo, reacción en peritoneo y subcutáneo: Escasa reacción inflamatoria con escasa cantidad de macrófagos. No se observan polimorfonucleares.

Conejo n° 3: A los veinte días de operado se realizó el control radiográfico para determinar la presencia de cambios radiológicos en el hueso. Se

observaron imágenes compatibles con el proceso de consolidación normal de la fractura. La cicatrización de la herida no presentó complicaciones ni se registraron alteraciones en su estado general. Se efectuó la eutanasia y necropsia a los treinta días con la finalidad de realizar los estudios anatómo e histopatológicos de las vísceras, hueso y tejido circundante al material implantado. El informe de los resultados es:

Anatomopatológico: Se observa en el fémur izquierdo una línea de fractura con perfecta apo-

Tabla 3. Modificación de los valores del hemograma y enzimas pre (azul) y pos (negro) cirugía del conejo n° 3.

Table 3. Changes in hematological and chemical parameters before (blue) and after (black) surgery in rabbit n° 3.

Fecha	Hto.	Hb.	GR	GB	Fórmula leucocitaria						Ind. Hemat.			Bioquímica		
					NS	NB	E	B	L	M	hcm	vcm	chcm	AST	ALT	FA
18/8	38	13.6	5434x10 ³	6850	15	0	2	0	78	5	25.1	70.3	35.7	17	25	362
27/8	37	-----	5291x10 ³	7400	32	0	4	0	64	0		71.1		20	24	323
31/8	36	11	5200x10 ³	9850	65	0	0	0	35	0	21.1	69.2	30.5	48	106	443
2/9	30	10.6	4290x10 ³	8600	33	0	0	0	57	10	25.2	71.4	35.3	11	24	156
14/9	30	11	4404x10 ³	9100	33	0	0	0	56	1	25	68	36,6	13	24	160
30/9 ZZ	31	11,5	4433x10 ³	9250	32	1	3	0	62	2	26,1	70,4	37	15	25	288

(zz) eutanasia

Tabla 4. Modificación de los valores del hemograma y enzimas plasmáticas pre (azul) y pos (azul) cirugía del conejo n° 4.

Table 3. Changes in hematological and chemical parameters before (blue) and after (black) surgery in rabbit n° 4.

Fecha	Hto.	Hb.	GR	GB	Fórmula leucocitaria						Ind. Hemat.			Bioquímica		
					NS	NB	E	B	L	M	hcm	vcm	Chcm	AST	ALT	FA
18/8	47	16.1	6421x10 ³	4750	26	0	0	0	70	4	24	70	34.2	14	21	332
27/8	39	-----	5557x10 ³	8200	41	0	1	0	58	0		70.9		41	18	119
31/8	36	10.7	5148x10 ³	11250	52	1	0	2	45	0	20.9	70.5	29.7	85	74	504
2/9	30	11.3	4250x10 ³	17150	61	0	0	0	23	16	26.9	71.4	37.6	10	14	113
14/9	32	12.2	4576x10 ³	12050	41	0	1	0	53	5	27	71.1	38	22	23	241
29/10	32	12	4576x10 ³	9650	49	1	0	0	50	0	26.6	70	37.5	7	79	243
14/11	33	12	4850x10 ³	9860	51	0	0	0	49	0	25	68	36,3	9	67	250
30/11	32	12,3	4750x10 ³	9500	47	0	0	1	47	5	26,1	55,3	38,4	11	65	270
15/12	30	11,9	4850x10 ³	9670	50	1	0	0	47	2	24,8	62,5	39,6	16	52	256
30/12	32	12	4575x10 ³	9850	52	0	0	1	46	1	26,6	71	37,5	22	38	165
10/03	35	13	5000x10 ⁰	10700	50	0	2	0	47	1	26	70	37	14	24	74
zz																

(zz) eutanasia

sición de los cabos óseos. El callo sobre ella formado presenta superficie lisa, sin adherencia a tejidos vecinos. La placa de PC colocada sobre la fractura se encuentra perfectamente inmovilizada sobre el hueso, sin adherencias a músculos y sin presencia de exudados sobre su superficie. El resto de los órganos no presentan lesiones diagnósticas.

Histopatológico : callo de fractura, con condrocitos, osteocitos, vasos de noviformación e inicio de calcificación de la matriz ósea. (Foto n° 2. H&E 10x) No se observan exudados ni células inflamatorias. El resto de los órganos estudiados (músculo, riñón, bazo, hígado, pulmón y corazón) no presentan lesiones diagnósticas.

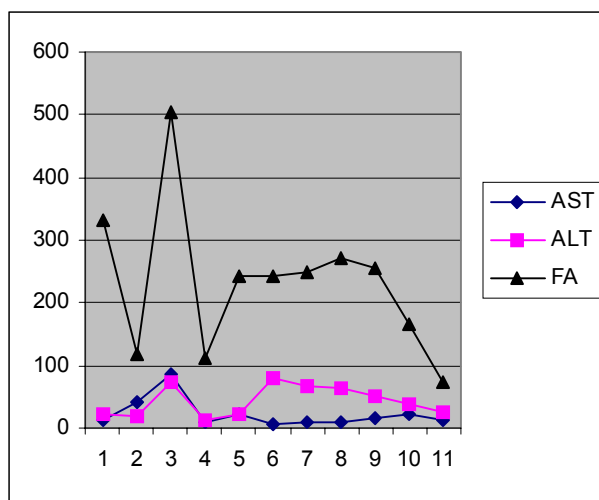
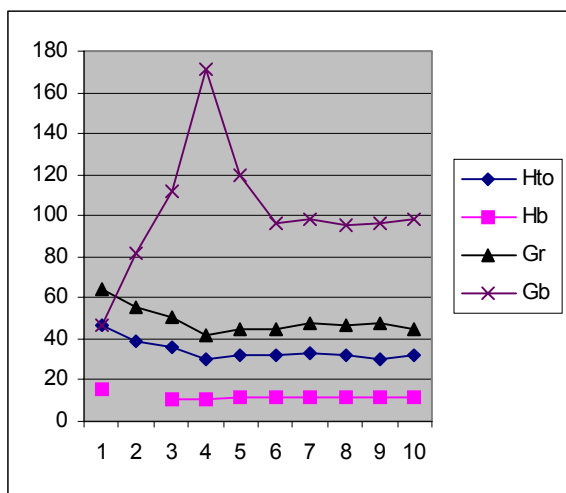


Figura 1. Registro de las principales variables hematológicas en el conejo n° 4

Fig.1 Main changes in hematologic parameters i rabbit n° 4

Figura 1. Registro de las principales variables enzimáticas en el conejo n° 4

Fig.1 Main changes in enzymes parameters i rabbit n° 4



Foto n 1. Placa de policarbonato en cavidad peritoneal.

Photo n 1. PC plate in abdominal cavity.

Conejo n° 4: Al cuarto día de operado se detectó la formación de un absceso en la zona de la herida quirúrgica. Se realizó el drenaje del mismo y se continuó con la antibióticoterapia hasta su resolución. Se realizó el control radiográfico a los veinte días para determinar la presencia de cambios radiológicos en el hueso, observándose imágenes normales. Se efectuó la eutanasia y necropsia a los ciento ochenta días con la finalidad de realizar los estudios anátomo e histopatológicos de las vísceras, hueso y tejido circundante al material implantado. El informe de los resultados es:

Anatomopatológico: sobre el fémur izquierdo se observa una placa de PC fijada con tornillos al hueso, sin adherencia a tejidos vecinos y sin reacción periostial evidente (foto n° 3).

Histopatológico: el hueso y el periostio sobre los que se hallaba la placa de PC no presenta lesiones ni presencia de exudado y células inflamatorias. El resto de los órganos estudiados no presentan lesiones diagnósticas.

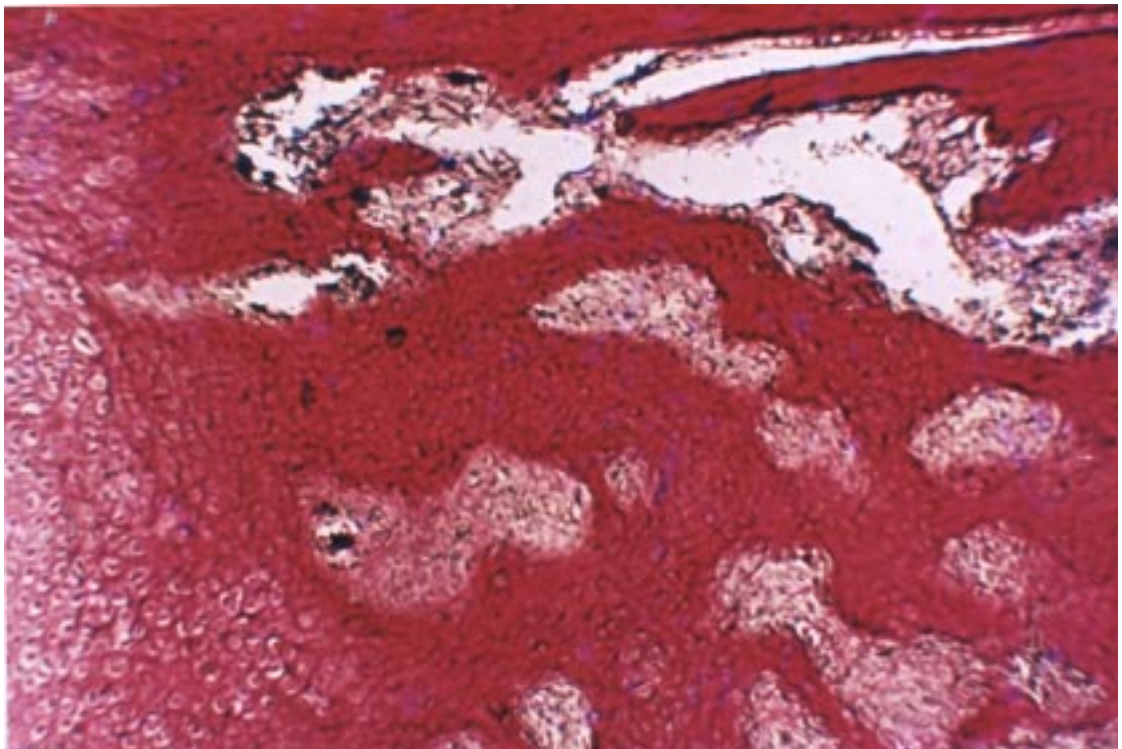


Foto n 2. Histopatología del callo de fractura.

Photo n 2. Histological view of callus.



Foto n° 3. Placa en fémur.
Photo n° 3. PC plate in femur.

DISCUSIÓN

Las alteraciones en los resultados de los estudios serológicos, representados por el aumento transitorio en los valores de las enzimas, pueden ser atribuidos al stress quirúrgico pues los mismos son similares a los hallados en el animal testigo. El posterior descenso y mantenimiento de los valores basales a mediano y largo plazo (180 días) ponen de manifiesto la ausencia de efectos tóxicos del material implantado (3, 10).

La leucocitosis neutrofilica registrada en el conejo N° 4, se asocia a la formación del absceso descrito.

Los resultados de la observación histopatológica de los diferentes órganos blanco, en contacto directo o no con el implante, tampoco mostraron signos de anormalidad.(¿)

El proceso de cicatrización ósea, evaluado por seguimiento radiológico y por estudio anatómico e histopatológico no mostró signos de anormalidad y se produjo en el tiempo esperado.

El material implantado no genera efectos tóxicos agudos o crónicos en el conejo durante el lapso de tiempo establecido en 180 días.

El material implantado no interfiere con el proceso biológico de cicatrización de los tejidos blandos y duros.

Los resultados permiten pensar en la posible utilización del PC en otras especies animales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Slatter D. Manual de cirugía en pequeñas especies. Ed McGraw-Hill Interamericana. Mexico 1997
2. Rosenberg A. Skeletal System and Soft Tissue Tumors. In Pathologic Basis of Disease. Contran R, Kumar V, Robbins S. 5th Edition, California, 1994. p. 1213-1272
3. Flecknell PA. Laboratory Animal Anaesthesia, An Introduction for research workers and technicians. Academic Press. New York 1987
4. Manning PG, Ringer DH, Newcomer CE. The biology of the laboratory rabbit. Academic Press. New York 1994
5. Flecknell PA. Post-operative analgesia in rabbits and rodents. *Laboratory Animal*; 1991, 20 (9): 34:37.
6. Jenkins WL. Pharmacologic aspects of analgesic drugs in animals: an overview. *Jour Am Vet Med Assoc* 1987, 191 (10): 123-140.
7. Schalm OW, Jain NC, Carroll EJ. Hematología Veterinaria. Hemisferio Sur Buenos Aires 1981.
8. Meyer & Harvey: El Laboratorio en Medicina Veterinaria. Interpretación y diagnóstico. Intermédica 1999
9. Haw Key CM, Dennet TB. Atlas de Hematología Veterinaria Comparada. Ed Grass 1989
10. Duncan RJ, Prasse KW. Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology. The Iowa State University Press. 1977
11. Medical Device & Diagnostic Industry. 1997
12. <http://bmewww.eng.uab.edu/BME/MORE/research-activities/labs/Corrosion/biomat.htm>
13. <http://208.135.225.38/orgs/bayer/unpro/ku/makrolon/2458.htm>

* Polymer Technology Group

À reactivo de Drabkin

^ Reflotrom tipo IV Boehringer Mannheim

FRESH CITRUS PULP SUPPLEMENTATION EFFECTS ON WEIGHT GAIN AND PLASMA PROTEIN OF WINTERING COWS

JA Coppo, NB Coppo, MA Revidatti, A Capellari, JM Navamuel, SA Fioranelli

Cátedras de Fisiología y Zootecnia General,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste.

ABSTRACT . Fresh citrus pulp is an energy supplement (TDN > 80%) with low protein concentration (7-8%), that is reason why it requires additional nitrogen when it is feed to growing cattle. In order to verify the effect of a citrus by-product (without nitrogen addition) on live weight gain and nitrogen plasma parameters, 80 wintering half-bred zebu cows grazed on native grassland, were used. During 2 consecutive years, twenty animals were allotted to control (C) and another 20 were supplemented (S) with fresh citrus pulp (15 ± 3 kg/animal, during 4 months). Periodic weighing and blood sampling were carried out at 0, 30, 60, 90 and 120 days. Data were statistically processed using a repeated measures design, with mean comparisons by orthogonal contrasts. In both years, S registered higher live weight change rates (492 versus 304 and 352 versus -73 g/animal/day), total protein (8.18 ± 0.41 versus 7.30 ± 0.33 and 7.95 ± 0.38 versus 7.18 ± 0.39 g/dl), albumin (3.57 ± 0.36 versus 2.92 ± 0.35 and 3.20 ± 0.37 versus 2.59 ± 0.32 g/dl), γ globulin (2.80 ± 0.46 versus 2.64 ± 0.42 and 3.23 ± 0.40 versus 3.12 ± 0.44 g/dl) and urea (0.30 ± 0.08 versus 0.24 ± 0.05 and 0.30 ± 0.05 versus 0.26 ± 0.07 g/l). Differences were significant ($p < 0.05$) in many cases. The α and β globulins fluctuated irregularly, and the albumin / globulin ratio increased in S and decreased in C. Mean comparison tests showed that in most of the cases the differences between C and S began to be significant at day 60 of the study. Proteic metabolism nutritional indicators improvement and weight gains reveal that this cheap industrial residue is useful for fattening of wintering cows, yet without nitrogen addition.

Key Words: citrus pulp, supplementation, wintering cows, weight gain, plasma protein

EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON PULPA FRESCA DE CITRUS SOBRE LAS GANANCIAS DE PESO Y PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE VACAS DE INVERNADA

RESUMEN: La pulpa fresca de citrus es un suplemento energético (TND > 80%) con escasa concentración proteica (7-8%), por lo que requiere nitrógeno adicional cuando se destina a la alimentación de ganado en crecimiento. El propósito de este trabajo fue verificar el efecto de este subproducto agroindustrial (sin refuerzo nitrogenado) sobre las ganancias de peso y los parámetros plasmáticos nitrogenados de vacas de invernada cruce cebú ($n = 80$) mantenidas sobre pastura natural. En dos años consecutivos, 20 animales operaron como controles (C) y otros 20 fueron suplementados (S) con pulpa fresca de citrus (15 ± 3 kg/animal, durante 4 meses), efectuándose pesajes y muestreos sanguíneos a los 0, 30, 60, 90 y 120 días. Con relación a C, las estadísticas finales para cada año indicaron que en S se registraron mayores cambios de peso (492 versus 304 y 352 versus -73 g/animal/día), así como más altos niveles de proteínas totales (8.18 versus 7.30 y 7.95 versus 7.18 g/dl), albúminas (3.57 versus 2.92 y 3.20 versus 2.59 g/dl), γ globulinas (2.80 versus 2.64 y 3.23 versus 3.12 g/dl) y urea (0.30 versus 0.24 y 0.30 versus 0.26 g/l), diferencias que en varios casos fueron significativas ($p < 0.05$). Los valores de α y β globulinas fluctuaron irregularmente, en tanto que la relación albúminas / globulinas aumentó en S y disminuyó en C. La mejora de los indicadores nutricionales del metabolismo proteico y las ganancias de peso revelan que este económico residuo industrial es útil para el engorde de vacas de invernada, aún sin adición nitrogenada.

Palabras Claves: pulpa de citrus, suplementación, vacas de invernada, ganancia de peso, proteínas plasmáticas

Fecha de recepción: 21/03/02

Fecha de aprobación: 10/03/03

Dirección para correspondencia: José Antonio Coppo, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE. Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. Tel./Fax 03783-425753

E-mail: jcoppo@vet.unne.edu.ar

INTRODUCTION

Up to now, in the northeast of Argentina exist about 10 millions cattle, half of which are bred in Corrientes Province. The seasonal growth of native grassland is the main obstacle for regional livestock development, and average meat production is about 30 kg/ha/year. Most of the year, native grasses have low nutritive value, with dry matter digestibility lower than 50% and significant energetic-proteic deficiencies in winter, with protein levels of 4% and metabolizable energy rates of 1.8 to 2 Mcal/kg dry matter, DM (1).

Energetic-proteic supplementation using inexpensive regional by-products was identified as one of the main demands of beef cattle producers in a survey conducted by INTA (2). The area has plenty of citrus plantations, as well as fruits juice factories. Citrus pulp is a by-product of citric juice industries. It has high energy value as ruminant food (3, 4). However, due to limited protein concentration, it is necessary to add nitrogen from another source when the diet is being balanced for growing animals (5).

Cow-calf operations based on British x Zebu (BxZ) cattle predominates in the region; this rustic crossbreed is more efficient using nutrients than others bovine breeds (6). In such systems, older and reproductive unsuccessful cows are normally culled after fattening in late autumn, as a low price category ("conserve", for canned meat). In order to optimize economic yield, the current strategy consists of improving the animals winter feed through supplementation, thus obtaining a *fattened* cow in early spring, when the price of this type of cattle increases (7).

The purpose of this study was to verify live weight change (LWC) and potential modifications of some nitrogen biochemical indicators in BxZ wintering cows grazing native grassland and supplemented exclusively with citrus by-products (without addition of nitrogen), in a subtropical area characterized by scarce quality and quantity of feed.

MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out in the Bella Vista Department, of the Corrientes province in Argentina. A total of 80 BxZ wintering cows were maintained in two paddocks with a homogeneous quantity and quality of native grassland (NG). It was mainly composed with *Paspalum notatum*, *Paspalum dilatatum*, *Desmodium sp.*, *Trifolium sp.*, *Andropogon lateralis*, *Sorghastrum agrostoides*,

Schizachirium spicatum, *Aristida sp.*, *Vicia sp.*, *Acacia coven*, *Celtis spinosa*, and *Geofroea decorticans*. Twenty cull-type cows were supplemented for 4 months (autumn-winter) with 15 ± 3 kg/animal/day of fresh citrus pulp (supplemented group, S), while the remaining 20 (control group, C) did not receive any supplementation. The same experimental design was repeated the following year, with animals of similar characteristics.

In both years, studies began in late autumn (June). Both groups were set stocked (0.6 animal/ha) on NG, which had an average pasture cover of 2,200 and 1,800 kg of DM/ha in the 1st and 2nd year, respectively. DM *in vitro* digestibility (IVD), crude protein (CP) and energy density (ED) of NG were 48%, 4-6% and 1.7-1.8 Mcal ME/kg DM. The pasture offer (DM per animal) was 3,600 kg in the first year and 3,000 kg during the second year.

The nutritional characteristics of offered citrus pulp were: DM 21%, CP 7.6%, crude fiber 17.7%, ether extract 4.5%, ash 4.5%, nitrogen-free extract 65.7%, phosphorous 0.17%, calcium 0.54%, sodium 0.03%, potassium 0.50%, magnesium 725 mg/kg, manganese 15 mg/kg, zinc 78 mg/kg, iron 83 mg/kg and copper 15 mg/kg, and 3.62 Mcal of gross energy per kg DM. Average IVD was 87%.

During both years, animals were weighed, and jugular venepuncture blood samples were collected at days 0, 30, 60, 90 and 120 of the trial. Clotted blood was centrifuged (700 g, 10 min) in order to obtain serum, which was kept at 4 °C until assayed. Total protein (biuret method, 540 nm, Wiener reagents) and urea (urease technique, 546 nm, GT-Lab reagents) were measured in a Gilford-Beckman photometer. Protein fractions were separated by electrophoresis in a Chemar CHF-I-3 apparatus, on cellulose acetate support (Bio-systems), veronal buffer (Merck), amidoschwartz coloration (Biopur), and evaluated by using a Citocon 440 densitometer (8, 9).

Statistically, initial homogeneity was verified by the overlapping of confidence intervals (95% CI) and the normality of distribution was assessed using the Wilk-Shapiro test (WS). Parametric descriptive statistics included indicators of central tendency (arithmetic mean, \bar{x}) and dispersion (standard deviation, SD). Analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was calculated, including the significance of the treatment and time effects, as well as the interaction between them.

Table 1. Descriptive statistics ($\bar{x} \pm SD$) in supplemented (S) and control (C) animals.Tabla 1. Estadísticas descriptivas ($\bar{x} \pm DE$) en animales suplementados (S) y controles (C).

parameter	lot	year 1		year 2	
		initial (n = 20)	final (n = 20)	initial (n = 20)	final (n = 20)
live weight (kg)	C	406.5 \pm 33.2	443.0 \pm 28.5 *	383.8 \pm 37.6	375.0 \pm 35.3
	S	428.0 \pm 39.3	487.1 \pm 31.8 *	390.5 \pm 30.8	432.8 \pm 25.9 *
total protein (g/dl)	C	7.40 \pm 0.32	7.30 \pm 0.33	7.36 \pm 0.35	7.18 \pm 0.29 *
	S	7.31 \pm 0.26	8.18 \pm 0.41 *	7.42 \pm 0.34	7.95 \pm 0.38 *
albumin (g/dl)	C	3.08 \pm 0.20	2.92 \pm 0.35	3.07 \pm 0.28	2.59 \pm 0.32 *
	S	3.05 \pm 0.27	3.57 \pm 0.36 *	2.89 \pm 0.23	3.20 \pm 0.37 *
α globulin (g/dl)	C	0.73 \pm 0.10	0.75 \pm 0.13	0.65 \pm 0.11	0.61 \pm 0.08
	S	0.77 \pm 0.08	0.83 \pm 0.12	0.62 \pm 0.09	0.65 \pm 0.13
β globulin (g/dl)	C	0.96 \pm 0.13	0.99 \pm 0.19	0.88 \pm 0.14	0.86 \pm 0.11
	S	0.94 \pm 0.18	0.98 \pm 0.12	0.85 \pm 0.09	0.87 \pm 0.10
γ globulin (g/dl)	C	2.63 \pm 0.40	2.64 \pm 0.42	2.76 \pm 0.33	3.12 \pm 0.44 *
	S	2.55 \pm 0.31	2.80 \pm 0.46 *	3.06 \pm 0.41	3.23 \pm 0.40 *
alb./glob. ratio	C	0.71 \pm 0.08	0.67 \pm 0.12	0.72 \pm 0.09	0.56 \pm 0.07 *
	S	0.71 \pm 0.10	0.77 \pm 0.08	0.64 \pm 0.10	0.67 \pm 0.11
urea (g/l)	C	0.33 \pm 0.04	0.24 \pm 0.05 *	0.31 \pm 0.04	0.26 \pm 0.07 *
	S	0.34 \pm 0.04	0.30 \pm 0.08	0.32 \pm 0.06	0.30 \pm 0.05

* final data statistically different from the initial ($p < 0.05$)

Following the ANOVA, the significance of differences between groups C and S on each day was estimated by orthogonal contrasts. Correlation was obtained by Pearson method (10). Statistical significance in this paper refers to the 5% level ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Descriptive statistics of supplemented and control groups during two years are shown in *Table 1*. Obtained values are in agreement to those reported with similar crossbreed, age, feeding type and geographical area (11). For each parameter, initial values were statistically homogeneous (CI \pm 95%) and distribution (WS) was close to the normal (10).

Total LWC was significantly higher in S than in C, in both assays. During the first year, climatic benign winter promoted a higher pasture availability (2,200 kg DM/ha), so the LWC were higher in S (492 g/animal/day) than in C (304 g/

animal/day). During the second year (harsh), pasture yield was lower (1,800 kg DM/ha) and control cows lost weight (-73 g/animal/day) while S showed only gains of 352 g/animal/day.

Treatment and time effects were significant in both groups, while the interaction treatment by time was not significant. Means comparisons by orthogonal contrasts revealed that LWC differences between C and S began to be significant at day 30 in both, the first and second year. *Figure 1* shows the average LWC registered at every sampling date, standing out the biggest final gains in S.

Previous studies (12) had shown that when supplementing wintering half-bred zebu cows with brewery residues, there were positive LWC in supplemented groups (314 g/animal/day) and losses in control groups (-128 g/animal/day). Furthermore, in northeastern Argentina, a study using the same type of cattle supplemented with cottonseed showed increases of 292 g/animal/day, whereas controls only gained 51 g/animal/day

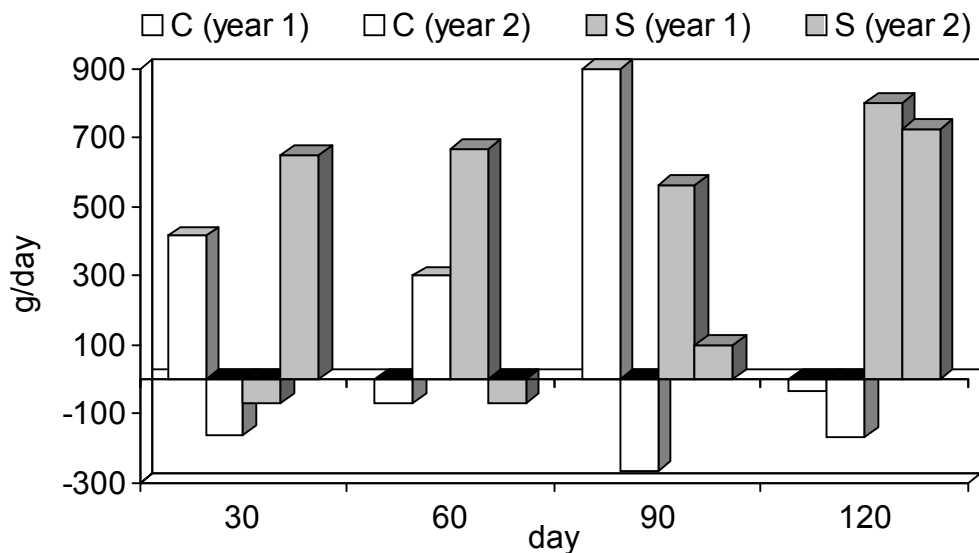


Figure I. Weight gain evolution in supplemented (S) and control (C) animals.
 Figura I. Evolución de la ganancia de peso en animales suplementados (S) y controles (C).

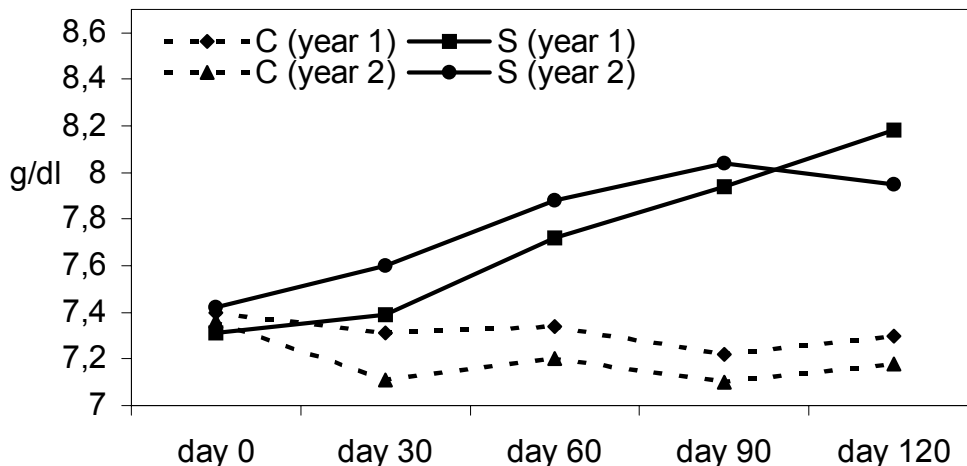


Figure II. Total protein evolution in supplemented (S) and control (C) animals.
 Figura II. Evolución de proteínas totales en animales suplementados (S) y controles (C).

(13). By offering increased amounts of citrus pulp (14) or citric residues mixed with other complements (15), some researchers obtained weight gains from 236 to 1100 g/animal/day.

Total protein (TP) decreased in C during both years (Table 1), although only in the 2nd year differences were statistically significant ($p < 0.05$). S increased significantly TP in both experiments. There was no time x treatment interaction for these parameters. Differences between treatments were

significantly stood out after 60 days of assays (Figure II). Similar results as TP were showed by albumins in both assays. However, differences between C and S began to be statistically significant at day 30 (year 1) and day 60 (year 2) (Figure III).

Serum protein makes up the cow nutritional chemistry panel (8). To synthesize albumin, fibrinogen, and 50% of globulins, the liver requires amino acids, coming directly or indirectly from the diet (11, 16), and immune system needs be able to

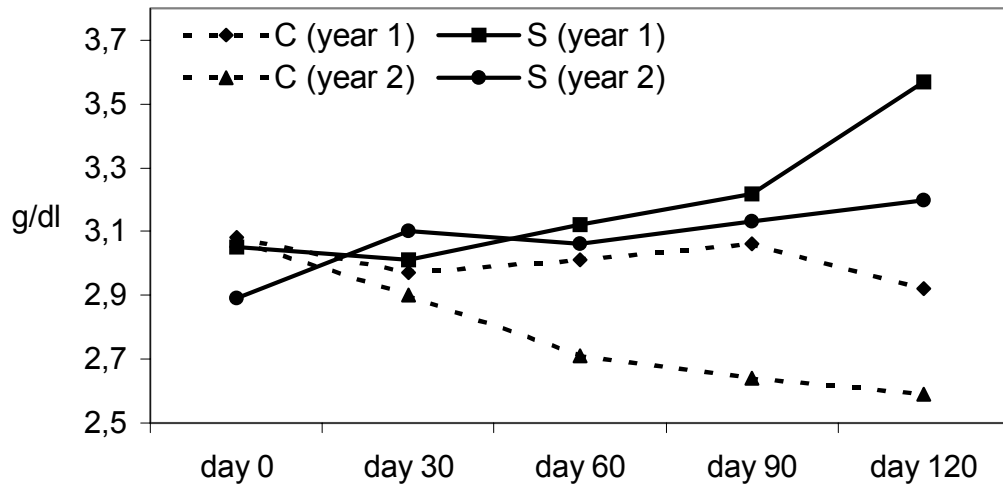


Figure III. Albumin evolution in supplemented (S) and control (C) animals.

Figura III. Evolución de albúminas en animales suplementados (S) y controles (C).

elaborate the remaining 50% of globulins (antibodies). Plasmatic decreases of total protein in C should be related to the pasture winter impoverishment (17) and increases in S to the additional nitrogen supplied (18).

Less food availability in winter could cause the decline of this parameter in C (17), while the enhance in S should necessarily be by the supplementation: albuminemia changes directly proportional to the protein intake (8, 19), decreasing in subnutrition, malabsorption, hepatopathy and other illness (8, 9).

There was not significance ($p < 0.05$) in α globulins for treatment, time, or treatment x time effects. Orthogonal contrasts did not detect differences between means. The levels of this proteic fraction usually are modified by inflammations, hepatic, renal and other dysfunctions (16). α globulins include the high density lipoproteins (HDL), in charge of the cholesterol reverse transport system; dietary lipid excess increases HDL in ruminants (11, 20). Evidently, the quantity of citrus pulp ether extract (4%) was not enough to alter the proteinogram in S.

No treatment, time, or treatment x time effects were detected for β globulins. However, they presented a trend similar to those of LWC. β globulins are important from a nutritional point of view, because they make the cholesterol direct transport (LDL), and mobilize heavy metals (Fe, Zn, Cu), vitamin D and some hormones (11).

γ globulins increased significantly in S, in

both years. In the case of C, they dropped in the 2nd year ($p < 0.05$), with no change in the first trial. Treatment and time effects were significant, but not their interaction. Significant differences between means started at day 60. Besides giving viscosity to the plasm, generating colloid osmotic pressure, and participating in the acid-base balance, γ globulins operate as antibodies and, like others seric proteins, they could be altered by subnutrition (8, 11).

The albumins / globulins ratio decreased in C (significantly during the second year). Although protein content of citrus pulp was low, when a more climatically rigorous winter was presented (lower quantity and quality of NG), supplementation was able to maintain the albumins / globulins ratio.

Urea was initially homogeneous in both groups of each assay ($IC \pm 95\%$), but progressively decreased along the trials in C ($p < 0.05$). Treatment and time effects were significant. Treatment effect began to be different at 60 and 30 days, for the 1st and 2nd year, respectively (results not shown).

Plasma urea level is able to indicate the quantity of nitrogen contained in diet; thus, its decrease in C should be related with CP deficit (19). Citrus pulp addition attenuated the decrease of urea (9). During cattle growth (calves, steers, heifers), citrus pulp should be accompanied with urea to increase the nitrogen supply, avoiding the fall of ruminal ammonium (21). This fact would not be so important in fattening animals as wintering cows, because just the citrus pulp supple-

ment (7.6% CP) was able to keep stable blood urea values.

In S, LWC significantly correlated with TP ($r = 0.98$, $p = 0.0003$) and albumin ($r = 0.93$, $p = 0.02$), while albumin revealed positive lineal association with TP ($r = 0.90$, $p = 0.03$), during the 1st year. In the 2nd one, significant correlation between LWC and albumin ($r = 0.97$, $p = 0.004$) was registered in S.

Secondary effects attributed to the supplement were not verified. It is known that citrus pulp could produce ruminal parakeratosis in calves (22); in adult ruminants, it could cause diarrhea (18) and carry viscerotropic pesticides (23), as well as hemorrhage-causing aflatoxins like citrinin (24). In birds it causes hepatomegaly, with up to 97% mortality (18). References about hepatic alterations induced in ruminants by citrus residue ingestion, such as those reported for other agroindustrial by-products as cottonseed (25), were not found.

In conclusion, the results of this study suggest that citrus pulp, without nitrogen addition, is able to increase weight gain and plasma concentrations of total protein, albumin and γ globulin in supplemented wintering cows ($p < 0.05$). Increase of weight correlated significantly with plasma increases of total protein (first year) and albumin (both years). The supplementation with this agroindustrial residue is able to lessen plasma urea decrease by the winter pasture impoverishment, and did not cause undesirable secondary effects.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr Patricia Koscinczuk, for the revision of English language. The financial support of Wiener and GT-Lab enterprises, as well as SGCYT-UNNE (PI 17B/065), is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Peruchena CO, D'Ascanio G, Valdivia G. Suplementación invernal de novillos con grano de sorgo y semilla de algodón sobre un pastizal natural diferido de otoño. Boletín N° 40, INTA Reconquista, p. 1-8, 1992.
2. INTA: Informe Anual de Planes de Trabajo. Boletín Documentos Institucionales N° 55, 59 p., Buenos Aires, 1992.
3. Ammerman CB, Henry PR. Utilización de subproductos cítricos para ganado. Memorias de la Conferencia Internacional sobre Ganadería Tropical, Florida Univ., p. 66-73, 1992.
4. Brown WF. Wet and dry citrus pulp are both good feed for cattle. The Florida Cattle & Livestock J. 12:

1990.

5. Aguilera JF. Aprovechamiento de subproductos agroindustriales en la alimentación de rumiantes. Prod Anim. 9: 4, 253-267, 1989.
6. Howes JR. Potencial digestivo del Brahman comparado con el de Hereford. Cebú 36: 443, 36-38, 1989.
7. Biani RD, Collia JA. Suplementación invernal de vacas refugio. Gaceta Agron. 2 (9): 727-730, 1982.
8. Coles EH. Veterinary Clinical Pathology, 4° ed., Saunders, Philadelphia, 1989.
9. Piquer JG. Análisis Clínicos en Veterinaria, Ed. Mira, Zaragoza, 1992.
10. Steel RG, Torrie JH. Principles and Procedures of Statistics, 2° ed., MacGraw-Hill, New York, 1992.
11. Coppo JA. Fisiología Comparada del Medio Interno, Ed. Dunken, Buenos Aires, 2001.
12. Capellari A, Revidatti MA, Slanac AL, Coppo NB. Suplementación de vacas de invierno con hez de malta. Anales XIII Sesión de Comunicaciones Científicas, Fac. Cs. Vet. UNNE, p. 14. Corrientes, 1992.
13. Coppo JA, Scorza SH, Coppo NB. Biochemical profiles of argentine cattle supplemented with cottonseed. RIA 25 (3): 91-102, 1994.
14. Kuvera JC, Nazar BH, Alfaro MA. Utilización de la pulpa deshidratada de cítricos en la alimentación de los rumiantes. Biotam 5 (1): 1-5, 1993.
15. Ghisi JJM. La pulpa de citrus en la alimentación del ganado vacuno. Boletín de Extensión N° 29 del INTA de Concepción del Uruguay, p. 1-6, 1968.
16. Kaneko JJ. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 3° ed., Academic Press, San Diego, 1989.
17. Mufarrege D. Distribución estacional de nutrientes para el ganado en pastizales del nordeste argentino. Informe Anual INTA Mercedes (Corrientes), p.102-107, 1993.
18. Morrison FB. Alimentos y Alimentación del Ganado, 21° ed., Uteha, México, 1980.
19. Flores A, Engler A. Relación entre el nitrógeno no proteico ruminal y la urea sérica en bovinos. Therios 19 (94): 281- 290, 1992.
20. Coppo JA. Effects of dietary lipidic charge in the concentration of bovine lipids and lipoproteins. Acta Physiol. 40 (3): 289-297, 1990.
21. Pinzon FJ, Wing JM. Effects of citrus pulp in high urea rations for steers. J Dairy Sci. 59 (6): 1100-1103, 1976.
22. Santos A, Aguilera E. Niveles de sustitución de harina de maíz por pulpa de cítricos deshidratada en concentrados para terneros. Rev Cub Cs Agric 15: 141-147, 1981.
23. Nigg HN, Reinert JA, Fitzpatrick GE. Acephate and methamidophos residue behavior in Florida citrus. Pestic Monit J. 12 (4): 167-171, 1979.

24. Griffiths IB, Done SH. Citrinin as a possible cause of the pruritus, pyrexia, haemorrhagic syndrome in cattle. *Vet Rec* 129 (6): 113-117, 1991.

25. Coppo JA, Coppo NB. Nutritional indicators changes and organic damages in cottonseed supplemented steers. *Facena* 14: 1-6, 1999.

MODIFICACIONES DE LOS RESIDUOS AZUCARES EN LOS GLUCOCONJUGADOS DE LAS GLANDULAS SALIVALES LINGUALES DEL POLLO DURANTE SU DESARROLLO Y CRECIMIENTO

ME Samar¹, RE Avila², A Massone³, L Olmedo¹, FP Marino³

Departamento de Biología Bucal. Facultad de Odontología¹. II Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Médicas². Universidad Nacional de Córdoba. Instituto de Patología Bernardo Epstein. Facultad de Ciencias Veterinarias³. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: En vista del escaso conocimiento sobre las secreciones de las glándulas salivales menores de las aves, el propósito del presente trabajo fue investigar la naturaleza y variaciones de la fracción hidrocarbonada en glándulas linguales del pollo durante su desarrollo embrionario y posnatal. Lenguas de embriones de 9 a 19 días, pollos recién nacidos y adultos se procesaron para PAS, Alcian blue y lectinohistoquímica. Los esbozos glandulares aparecieron en embriones de 9 días. Desde los 15 días apareció una secreción PAS positiva y alcianófila a pH 2.5, en glándulas linguales anteriores y posteriores. Desde los 19 días los glicosaminoglicanos sulfatados se localizaron en las células mucosas de las glándulas posteriores y aumentaron hasta la edad adulta. Por el contrario, los glicosaminoglicanos no sulfatados predominaron en las glándulas anteriores. La afinidad variable de estas glándulas con las diferentes lectinas dependió del tipo de lectina, edad del ave y fracción glandular. Nuestros resultados indican que: a) Los cambios histoquímicos se relacionan con el desarrollo y la maduración celular, cumpliendo probablemente algunos azúcares un rol en la inducción y regulación en las primeras etapas de la diferenciación glandular. b) La heterogeneidad del contenido de azúcares en las glándulas linguales anteriores y posteriores indicaría que cumplen diferentes funciones.

Palabras clave: embrión de pollo, lengua, glándulas salivales, glucoconjugados, histoquímica

CHANGES IN SUGAR RESIDUES OF GLYCOCONJUGATES OF CHICKEN SALIVARY LINGUAL GLANDS DURING DEVELOPMENT AND GROWTH

ABSTRACT: Taken into account the scarce data available regarding the secretions of avian minor salivary glands, we undertook to study the nature and the variations of the carbohydrates residues of glycoconjugates in the chicken lingual glands during embryonic life and postnatal growth. Tongues of 9 to 19 day chick embryos, post-hatched and adult chickens were analyzed by H/E, PAS, Alcian blue and lectin histochemistry. At the 9th day of incubation, primordia of the lingual glands were observed. From the 15th day, an appreciable degree of reactivity with PAS, Alcian blue and lectin histochemistry was detected at the cells of anterior and posterior lingual glands. From the 19th day of incubation sulfated glycosaminoglycans were located in mucous cells of the posterior lingual glands, which showed an increase in stainability till adult chickens. On the contrary, nonsulfated glycosaminoglycan were predominant in the anterior lingual glands. Lectin staining depended on the lectin type that was applied, but also on the age and glandular part both in anterior and posterior lingual glands. The results showed that the degree of histochemical changes depends upon the stage of differentiation and maturation of the glands; some sugar residues seemed to play a role inducing and regulating the first differentiate steps of the glands. Differences in sugar content, in both anterior and posterior lingual glands would indicate their various roles.

Key words: chick embryo, tongue, salivary glands, glycoconjugates, histochemistry.

Fecha de recepción: 13/11/02

Fecha de aprobación: 19/03/03

Dirección para correspondencia: M E Samar Departamento de Biología Bucal. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. Catamarca 1546 (5000). Córdoba. Fax 54 351 4334126.

E-mail: msamar@latinmail.com

INTRODUCCIÓN

Las lectinas son carbohidratos unidos a proteínas, de origen no inmune, que aglutinan y/o precipitan glucoconjugados, permitiendo la identificación, localización y diferenciación *in situ* de los carbohidratos tisulares con especificidad y selectividad importantes, tanto en tejidos normales como patológicos y constituyéndose en pruebas histoquímicas sensibles para definir cambios en el comportamiento celular (1).

Las lectinas marcadas han sido usadas ampliamente en cortes histológicos de glándulas salivales para estudiar el patrón de glicosilación de los glucoconjugados de los gránulos secretorios en células parenquimatosas de una gran variedad de especies (2). Estos estudios han demostrado una considerable heterogeneidad en la glicosilación de las proteínas de las glándulas salivales.

En investigaciones previas realizadas en glándulas salivales de aves adultas con hábitos alimenticios diferentes demostramos su gran desarrollo y el predominio de mucinas con uniones O-glicosídicas, relacionadas con funciones protectoras adicionales a las de lubricación y transporte de los alimentos (3, 12).

Por otro lado, tanto en aves como en mamíferos, incluyendo la especie humana, los glucoconjugados de las glándulas salivales menores han sido poco estudiados durante el desarrollo embrionario (13, 15).

Basándonos en estos antecedentes y teniendo en cuenta que ocurren cambios en la estructura química, cantidad y distribución de los carbohidratos de los glucoconjugados durante la diferenciación y maduración celular, el propósito del presente trabajo fue investigar y comparar en un modelo animal (las glándulas salivales linguales del pollo durante la embriogénesis y desarrollo postnatal) las modificaciones de los residuos azúcares con una batería de lectinas biotiniladas. Este estudio nos permitió obtener una mayor información sobre la fisiología celular y también sobre potenciales cambios patológicos en las glándulas salivales adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron las glándulas salivales linguales anteriores y posteriores de:

- Embriones de pollo de 8 a 19 días de incubación
- Pollos recién nacidos y de hasta 7 días de

edad.

- Pollos adultos.

Los embriones y animales empleados eran de raza Cobb's White Rock, provenientes de una granja local (Paraje Pajas Blancas, Provincia de Córdoba, Argentina).

Se disecaron las lenguas y se procesaron para los siguientes estudios (16):

· **Estudio estructural e histoquímica convencional:** las muestras se fijaron en formol al 10% a pH 7,4 en buffer de fosfato. Posteriormente se procesaron según la técnica de rutina de inclusión en parafina y se realizaron cortes seriados de cada muestra, de 5 μ m de espesor, los que se colorearon con hematoxilina y eosina, PAS y Alcian blue a pH 2,5 y 1,0.

· **Lectinohistoquímica:** Se utilizaron siete lectinas biotiniladas y se empleó el método de avidina-biotina (Vectastain Elite, Vector Labs, Inc. Burlingame CA, USA). En la Tabla 1 se indica la especificidad por los hidratos de carbono, abreviatura y concentración utilizada de cada lectina.

· **Procedimiento:** Cortes de lengua de 3 mm de espesor se montaron en portaobjetos recubiertos con polilisina, se desparafinizaron e hidrataron por pasajes en xilol y etanol en concentraciones decrecientes. La peroxidasa endógena fue bloqueada por tratamiento con H_2O_2 al 3% en metanol. La tinción inespecífica de fondo se redujo cubriendo las muestras con albúmina bovina al 0,1% por 30 min a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con lectinas biotiniladas. Posteriormente, se adicionó una solución del complejo avidina-biotina peroxidasa preparada según indicaciones de su fabricante, durante 30 min a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa se reveló con solución de diaminobencidina (20 mg por 100 ml de TRIS buffer). Se realizó la lectura con dos observadores, en forma independiente y los resultados comparados, graduándose la intensidad de la reacción cromogénica en un esquema cualitativo según la siguiente escala: -: negativa, +: positiva débil, ++: positiva moderada, +++: positiva fuerte. Se realizó un doble control negativo, bloqueándose las lectinas por el azúcar respectivo y sustituyendo las lectinas por solución fisiológica (16).

· **Digestión con sialidasa:** El ácido siálico fue removido tratando algunos cortes con una solución de buffer acetato 0,25 mol/l, a pH 5,5 con-

Tabla 1: Lectinas utilizadas para la marcación histoquímica de residuos azúcares

Table 1: Lectins used in histochemical studies

Lectina nombre en latín (common name)	Abreviatura	Residuo azúcar específico	Concentración µg/ml
<i>Canavalia ensiformis</i> (jack bean)	ConA	α-D-manosa, α-D-glucosa	30
<i>Triticum vulgare</i> (wheat germ)	WGA	α-D-N-acetilglucosamina	30
<i>Ricinus communis</i> (castor bean)	RCA-I	β-D-galactosa	30
<i>Arachis hypogaea</i> (peanut)	PNA	β-D-galactosa (1 → 3) D-N- acetilgalactosamina	10
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	α-L-fucosa	30
<i>Dolichos biflorus</i> (horsegram)	DBA	α-D-N-acetilgalactosamina	30
<i>Glycine max</i> (soybean)	SBA	α-D-N-acetilgalactosamina>α-D-galactosa	30

teniendo 0,1 unidad/ml de sialidasa Tipo X de *Clostridium perfringens* (Sigma), 5,0 mmol/l de Ca₂Cl y 154 mmol/l de NaCl, durante 18 h a 37 °C, antes de la coloración con Alcian blue a pH 2,5 y con la lectina PNA. El control se realizó utilizando la solución buffer sin la enzima (17).

RESULTADOS

Observaciones morfológicas e histoquímicas: Desde los 9 días del desarrollo *in ovo* se observó en las regiones anterior y posterior de la lengua la proliferación de numerosos brotes epiteliales compactos no ramificados, que crecían hacia el mesénquima subyacente (Fig. 1A). Estos brotes continuaban su expansión y entre los 12 y 13 días se elongaban aún más y comenzaban a ramificarse. Desde los 14 días se inició la formación de la luz glandular. Se observó además que el proceso de ramificación era bien manifiesto. Desde los 15 días se incrementó el tamaño y la cantidad de acinos, los que comenzaban la secreción de glucoproteínas PAS positivos y alcianofílicos a pH 2,5. No se observaron diferencias estructurales ni histoquímicas cuando se compararon las glándulas

linguales anteriores (GLA) y posteriores (GLP) (Fig. 1C y D). Las glándulas en desarrollo incrementaron su tamaño, lo que fue bien evidente a los 19 días. A esta edad la luz acinar era manifiesta y estaba revestida en las GLA por células seromucosas con material PAS positivo distribuido principalmente en el citoplasma apical y predominio de glicosaminoglicanos ácidos no sulfatados fuertemente coloreados con Alcian blue a pH 2,5 (Fig. 2A y C). Por el contrario, en las GLP se observaron células mucosas secretoras de glucoproteínas fuertemente PAS reactivas y de glicosaminoglicanos ácidos sulfatados y no sulfatados, como se demostró con Alcian blue a pH 2,5 y 1,0 (Fig. 2B y D).

En pollos recién nacidos y hasta la edad de 7 días las características estructurales de las GLA y GLP eran semejantes a las observadas en embriones de 19 días de incubación. Las células mucosas presentaban mayor cantidad de glucoproteínas, con una intensa coloración en todo el citoplasma tanto con PAS como con Alcian blue a los diferentes grados de acidez. Las células seromucosas presentaban una reacción positiva con

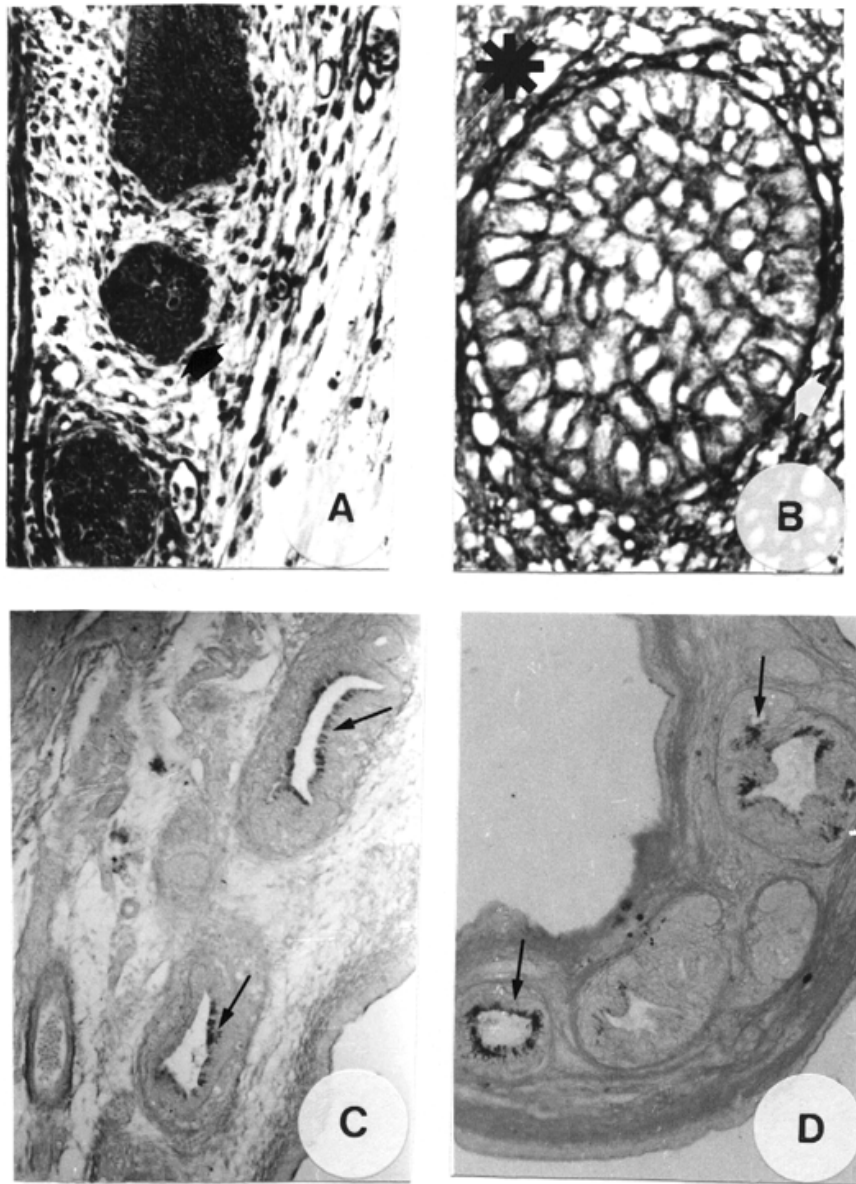


Figura 1: Glándulas linguales de embrión de pollo. A- Embrión de pollo de 9 días de desarrollo: Se señala (flecha) el inicio de la formación glandular en la región anterior de la lengua, con proliferación de brotes epiteliales en el interior del mesénquima. Coloración H/E. 200x. B- Embrión de pollo de 9 días de desarrollo: Esbozo glandular de la región posterior de la lengua con membranas basales (flecha) y mesénquima circundante (asterisco) intensamente PNA reactivos. Lectina PNA. 400x. C- Embrión de pollo de 15 días de desarrollo: Glándulas linguales anteriores en desarrollo. Se observa el inicio de secreción PAS positiva (flecha). Coloración PAS. 100x. D- Embrión de pollo de 15 días de desarrollo: esbozos de glándulas linguales posteriores. Se señala (flecha) la secreción de glucoconjugados PAS positivos al igual que lo observado en las glándulas linguales anteriores. Coloración PAS. 100x.

Figure 1: Chick embryo lingual glands. A- 9th day of incubation. Primordia of the anterior glands appear as epithelial buds (arrow) extended into the mesenchyme. H/E stain. X200. B- 9th day of incubation. Epithelial buds of posterior lingua glands. The basement membranes (arrow) and the mesenchyme (asterisk) show strong reactivity with PNA. Lectin PNA. X400. C- 15th day of incubation. Developing anterior lingual glands. The synthesis of PAS positive secretions begins (star). PAS stain. X100. D- 15th day of incubation. Developing posterior lingual glands. Glycoconjugates PAS positives (arrow). PAS stain. X100.

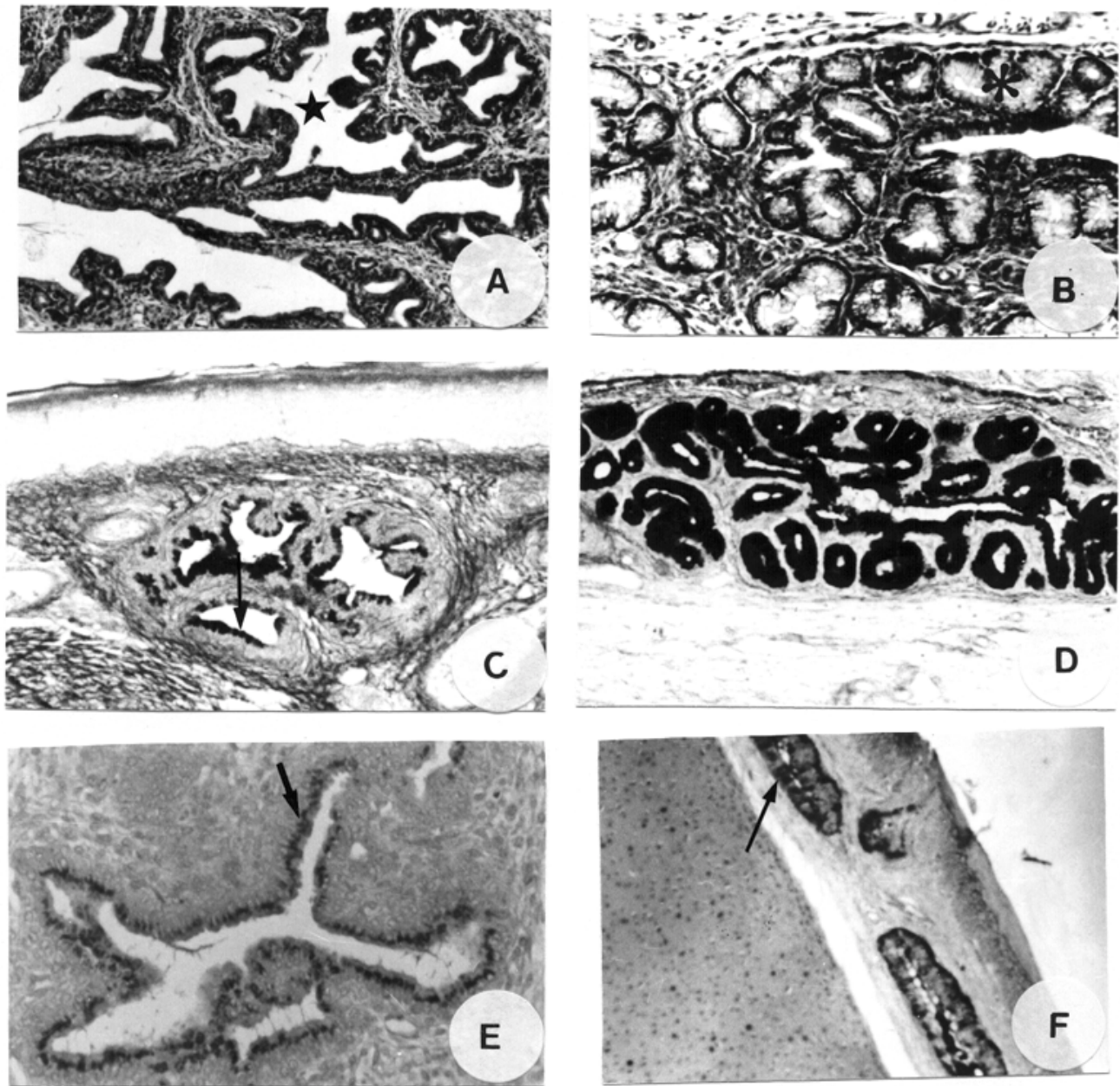


Figura 2: Glándulas linguales de pollo recién nacido A-Glándulas linguales anteriores (estrella) revestidas por células seromucosas. Coloración H/E. 200x. B- Glándulas linguales posteriores (asterisco) donde se observa el epitelio glandular formado por células mucosas. Coloración H/E. 200x. C- Glándulas linguales anteriores. Células seromucosas con glucoconjugados PAS positivos en el citoplasma apical. Coloración PAS.200x. D-Glándulas linguales posteriores. Células mucosas repletas de glucoconjugados PAS positivos. Coloración PAS. 200x. E- Glándulas linguales anteriores. Epitelio glandular fuertemente reactivo con la lectina SBA. 400x. F- Glándulas linguales posteriores. Se observan células mucosas con moderada reactividad entre células fuertemente reactivas (flecha). Lectina RCA-I. 200x.

Figure 2: Post-hatching chicken lingual glands A- Anterior lingual glands (star) coated by seromucous epithelium. H/E stain. X200. B- Posterior lingual glands (asterisk) with secretory epithelium consisting of mucous cells. H/E stain. X200. C- Anterior lingual glands. Seromucous cells showing apical PAS positivity. PAS stain. X200. D- Posterior lingual glands. PAS stained section showing intense staining of the cytoplasm of mucous cells. PAS stain. X200. E- Anterior lingual glands. The cells of glandular epithelium show strong reactivity with SBA lectin. Lectin SBA. X200. F- Posterior lingual glands. Mucous cells subpopulations showing moderate and intense reaction (arrow). Lectin RCA-I. X200.

PAS y Alcian blue, especialmente a pH 2,5, con menor cantidad de glucoconjugados distribuidos en el citoplasma apical. En pollos adultos todas las glándulas presentaban una estructura túbulo alveolar ramificada. El epitelio secretorio de las GLA era cuboideo, con núcleos esféricos y moderadamente basófilo. Algunas células reaccionaban débilmente con el PAS y Alcian blue a los diferentes pH, mientras que otros mostraban PAS positividad y alcianofilia apicales intensas, especialmente a pH 2,5 (Fig. 3A). En las GLP predominaban las células mucosas que se coloreaban fuertemente con PAS (Fig. 3B) y Alcian blue a pH 2,5 y 1,0.

Las mucinas fueron sensibles a la sialidasa, como lo reveló la coloración de Alcian blue a pH 2,5 con y sin tratamiento enzimático previo.

Lectinohistoquímica:

Lectina PNA: Desde los 9 días de incubación tanto la superficie de las células de los esbozos de las GLA como de las GLP mostraron una débil reactividad a esta lectina, que es específica para el disacárido β D-galactosa-(1 \rightarrow 3) D-N-acetilgalactosamina. Se observó un grado de reactividad intenso en el mesénquima y las membranas basales que rodeaban a los esbozos glandulares (Fig. 1B). A los 15 días de incubación apareció una reactividad moderada en la región apical subluminal de algunas células acinares, mientras que otras eran negativas y sólo se coloreaban cuando los cortes se trataron previamente con sialidasa. Desde los 18 días de incubación y hasta los 7 días posteriores al nacimiento en las GLA los acinos eran moderadamente positivos, mientras que en las GLP algunas células y acinos eran negativos, otros presentaban una reacción positiva moderada con un glucocaliz intensamente positivo. Después de la digestión con sialidasa las estructuras negativas reaccionaron con PNA. En pollos adultos las GLA contenían células fuertemente positivas entre células negativas que se positivizaron con sialidasa (Fig. 3C). En las GLP se observó una mayor cantidad de células no reactivas, entre pocas células de positividad moderada a fuerte. El tratamiento enzimático previo con sialidasa acrecentó la afinidad de las células negativas por PNA.

Lectina ConA: Las cubiertas celulares de los esbozos glandulares se colorearon de manera moderada entre los 9 y 14 días de incubación con ConA, que muestra predilección por oligosacáridos con alto contenido de azúcar α -D-manosa. En embriones de 15 días se observaron escasos gránulos subluminales que reaccionaban de manera moderada tanto en GLA como GLP. En embriones

de 19 días y hasta los 7 días posteriores a la eclosión la reactividad del citoplasma era moderada siendo más intensa en la secreción vertida en la luz de las GLA y más débil en las GLP. En pollos adultos sólo el estroma periglandular y el glicocáliz de las células secretoras eran moderadamente positivos frente a ConA, observándose una negativización de los citoplasmas y de la secreción intraluminal.

Lectina RCA I : Las membranas basales y las cubiertas de membranas de los esbozos glandulares eran intensamente positivos al igual que el mesénquima en los especímenes de 9 a 15 días de incubación. Desde los 19 días de incubación y hasta la edad adulta se observaron células secretoras con moderada reactividad mezcladas con células fuertemente reactivas tanto en GLA como en GLP (Fig. 2F y 3D).

Lectina WGA: Hasta los 15 días de incubación sólo reaccionaron moderadamente las membranas basales de las células que formaban los esbozos glandulares. A partir de esta edad se detectó una fuerte reacción apical en las células de las glándulas en desarrollo. Desde los 19 días de incubación y hasta los 7 días posteriores al nacimiento se fue incrementando la reactividad en el contenido luminal de las GLA. En GLP escasas células positivas moderadas se distribuían entre las células negativas. Los pollos adultos presentaron, en ambos grupos glandulares, células negativas y células que se colorearon con diferentes intensidades, siendo la secreción intraluminal moderadamente positiva.

Lectina DBA: Desde los 9 hasta los 14 días las membranas basales y cubiertas celulares de las glándulas en desarrollo eran débilmente positivas. Por el contrario, las células resultaron negativas. En GLA y GLP de embriones de 15 días de desarrollo, la región apical de las células contenía granulaciones que se coloreaban con una fuerte reactividad. Entre los 19 días de desarrollo embrionario y los 7 días de edad, las GLA contenían material intracelular fuertemente positivo. En las GLP, por el contrario, las células eran negativas, presentando algunas una fuerte reactividad infranuclear. Desde el mes de edad en las GLA abundantes células fuerte y moderadamente reactivas se entremezclaban con pocas células débilmente coloreadas y negativas. El patrón de coloración en las GLP era diferente ya que predominaron las células negativas o débilmente positivas sobre pocas células intensamente coloreadas. La secreción era negativa.

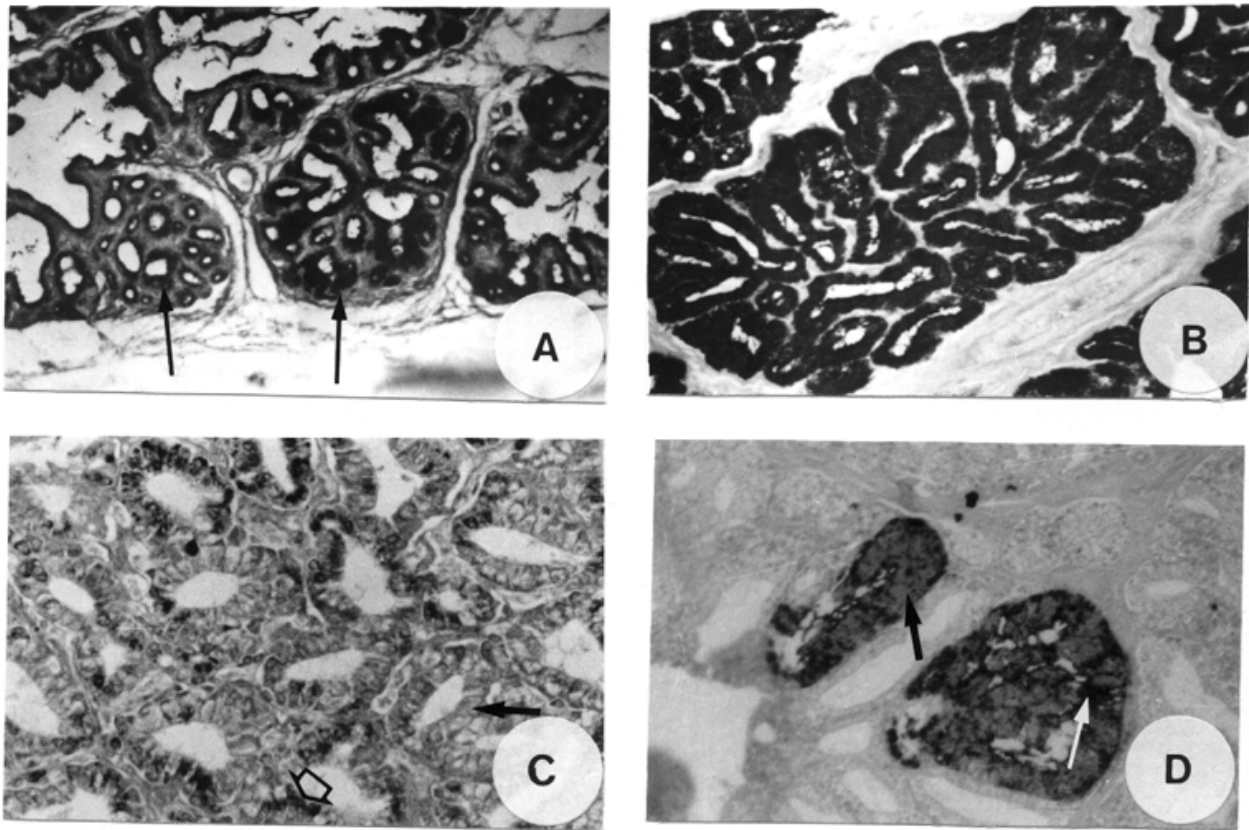


Figura 3: Glándulas linguales de pollo adulto. A- Glándulas linguales anteriores. Células seromucosas con citoplasma heterogéneamente PAS reactivo (flecha). Coloración PAS y contraste con tricrómico de Van Gieson. 200x. B- Glándulas linguales posteriores. Células mucosas que se colorean fuertemente con PAS. Coloración PAS. 200x. C- Glándulas linguales anteriores. Células seromucosas fuertemente positivas (flecha blanca) dispuestas entre células no reactivas (flecha negra). Lectina PNA. 400x. D- Glándulas linguales posteriores. Células mucosas con reactividad moderada (flecha fina) y fuerte (flecha gruesa). Lectina RCA-I. 400x.

Figure 3: Adult chicken lingual glands A- Anterior lingual glands. Seromucous cells that stained different with PAS (arrow). PAS/Van Gieson. X200. B- Posterior lingual glands. Mucous cells. PAS positivity was intense in cytoplasm. PAS stain. X200. C- Anterior lingual glands. Seromucous cells. PNA lectin reactivity is either strongly present (white arrow) or completely absent (black arrow). X400. D- Posterior lingual glands. Mucous cells. Moderately positive (thin arrow) and strongly positive (thick arrow) cells. Lectin RCA-I. X400.

Lectina SBA: Entre los 9 y 15 días la reacción observada era similar a lo descrito para DBA. En embriones de 19 días y pollos hasta los 7 días de edad las GLA y GLP reaccionaron de manera semejante, con citoplasmas intensamente coloreados y secreción con positividad moderada (Fig. 2E). Las diferencias se observaron en pollos adultos, donde las GLP presentaban mayor cantidad de células negativas cuando se las comparó con las GLA.

Lectina UEA 1: La reacción fue negativa en todos los grupos etáreos pre y posnatales en GLA y GLP.

Los resultados se resumen en la Tabla 2.

DISCUSIÓN

En el presente estudio las glándulas linguales del pollo fueron estudiadas con métodos histoquímicos durante su desarrollo y maduración.

Con las técnicas histoquímicas convencionales (Alcian blue y PAS) comprobamos que la secreción de glucoconjugados comienza en GLA y GLP a los 15 días del desarrollo *in ovo*, edad que coincide con la secreción de mucosustancias en las glándulas palatinas y en el proventrículo (estómago glandular) de esta especie (18-19). Posiblemente, en este período, en el que aumenta la secreción de ácido clorhídrico (20), la producción de mucinas por diferentes glándulas del aparato digestivo sea necesaria no sólo para la protección

TABLA 2: Glándulas linguales de pollo. Intensidad de reacción frente a las lectinas en los diferentes grupos etarios.

Table 2: Chicken salivary lingual glands. Staining intensities for lectin binding of different groups.

LECTINA	GLANDULAS LINGUALES ANTERIORES				GLANDULAS LINGUALES POSTERIORES			
	Embriones 9-14 días	Embriones 15-19 días	Recién nacidos a 7 días	Adultos	Embriones 9-14 días	Embriones 15-19 días	Recién nacidos a 7 días	Adultos
ConA	-	++	++	-	-	++	++	-
UEA-1	-	-	-	-	-	-	-	-
RCA-1	-	*++/+++	*++/+++	*++/+++	-	*++/+++	*++/+++	*++/+++
WGA	-	+++	+++	* ₋ /+/+/+++	-	+++	* ₋ /++	* ₋ /+/+/+++
DBA	-	+++	+++	*+++/+/+ /-	-	+++	* ₋ /+++	* ₋ /+/+++
SBA	-	+++	+++	*++/-	-	+++	+++	* ₋ /++
PNA	-	*++/-	++	*+++/-	-	*++/-	* ₋ /++	* ₋ /+/+++

Los resultados están dados en las siguientes unidades: - (reacción negativa), + (positivo débil), ++ (positivo moderado), +++ (positivo intenso). El asterisco indica la reacción predominante.

de la mucosa, sino también para el inicio de otras funciones asociadas con la absorción.

Es bien conocido que las mucinas salivales actúan después del nacimiento no sólo en la lubricación, fluidificación y humectación del bolo alimenticio sino también en la defensa inmunológica primaria o no específica de la cavidad oral formando una cubierta mucosa lubricante y demulcente y una barrera semipermeable contra la desecación y agresiones externas (21). Es probable que algunas funciones protectoras empiecen a desarrollarse en la etapa embrionaria ya que las mucinas también protegen a las mucosas contra agresiones ácidas y enzimas digestivas. También es probable que la elevada acidez de los grupos sulfato, demostrados con Alcian blue, comience a preparar a la cavidad oral en etapas embrionarias contra la proliferación de gérmenes patógenos (22). Se ha sugerido que en fetos humanos las glándulas salivales menores secretan mucosustancias que actuarían a través del líquido amniótico contra sustancias producidas por los sistemas urinario y digestivo en desarrollo (13).

En embriones de 9 a 12 días la positividad con lectinas RCA 1, PNA, ConA, WGA por la presencia de residuos de azúcares tales como β -D-galactosa (1 \rightarrow 3) D-N-acetilgalactosamina; α -D-N-acetil D-glucosamina, α -D-manosa en la superficie celular de los primordios glandulares sugiere un rol desempeñado por estos azúcares en la inducción y regulación de la diferenciación celular

como se describió en sistemas de diferenciación, tales como epidermis, mesonefros, corazón y sistema nervioso en el embrión de pollo. Las lectinas PNA y WGA marcan azúcares en el mesénquima y las membranas basales que juegan un rol importante en la regulación de los intercambios epitelio/mesénquima durante las primeras etapas del desarrollo glandular. Debido a su breve permanencia en estos sitios se consideran oligosacáridos transitorios (17).

La identificación de escasos sitios ConA positivos en las glándulas linguales de embriones de pollo y en la etapa posnatal temprana indica la escasa presencia de residuos manosa y glucosa como ya fuera descrito en glándulas salivales de *Coturnix coturnix japonica* (23). En pollos adultos nosotros hemos observado que junto a la maduración glandular desaparece la marcación para manosa, corroborado por el bloqueo de la lectina por su azúcar respectivo. Este hallazgo coincide con nuestros resultados en glándulas palatinas de la misma especie (6) y es indicativo de la ausencia de glucoproteínas con uniones N-glucosídicas en las secreciones de las glándulas linguales de esta especie. No ocurre así en otras especies que incluyen al hombre, donde se ha observado que la manosa junto a ácido siálico son los principales constituyentes de las glucoproteínas secretadas por las glándulas salivales (24).

La marcación de estas glándulas evidencia el predominio de glucoproteínas con uniones O-

glucosídicas, que presentan α -D-N-acetilgalactosamina. Por el contrario, Suprasert et al. (22) encontraron con la lectina ConA importantes cantidades de residuos manosa y glucosa en glándulas mandibulares de pollo, resultado de la posible existencia de subpoblaciones celulares funcionalmente diferentes cuando se comparan las distintas glándulas salivales de esta especie.

Por otro lado, la lectina PNA reconoce fundamentalmente la secuencia β -D-galactosa (1 \rightarrow 3) D-N-acetilgalactosamina, presente en muchas membranas glucoproteicas y secreciones celulares. Normalmente, la positividad se encuentra enmascarada por residuos de ácido siálico en células diferenciadas (12). Los sitios β D-galactosa (1 \rightarrow 3) D-N-acetilgalactosamina sólo pueden ser expuestos después de la remoción de los residuos sialil terminales por acción de la sialidasa (16).

Nosotros observamos que las GLA de pollos adultos presentan mayor cantidad de acinos reactivos frente a PNA que las GLP. En consecuencia, se deduce que las GLP contienen una importante cantidad de células maduras ricas en ácido siálico, lo que se corrobora con la digestión enzimática con sialidasa. Los resultados observados por nosotros con UEA I y PNA difieren de los de Menghi et al. (25) ya que estos autores describen en las GLA de pollo la presencia de ácido siálico y fucosa, asociados con funciones lubricantes y de defensa celular.

El ácido siálico cumple una diversidad de funciones biológicas. Entre estas funciones merece destacarse la importancia de su presencia para prevenir la difusión de las bacterias en tejidos infectados. Además, contribuye a la viscosidad de la saliva y junto a los grupos sulfato (mencionados anteriormente) cumpliría un papel fundamental en la lubricación y la protección de los tractos digestivo y respiratorio (25, 26).

Con DBA y SBA comprobamos que con el proceso de maduración de las GLP se produce una disminución de células que reaccionan de manera positiva, lo que sugiere que disminuyen los residuos de α -N-acetilgalactosamina.

Suprasert y Fujioka (25) estudiaron las glándulas del esófago de pollos adultos con distintas lectinas. Las células mucosas de esas glándulas mostraron una marcación semejante a lo observado por nosotros en las glándulas linguales de pollos adultos, a excepción de ConA. Esta lectina dio una marcación de moderada a fuerte en las glándulas esofágicas lo que indica diferencias fun-

cionales topográficas entre las células mucosas de las glándulas del sistema digestivo.

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que las lectinas se unen a los azúcares de las células secretoras glandulares tanto en GLA como GLP a partir de los 15 días del desarrollo embrionario, exhibiendo diferentes grados de coloración, en una escala cualitativa de débil a fuerte, dependiendo de la edad del espécimen, del tipo de lectina y de la región glandular, lo cual podría ser el resultado de:

La síntesis de diferentes glucosustancias por diferentes células acinares en diferentes momentos por medio de glucosiltransferasas genéticamente determinadas. Por consiguiente, se pueden identificar poblaciones celulares heterogéneas, las que se colorean homogéneamente con la histoquímica convencional prelectina (PAS, Alcian blue).

Las modificaciones en el ciclo secretor donde todas las células de una glándula y aún todas las células de un mismo adenómero no se encuentran secretando simultáneamente, también produciría la heterogeneidad en la marcación lectinohistoquímica. Esto ya fue descrito por Adi et al. (13) en glándulas salivales menores fetales humanas.

Finalmente, las variaciones observadas durante el desarrollo y maduración glandular demuestran que la secreción comienza en edades tempranas del desarrollo embrionario y está formada por diferentes azúcares que cumplirían un importante rol en los periodos pre y posnatales.

AGRADECIMIENTO

Grant SECYT bianual Resolución 194/00 y 104/02 (Universidad Nacional de Córdoba).

BIBLIOGRAFÍA

1. Damjanov I. Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. Lab Invest 1987; 57: 5-20
2. Garret J, Proctor G, Zhang X, Shori D, Schulte BA. Use of lectin-probes for correlative histochemical and biochemical assessment of the glycosylation patterns of secretory proteins, including kallikreins, in salivary glands and saliva. Histol Histopathol 1996; 11: 503 - 512
3. Samar ME, Avila RE, Grunberg K, Fabro S, Ferraris ME. Glándulas bucales del pollo (*Gallus domesticus*): Aspectos morfohistoquímicos. Rev Bras Biol 1993; 53 (1): 55 - 62
4. Samar ME, Avila RE, Fabro S. Histofisiología de las glándulas salivales de aves con distintos regímenes alimentarios. Rev Fac Cienc Méd Univ Nac Córdoba 1993; 51: 35 - 40

5. Samar ME, Avila RE, Fabro S, Centurión C. Structural and cytochemical study of salivary glands in the magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) and the kelp gull (*Larus dominicanus*). *Marine Ornithol* 1995; 23: 2-6
6. Samar ME, Avila RE, Fonseca MI, Porfirio V, Rabino M. Lectin histochemistry of glycoconjugates in chicken palatine glands. *Com Biol* 1996; 14: 78
7. Samar ME, Avila RE, Portal H, Porfirio V, Fonseca MI. Glándulas salivales de chimango (*Milvago chimango*) y halconcito común (*Falco sparverius*). (Aves: *Falconidae*): Aspectos morfohistoquímicos. *Rev Asoc Cienc Nat Litoral* 1996; 27 (2): 127 – 135
8. Samar ME., Avila RE, Fabro S, Fonseca Pérez MI. Estudio estructural y morfométrico de las glándulas salivales de gorrión (*Passer domesticus*) durante invierno y verano. *Rev Fac Odont Córdoba* 1997; 23/25: 79 – 90
9. Samar ME., Avila RE, Porfirio V, Rabino M. Histofisiología de las glándulas salivales de *Netta peposaca* (Aves: *Anatidae*). *Natura Neotropicalis* 1997; 28 (2): 11–17.
10. Samar ME, Avila RE, Fabro S, Porfirio V, Esteban F, Pedrosa JA, Peinado MA. Histochemical study of Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) minor salivary glands during postnatal growth. *Anat Rec* 1999; 254 (1): 298-306.
11. Samar ME, Avila RE, Olmedo L, Dettin L. Ultrastructural analysis of minor salivary glands in *Milvago chimango* (Vieillot, 1816). *Acta Microscop* 1999; 8, suppl. 8 :188-189.
12. Samar ME, Avila RE, Esteban F, Olmedo L, Dettin L, Massone A, Pedrosa JA, Peinado MA. Histochemical and ultrastructural study of the chicken salivary palatine glands. *Acta Histochem.* 2002; 104:199-207.
13. Adi MM, Chisholm DM, Waterhouse JP. Histochemical study of lectin binding in the human fetal minor salivary glands. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 130-135.
14. Samar ME, Ferraris ME, Avila RE, Ferraris R, Fabro S. Morphogenesis of human lingual glands: A structural and histochemical study. *Acta Odont Latinoamer* 1986; 13 (3-4): 81-88.
15. Samar ME, Avila RE, Ferraris ME, Ferraris R, Fabro S. Embryogeny of human labial glands: A structural, ultrastructural and histochemical study. *Acta Odont Latinoamer* 1993; 7 (2): 23-32.
16. Samar ME, Avila RE, Esteban Ruiz F. Técnicas histológicas. Fundamentos y aplicaciones. 2da. Edición. SeisC ed. Córdoba (Argentina). 2000; p.109-117.
17. Gheri Bryk S, Gheri G, Sgambati E, Orlandini GE. Histochemical detection of sugar residues in chick embryo developing lingual glands with horseradish-peroxidase conjugated lectins. *Acta Histochem* 1992; 92: 127-137.
18. Samar ME, Avila RE, Portal H, Porfirio V, Rabino M. Development and differentiation of the salivary palatine glands in the chick embryo. *Com Biol* 1996; 14: 196.
19. Altamirano F, Avila RE, Samar ME, Fabro S. Cytochemical characterization of mucosubstances in the chick glandular stomach (proventriculus) during embryonary and posnatal development. *Folia Histochem Cytobiol* 1984; 22: 173-180
20. Toner PG. Development of the acid secretory potential in the chick embryo proventriculus. *J Anat* 1965; 99: 389-398.
21. Amerongen AV, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary mucins: Protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology* 1995; 5: 733-740.
22. Suprasert A, Fujioka T, Yamada K. Glycoconjugates in the secretory epithelium of the chicken mandibular glands. *Histochem J* 1986; 18: 115 – 121
23. Menghi G, Scocco P, Ceccarelli P. Basic and lectin histochemistry for studying glycoconjugates in the lingual salivary glands of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Archs Oral Biol* 1993; 38 (7): 649 – 655.
24. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 1982; 11:1-17.
25. Menghi G, Ceccarelli P, Scocco P, Pedini V. The chicken anterior lingual glands: structural study of carbohydrates chains by lectins and glycosidases. *Archs Oral Biol* 1992; 37 (6): 463-469.
26. Suprasert A, Fujioka T. Lectin histochemistry of glycoconjugates in esophageal mucous glands of the chicken. *Jpn J Vet Sci* 1987; 49 (3): 555-557.

ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO DE LOS ESTUDIANTES DEL CURSO DE GENÉTICA Y BIOMETRÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA, EN EL PERIODO LECTIVO 2000

AG Antonini, CA Grillo, FN Dulout

Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA).
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: A partir de registros de 420 estudiantes se analizaron las siguientes variables: año de ingreso (AI), año de nacimiento (AN), número de materias cursadas (nca) y número de exámenes finales de primer año aprobados (nfa) como así también las notas de los cuatro parciales del curso en el momento de su última instancia de aprobación. Se utilizaron los métodos de x^2 , regresión lineal y análisis de varianza. Los resultados obtenidos mostraron que al finalizar los exámenes finales del mes de julio de 2000, el 50 % de los estudiantes adeudaba aún uno o dos exámenes finales de primer año y aproximadamente 1/3 de los alumnos se encontraba cursando simultáneamente materias de primer año. Al analizar los coeficientes de regresión entre las variables estudiadas se observó que no hubo relación entre los resultados del primer parcial y los indicadores evaluados. En cambio, el rendimiento en el segundo parcial mostró relación con el número de cursadas ($b: 0,62; p < 0,001$) y de finales aprobados ($b: 0,20; p < 0,01$), pero no evidenció relación con AN ni AI. Los resultados sugieren que ciertos conocimientos y habilidades previos serían necesarios para acceder al curso de Genética y Biometría ya que se verifica un comportamiento diferencial en el rendimiento de los estudiantes. Paralelamente, es necesario destacar que la dispersión generada en un estudiante y la urgencia de resolver sus temas pendientes (rendir finales), lo va llevando a una incertidumbre que resulta perjudicial en su rendimiento.

PALABRAS CLAVE: docencia, rendimiento, genética

PERFORMANCE EVALUATION OF THE STUDENTS OF THE GENETICS AND BIOMETRICS, FACULTY OF VETERINARY SCIENCES, NATIONAL UNIVERSITY OF LA PLATA, 2000

ABSTRACT: Data from 420 students of Genetics and Biometrics course (Second Year) of the Faculty of Veterinary Sciences, National University of La Plata (UNLP), -birth year, inscription year, number of approved courses, number of approved subjects and the notes obtained in four partial examinations of Genetics and Biometrics- using descriptive parameters, x^2 , linear regression and variance analyses. At July, 50% of the students owed 1 or 2 final examination from first year subjects and 1/3 of the students also took first year courses simultaneously. Regression coefficients showed that the first partial examination had no relationship with any other variable. Nevertheless, other partial examinations had significant relationship with almost all the other variables ($p < 0.01$). These results suggest that the academic context had and important influence on students performance. The more approved subjects, the most success at Genetic and Biometrics. Low academic performance, less success at Genetic and Biometrics.

Key words: teaching, performance, genetic

Fecha de recepción: 06/12/01

Fecha de aprobación: 19/02/03

Dirección para correspondencia: Antonini Alicia CC 296 (B1900AVW) La Plata, Argentina Fax: 0221-4211799. **E-mail:** antonini@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

A pesar de las limitaciones que nos restringen y las dificultades inherentes a nuestra tarea de medición educativa, siempre perdura la necesidad de evaluar. La medición es parte integrante de la empresa educativa, pues no podemos enseñar si no valoramos en el educando el carácter y el alcance del aprendizaje logrado (1).

Un gran número de productos del aprendizaje pueden medirse mediante pruebas por escrito, circunstancia que es especialmente cierta de productos en el dominio cognoscitivo como son los pertenecientes a los conocimientos, a la comprensión y a las habilidades de pensamiento (2).

En el proceso enseñanza-aprendizaje interviene un entramado de relaciones entre diferentes actores, que se constituyen con la puesta en marcha del dispositivo a evaluar y, sobre todo, con los resultados derivados del mismo. Por lo tanto, el rendimiento de un estudiante en un determinado curso depende, sin lugar a dudas, de esta interacción, donde no sólo se involucran las instituciones, el sistema educativo, los docentes y alumnos, sino también a otros actores sociales como padres y entorno cultural (3, 4, 5).

Por otra parte, es necesario mencionar la relación existente entre el tipo de enseñanza y de exámenes que el profesor elabore y el tipo de aprendizaje que el estudiante realice. Si aquél recarga los exámenes con reactivos (preguntas) que miden datos escuetos con asociaciones arbitrarias o conocimientos simples, los estudiantes tenderán a realizar un aprendizaje por repetición, memorístico, que esperan poder repetir sobre la hoja de examen. En cambio, si el aprendizaje puede relacionarse de modo no arbitrario y sustancial, de manera tal que el alumno sepa aplicarlos a situaciones concretas, analizarlos, identificar sus componentes, hacer inferencias válidas a partir de ellos, no los olvidará fácilmente. De esta manera, si los procesos evaluativos se orientan hacia este último punto basado en el aprendizaje significativo y no en datos memorizados, estaremos motivando al estudiante a aprender lo que permanecerá en su repertorio de conductas y le proporcionará las herramientas necesarias para dilucidar con sentido crítico situaciones futuras (3, 6).

Hoy día, la cultura científico tecnológica plantea nuevos desafíos al conocimiento: la diversidad de información, los diferentes lenguajes, el avance de la investigación con nuevas áreas, nuevos contenidos, nuevas especialidades, por lo tanto

requiere de sujetos capaces de establecer relaciones significativas entre sus saberes (7) y con capacidad para resignificar lo aprendido, para integrar conceptos, para realizar procesos de reflexión sobre sus propios saberes (8).

El análisis de las ideas previas de los alumnos sobre las nociones básicas que articulan el conocimiento debería sentar las bases para modificar y complejizar la organización conceptual (5).

Según Morin (9), la idea de progresión del conocimiento unida a la noción de complejidad reconoce la complementariedad de los conceptos situación ésta que se aleja muchas veces de la dinámica institucional que favorece la compartimentación y disyunción del conocimiento (8).

Este trabajo tiene por objetivo evaluar el rendimiento de los estudiantes del curso de Genética y Biometría durante el período lectivo 2000 y su relación con su *status* curricular.

METODOLOGÍA

Se obtuvo información correspondiente a los 420 estudiantes que comenzaron el Curso de Genética y Biometría en el período lectivo 2000. Dicha asignatura corresponde al segundo año de la carrera de Ciencias Veterinarias teniendo como correlativas de primer orden (cursada aprobada) las asignaturas de Histología y Embriología comparada y Bioquímica, no requiriendo correlativas de segundo orden (final aprobado).

El registro de los datos de las variables analizadas se realizó en forma manual e individual a partir de la consulta de los listados de la Cátedra y de las fichas personales del Departamento de Alumnos de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

Entre las variables analizadas se pueden mencionar: año de ingreso (AI), año de nacimiento (AN), número de cursadas de primer año aprobadas (nca), número de exámenes finales de primer año aprobados (nfa) y las notas obtenidas en los cuatro parciales del curso en el momento de su última instancia de aprobación -resultados del primer parcial (rpp), resultados del segundo parcial (rsp), resultados del tercer parcial (rtp) y resultados del cuarto parcial (rcp).

A partir de estos datos se estimó la permanencia en la Facultad como número de años desde el ingreso hasta el año 2000 (Naf) y se calcularon dos coeficientes: el coeficiente C relaciona el

número de cursadas aprobadas con el número de años en la Facultad de Ciencias Veterinarias y el coeficiente F relaciona el número de finales aprobados con el número de años en la Facultad.

Se realizó el estudio descriptivo de cada una de las variables analizadas y se estimaron relaciones entre éstas a través de los métodos de x^2 , regresión lineal y análisis de varianza.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los promedios, medianas, valores mínimo y máximo de las variables AI, AN, nca y nfa cuyas distribuciones tuvieron en todos los casos altas frecuencias en alguno de los extremos.

Sólo el 5% de los estudiantes se había inscripto en el año 1994 o anteriores, mientras que el 10% de ellos nació en el año 1975 o antes.

Al finalizar las mesas de exámenes del mes de julio de 2000 aún el 50% de los estudiantes adeudaba 1 o 2 finales de primer año.

Aproximadamente un tercio del curso se encontraba cursando en forma simultánea materias de primer año.

Los promedios y desvíos correspondientes a los cuatro parciales del Curso Genética y Biometría, se muestran en la tabla 2.

En la tabla 3 se observa que el primer par-

Tabla 1. Valores descriptivos de AI, AN, nca y nfa
Table 1. Descriptive values of AI, AN, nca y nfa

	AI	AN	nca	nfa
Promedio	1997,54	1977,88	3,6	1,37
Mediana	1998	1979	2	1
Valor mínimo	1985	1954	2	0
Valor máximo	1999	1981	4	4
Cuartil 1	1997	1977	3	1
Cuartil 3	1999	1981	4	2

Tabla 2. Promedios de las calificaciones obtenidas en los parciales del Curso de Genética y Biometría
Table 2. Media notes obtained in partials of Genetic and Biometrics course

	Promedio	Desvío	Cuartil 1	Cuartil 3
1° parcial	6,07	1,64	5	7
2° parcial	5,22	1,78	4	7
3° parcial	4,91	1,80	4	6
4° parcial	6,17	1,98	5	8

Tabla 3. Coeficientes de regresión (b) obtenidos y su significado estadístico
 Table 3. Regression coefficients (b) and their statistics significance

	rpp	rsp	rtp	rcp
Nca	0,16	0,62 ***	0,21	-0,08
Nfa	0,12	0,20 **	0,36 ***	0,29 **
AN	0,005	0,032	0,10 **	0,07
AI	0,06	-0,19	0,20 **	0,20 **
Naf	-0,06	0,007	-0,20 **	-0,20 **
Coef C	0,57 **	0,48 *	1,24 ***	0,97 ***
Coef F	0,67 **	0,85 ***	1,49 ***	1,34 ***

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

cial no mostró relación con ninguno de los indicadores evaluados, mientras que el segundo mostró relación solamente con nca y nfa.

El tercer y cuarto parciales tienen un comportamiento similar, con excepción del nca. Todas las demás variables tienen una relación significativa respecto del desempeño de los estudiantes en las evaluaciones.

La permanencia prolongada en el sistema (Naf) fue considerada sólo como indicador de falta de regularidad en el desarrollo sistemático de la currícula y no necesariamente de fracaso académico.

Los coeficientes C y F son indicadores de respuesta positiva del alumno en sus primeros intentos ya que cuanto mayor son ambos coeficientes indican éxito tanto en la aprobación de cursadas como de exámenes finales.

Valores inferiores a 2 en estos coeficientes indican un rendimiento pobre y valores menores aún evidencian recurrencia extrema dentro del sistema.

Los coeficientes óptimos para nuestra asignatura deberían ser 4 en ambos casos, es decir 4 materias cursadas (coeficiente C) o aprobadas (coeficiente F) en un ciclo lectivo en la Facultad, extendiendo este período hasta el mes de julio del año inmediato posterior.

La figura I muestra el porcentaje de alumnos que no accedieron a rendir el segundo, tercero o cuarto parcial por no haber logrado superar la instancia anterior (primer, segundo y tercer parcial respectivamente) en forma acumulativa. No se observaron diferencias significativas entre los alumnos que no accedieron a rendir el segundo parcial ($\chi^2 = 8,83$; $p > 0,05$), no así con el tercero ($\chi^2 = 19,53$; $p < 0,05$) y cuarto ($\chi^2 = 26,02$; $p < 0,01$).

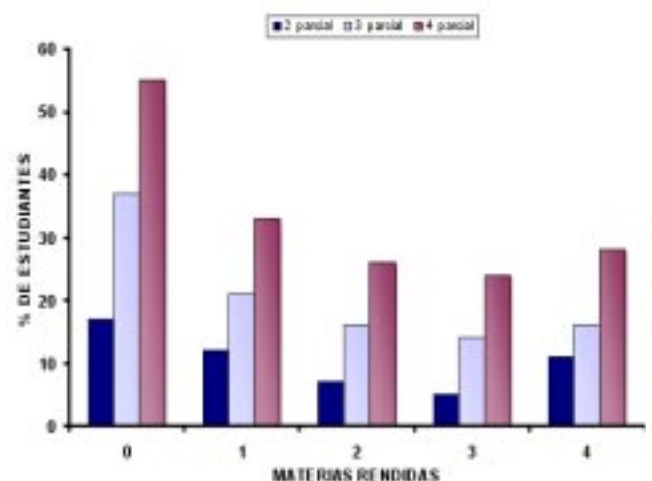


Figura I. Estudiantes que no rindieron el segundo, tercer y cuarto parcial según el número de materias rendidas a julio de 2000

Figure I. Students who did not take second, third and fourth partial and their approved courses at July 2000

Mientras que el 83 % de los estudiantes que no tenían ninguna materia aprobada llegó a la instancia del segundo parcial solo el 45% de ellos logró acceder a rendir el cuarto parcial.

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta la hipótesis del entramado de relaciones que existen e influyen en el rendimiento del logro educativo, este trabajo, en su primera etapa, centra su atención principalmente en los alumnos. La relación que se establece entre los actores del proceso de enseñanza - aprendizaje en esta cátedra, no es unívoca, ya que los alumnos interactúan con un grupo de docentes encargados no sólo de la transmisión del conocimiento sino también del desarrollo de diferentes procesos cognitivos a través de distintas estrategias de abordaje hacia el descubrimiento y comprensión de nuevos contenidos de manera tal que les permita acceder a un pensamiento crítico. Asimismo la confección de las evaluaciones es realizada en forma alternativa por diferentes docentes.

Los resultados del primer parcial pueden deberse a que los contenidos de este módulo no requieren ni conocimientos previos ni habilidades particulares, pudiendo desarrollarse aún dentro del primer año sin modificar los resultados en su rendimiento, reforzando el imaginario social acerca de la rigidez de la ciencia, de la objetividad absoluta, de la ausencia de contradicciones (5).

Cabe mencionar que para esta evaluación se requiere un aprendizaje predominantemente memorístico, no sucediendo así para el resto de los contenidos donde el aprendizaje debe relacionarse de manera no arbitraria a fin de aplicarlo a situaciones concretas donde predomina el cambio conceptual y la integración significativa de los conocimientos (3, 8).

En el segundo parcial se hace evidente que los estudiantes con mayor número de materias cursadas y rendidas tienen un comportamiento superior en el momento de las evaluaciones sin que influya el tiempo de permanencia del estudiante en el sistema. Es decir, requiere los contenidos previos independientemente del grado de dificultad que para el estudiante haya tenido adquirirlos.

Es posible inferir que la razón de no existir relación entre rtp y rcp vs nca se deba al hecho que los estudiantes que acceden a rendir estos parciales debieron necesariamente haber aprobado los dos anteriores. Podríamos verificar que

aquellos alumnos que desaprobaron en los primeros parciales tuvieron un menor número de cursadas aprobadas.

Ahora bien, para estos contenidos se requiere no sólo conocimiento previo de asignaturas correlativas sino también se observa claramente que los estudiantes con más éxito en el logro de los objetivos educativos son aquellos que también obtienen mejores notas en estos exámenes. Mientras que aquellos estudiantes que requirieron para obtener estos logros un tiempo mayor y en algunos casos los contenidos se adquirieron más lejanos en el tiempo mostraron un rendimiento inferior en estos exámenes.

Cuando se analizó sólo el nivel de aprobación -sin tener en cuenta la nota- transformando esta variable en tres categorías clasificatorias: aprobados promoción (6 a 10 puntos), aprobados régimen ordinario (4 y 5 puntos) y desaprobados (0 a 3 puntos), los resultados fueron similares.

Al analizar el porcentaje de alumnos que no accedieron a rendir el tercero y cuarto parcial se evidenció una vez más la necesidad de haber tenido éxito en la aprobación de finales para acceder a estos nuevos contenidos.

Existiría otra hipótesis en la que no sólo estarían en juego contenidos y habilidades adquiridos hasta el momento sino también la dispersión generada en un estudiante que no sólo debe ordenar su tiempo entre cursadas y preparar parciales sino también la urgencia de resolver sus temas pendientes (rendir finales) los va llevando a un cuello de botella que aumenta sus incertidumbres y resulta finalmente perjudicial en su rendimiento en ambos niveles (aprobar cursadas actuales y finales pendientes).

De lo expuesto surge que no es ocioso requerir ciertos conocimientos y habilidades (procesos lógicos, razonamiento, capacidad de resolución de problemas y casos, etc.) para acceder al Curso de Genética y Biometría ya que se verifica un comportamiento diferencial en el rendimiento de los estudiantes.

Es evidente que la permanencia de los estudiantes dentro del sistema sin lograr parámetros mínimos genera una disminución en el nivel de aprobación de la asignatura.

Si bien existen múltiples factores que llevan a un estudiante a permanecer dentro del sistema en su nivel inicial con un alto grado de recurren-

cia, es posible inferir que siendo la dispersión de esfuerzos una de ellas podría aumentarse el rendimiento morigerando y acotando sus opciones a resolver cursadas, finales, etc. e implementando estrategias didáctico-pedagógicas que coadyuven a desarrollar las habilidades necesarias para adquirir los conocimientos futuros.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Sra. Adriana Lanari, Jefe del Departamento de Alumnos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, y a todo el personal a su cargo por su disposición a suministrar la información necesaria para llevar a cabo este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Goring PA. Manual de mediciones y evaluación del rendimiento en los estudios. Ed. Kapelusz. 1971.
2. Gronlund NE. Medición y evaluación en la enseñanza. Ed. Pax-México. 1973.
3. Ausubel, D.P., J.D. Novak y H. Hanesian Psicología educativa Un punto de vista cognoscitivo. 2º edición Ed. Trillas (México). 1983; p. 17-45.
4. Gagné E. La psicología cognitiva del aprendizaje escolar. Aprendizaje Visor. (Madrid), 1991; Cap 1 y 2.
5. Driver R. Psicología cognitiva y esquemas conceptuales de los alumnos en la enseñanza de las ciencias. Enseñanza de las Ciencias. 1986; 4 (1): 3-15.
6. Pozo JI. Teorías cognitivas del aprendizaje. Morata. Madrid. 1989.
7. Giordan A, Devecchi G. Los orígenes del saber. Diada Editora Sevilla. 1998.
8. Merino GM, Roncoroni MZ, Homar AH, Ramírez M, Wrotniak EE, González SB. Desarrollo y evaluación de estrategias conceptuales y procedimentales: un estudio sobre alumnos ingresantes a la Universidad. Archivos de la Universidad Nacional de La Plata. 1999; 1, (1): 1-23.
9. Morin E. El Conocimiento del Conocimiento. Cátedra. Madrid. 1988.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENOS EN VACUNAS ANTIRRÁBICAS DE USO VETERINARIO POR UNA PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA

G Miceli¹, E Nosetto¹, J Esteves Madero², AM Díaz³

¹Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

²Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA)

³Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ).

RESUMEN: Se desarrolló, estandarizó y evaluó un método indirecto de enzimoimmunoensayo (ELISA), reproducible y rápido, para determinar la concentración de antígenos de vacunas antirrábicas producidas en cultivos celulares (BHK). Se consideró la sensibilidad y la reproducibilidad de los resultados del ELISA in vitro propuesto, en relación con la prueba estándar de potencia NIH in vivo. De los 20 lotes de vacunas estudiados, 14 cumplieron con el Requisito Mínimo de Potencia recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), para la prueba NIH in vivo, muestras de los mismos lotes cumplieron con los parámetros del Análisis de Varianza (ANOVA) de la prueba in vitro. La técnica de ELISA propuesta se considera útil como método alternativo rápido para el control de proceso de producción de vacunas antirrábicas de uso veterinario.

Palabras claves: ELISA, rabia, NIH.

ENZYME LINKED IMMUNOASSAY FOR DETERMINATION OF ANTIGENS OF VETERINARY RABIES VACCINE

ABSTRACT: An indirect enzyme linked immunoassay (ELISA) was developed and evaluated as a rapid and reproducible test to determine the concentration of antigens of rabies vaccine produce in BHK cells. The sensitivity and reproducibility of the results of proposed in vitro ELISA method were compare to the standard in vivo NIH potency test. Of the 20 studied lots of vaccines, 14 fulfilled the Minimum Requirement of Potency recommended by the World Health Organization (WHO), for the NIH test. Samples of the same lots also met the parameters of the ANOVA analysis. The proposed ELISA test showed to be a useful alternative rapid method to apply during "in process" controls of veterinary rabies vaccine.

Key Words: ELISA, rabies, NIH test.

Fecha de recepción: 18/07/02

Fecha de aprobación: 12/06/03

Dirección para correspondencia: Graciela Miceli. CC 296 (B1900AVW) La Plata. Argentina. Tel/Fax: 54-221-4257980.

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

INTRODUCCIÓN

La rabia constituye un importante problema para la salud, tanto de seres humanos como de animales (1, 2). Programas antirrábicos sostenidos en el tiempo, permiten el control y la erradicación de la enfermedad, para lo cual es indispensable que se utilicen oportunamente sus tres componentes básicos: educación para la salud, vigilancia epidemiológica y campañas de inmunización periódicas con vacunas de calidad comprobada.

A partir de 1981 se han desarrollado varias técnicas *in vitro* (3, 4, 5, 6) para el control de vacunas antirrábicas durante el proceso de producción, a fin de optimizar los métodos de elaboración y predecir la calidad del producto final.

La prueba de potencia NIH *in vivo* (7, 8, 9) se emplea a nivel internacional para la evaluación de la potencia de las vacunas antirrábicas. Es un método de extinción de antígenos, que presenta la desventaja de altos índices de variabilidad y de costos operativos. En nuestro laboratorio se desarrolló una prueba de ELISA (10,11,12,13) económica y sencilla, que se propone como método alternativo para valorar la concentración de antígenos vacunales, durante la etapa de producción de vacunas antirrábicas preparadas en cultivos celulares, para uso veterinario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo de la prueba de ELISA:

a) Se utilizaron microplacas de varias marcas comerciales y muestras de 20 lotes distintos de vacunas preparadas en células BHK e inactivadas con Beta-propiolactona. Como referencia se empleó la vacuna BHK-PV-1 producida en el INPPAZ (OPS/OMS), cuya potencia es de 1 UI/ml, determinada por la prueba NIH, reconstituida de acuerdo a la indicación del laboratorio productor.

b) Se determinó la eficiencia de dos detergentes para liberar la glicoproteína viral a ser utilizada como antígeno. Para ello se usaron tres alícuotas de vacuna de referencia: la primera se trató con Emulphogene BC 720 en proporción 1:10 y se dejó a temperatura ambiente 30 m, la segunda se reconstituyó con Nonidet P 40 al 1%, durante 60 m a 4 ° C y la última, sin tratar, como control. Todas las muestras se centrifugaron 30 m a 43000 g, con la finalidad de retener solamente la glicoproteína viral.

c) Se produjo suero antirrábico policlonal anti-PV (Cepa Pasteur), inoculando conejos con 6

dosis de vacuna antirrábica de referencia BHK-PV-1, seguidas de 3 dosis de refuerzo con virus PV propagado en células BHK, purificado por el método de Schneider (14) e inactivado con Beta-propiolactona.

El suero antirrábico policlonal se adsorbió con medio de cultivo en proporción 1:1, el mismo que se utilizó en la elaboración de las vacunas, se mantuvo en refrigerador a 4° C bajo agitación continua durante la noche, para inhibir la actividad de anticuerpos inespecíficos contra componentes del medio en que se propagó el virus.

d) Se utilizó como conjugado un suero anti-gamaglobulina de conejo producido en cabra y conjugado con peroxidasa (anti IgG) (Cappel, Organon Teknika Corp. USA). Se determinaron las diluciones de trabajo del suero y del conjugado por ensayos de titulación en damero, se utilizó como antígeno la vacuna de referencia BHK-PV-1 y como sustrato ABTS/H₂O₂

e) Se determinó la concentración de proteínas totales, por el método de Lowry (15) y se identificaron mediante la técnica de SDS-Page (16).

Titulación de vacunas por ELISA

Se prepararon muestras de vacuna de referencia y vacunas a evaluar, todas contenían concentraciones de 50 µg/ml de proteínas totales (dilución inicial) y se sensibilizaron microplacas con 100 µl de diluciones seriadas, en base 2, de ambos tipos de vacunas, en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Se incubaron una noche a 4° C Se bloquearon las placas con PBS-Tween-albúmina bovina al 0,1%, 60 m a 37° C. Se distribuyó la dilución de trabajo de suero antirrábico policlonal, se lo dejó reaccionar una noche a temperatura ambiente. Se distribuyó el conjugado anti IgG y se incubó 60 m a 37° C. Por último se reveló la reacción con el sustrato ABTS/H₂O₂, en buffer citrato-fosfato 0,05 M, pH 5 y se mantuvieron en ambiente oscuro durante 15 m a temperatura ambiente. La lectura de las absorbancias se realizó a 405 nm. Como solución de lavado se utilizó PBS-tween20, 8 veces entre las sucesivas etapas de la técnica. Todas las diluciones se efectuaron por duplicado e incluyeron controles con medio de cultivo y blancos de reactivo. Se determinaron los títulos de la vacuna de referencia y de cada vacuna problema, por ensayo de líneas paralelas y los resultados se validaron por Análisis de Varianza: linealidad, paralelismo, regresión y diferencias entre las vacunas (17). Las diluciones de vacunas problemas y vacuna de referencia se expresaron como logaritmos de las densidades ópti-

cas (DO). Se calculó la potencia con un intervalo de confianza del 95%.

Prueba de potencia NIH

Las pruebas de potencia *in vivo* se realizaron de acuerdo con la técnica de NIH recomendada por la OMS (7) y la actividad de las vacunas se expresó como Potencia Relativa. Se utilizó vacuna de Referencia BHK-PV-1, distribuida por el INPPAZ OPS/OMS.

RESULTADOS

a) En este trabajo la adhesión de antígeno fue óptima en las placas Dynatech Immulon II.

b) Se observó interferencia en la unión de antígeno a la fase sólida, cuando se titularon vacunas tratadas con detergentes. Por lo tanto, la evaluación de la técnica se hizo con vacunas de referencia y problemas completas.

c) El análisis de las curvas de titulación en damero indicó que las reacciones óptimas, con vacuna de referencia, se obtuvieron con las diluciones 1:400 para el suero antirrábico policlonal y 1:3200 para el conjugado.

La sensibilidad se evaluó con la vacuna de referencia, se observó que todos los valores de las lecturas (DO) oscilaron dentro de los 2 desvíos estándar.

La reproducibilidad, se evaluó con la vacuna de referencia, los resultados de las titulaciones

por la técnica de ELISA fueron evaluados por el Ensayo de Fisher (18). No se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas.

d) Para demostrar el efecto Dosis-Respuesta, se realizaron 9 pruebas de ELISA, independientes entre sí. Se utilizaron los valores promedio de las diluciones de las 9 pruebas y se calcularon 2 desvíos estándar de cada una.

e) La prueba estándar de potencia NIH “*in vivo*” demostró que, de las muestras de los 20 lotes de vacunas estudiadas, 14 cumplieron con el Requisito Mínimo de Potencia recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para vacunas antirrábicas de uso veterinario: 1.0 UI/ml; 8 de ellas cumplieron con todos los parámetros de ANOVA, correspondientes al ensayo de líneas paralelas aplicado a las pruebas de ELISA; las 6 restantes cumplieron parcialmente, se observaron discrepancias en “diferencias entre vacunas”, por lo cual el ANOVA del ELISA es válido. Los 6 lotes restantes no cumplieron con los requisitos de la prueba NIH ni con los parámetros de ANOVA del ELISA (Tabla 1).

f) Los resultados de las pruebas de SDS-Page demostraron que tanto las muestras de las vacunas problemas como de la referencia; todas presentaron bandas de mayor concentración de proteínas a nivel del estándar de peso molecular 66 kD, marcador para la glicoproteína del virus rábico.

Tabla 1: Resultados de las pruebas de potencia nih “*in vivo*” y análisis de anova de las pruebas de Elisa “*in vitro*”.

Table 1 Results of the *in vivo* nih potency test with variance analysis of the *in vitro* elisa assay.

PRUEBA POTENCIA NIH				PRUEBA ELISA/ANOVA				
Vacunas Problemas	Nº de vacunas	DE ¹ 50%	UI/ml	Nº de Vacunas	P	L	R	EV
Aprobadas	14	1:89	1,0	8	+	+	+	+
				6	+	+	+	-
No Aprobadas	6	1:65	< 1,0	2	-	-	-	-
				4	-	+	-	-
Vacuna Referencia	1	1:79 ²	1,0					

1-Valores expresados en Promedios

2-DE50% = 1:79+/- 2 DE (1:67-1:91)

P: paralelismo L: linealidad R: regresión EV: diferencias entre vacunas.

DISCUSIÓN

El desarrollo y uso de pruebas *in vitro* para control de procesos de producción de vacunas antirrábicas comenzó en el año 1982 (19). En 1985 (20), 1988 (21) y 1996 (22) se describieron pruebas de ELISA que utilizaban anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos de virus rábico. En este trabajo se evaluó el comportamiento de un suero policlonal antiviral PV purificado (homólogo del virus vacunal presente en todas las vacunas controladas) demostró detectar concentraciones promedio de 50 µg/ml de proteínas antigénicas de vacuna. La producción del suero policlonal es simple y permite obtener altos niveles de anticuerpos (títulos de 1:1500 por Contrainmuno-electroforesis y 1:5000 por seroneutralización) antiviral PV. El uso de vacuna de referencia elaborada también, con virus homólogo PV influiría favorablemente sobre la sensibilidad de la técnica propuesta tal como sucede con otras técnicas de control *in vitro* (5,6).

CONCLUSIÓN

La prueba *in vitro* de ELISA propuesta en este estudio, es útil para evaluar el contenido antigénico de las vacunas antirrábicas. Tiene capacidad para discriminar entre vacunas aceptadas o rechazadas por la prueba estándar de potencia NIH *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- 1-Dellepiane N, Díaz AM. La rabia. I Principales características del agente etiológico y de la enfermedad. Rev Arg Microbiol. 1986; 18 (2):83-95.
- 2-Dellepiane N, Díaz AM. La rabia. II Situación Epidemiológica en las Américas. Vacunas e Inmunidad. Rev Arg Microbiol. 1987; 19 (3):125-138.
- 3-Díaz AM, Robin O, Gorostiaga M, Miceli G. Manual de Producción y Control de la Vacuna Antirrábica producida en monocapa de células BHK. Versión Preliminar, 57 páginas. INPPAZ/OPS/OMS. 1995; Martínez, Buenos Aires.
- 4- Ferguson M, Seagrott V, Schild GC. A collaborative study on the use of single radial immunodiffusion for the assay of rabies virus glycoprotein. J Biol Stand. 1984; 12:283-294.
- 5- Miceli G, Díaz AM, Torroba J. Evaluación de la Técnica de Contrainmuno-electroforesis para determinar la potencia de las vacunas Antirrábicas. Rev Inst Med trop. S Paulo. 1993; 35 (6):543-550.
- 6- Miceli G, Torroba J, Torres W, Esteves Madero J, Díaz AM. Evaluation of Standard Reagents for Radial-Immunodiffusion assays *in vitro* Control of Rabies vaccine. Rev Inst Med trop S Paulo 2000; 42 (3):153-156.
- 7-Wilbur LA, Aubert MFA. The NIH test for potency.

- Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 4th ed. Geneva WHO 1996:360-368.
- 8-Wiktor TJ. Tissue culture methods. In: Kaplan MM, Koprowski H. eds. Laboratory techniques in rabies. 3rd ed. Geneva WHO 1973:101-123.
- 9-Seligman EB. The NIH test for potency. In: Kaplan MM, Koprowski H eds. Laboratory techniques in rabies, 3rd. Geneva, WHO 1973:279-286.
- 10-Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. J Immunol Methods. 1992; 150:5-21.
- 11-Rooijackers EJ, Uittenbogaard JP, Groen Josterhaus AD. Rabies vaccine potency control: comparison of ELISA system for antigenicity testing. J Virol Methods 1996; 58 (1-2):111-9.
- 12-Thraenhart O, Ramakrishnan K. Standardization of an enzyme immunoassay for the *in vitro* potency assay of inactivated tissue culture rabies vaccines: determination of the rabies virus glycoprotein with polyclonal antisera. J Biol Stand. 1989; 17:291-309.
- 13-Thraenhart O. The Essen-Elisa for the determination of the glycoprotein content of inactivated cell-culture rabies vaccines. Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies 4th ed, Geneva WHO 1996 :389-393.
- 14-Schneider L. Aluminium phosphate method for rabies purification. Kaplan MM, Koprowski H. eds. Laboratory techniques in rabies 3rd ed Geneva, WHO 1973:179-181.
- 15-Lowry D. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chemistry 1951;195:265-275.
- 16-Margni R. Fundamentos de Inmunología e Inmunquímica. 5ta ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires 1996: 906-922.
- 17-Finney DJ. Statistical methods in biological assay. 3rd ed. London. Griffin & Co Ltd. 1978 :99-138.
- 18-Spiegel MR. Estadística. 2^{da} ed. McGraw-Hill. Intamericana de España 1991:375-410.
- 19-Barth R, Gross-Albenhausen E, Jaeger O, Milcke L. The antibody-binding test a useful method for quantitative determination of inactivated rabies virus antigen. J Biol Stand 1982; 9:81-89.
- 20-Lafon M, Perrin P, Versmisse P, Sureau P. Use of monoclonal antibody for quantization of rabies vaccine glycoprotein by enzyme immunoassay. J Biol Stand 1985; 13:295-301.
- 21-Lafon M, Perrin P, Sureau P. Enzyme-immunoassay (EIA) for Potency Control of Rabies Vaccines. Progress in Rabies Control. Edited by Thraenhart O, Koprowski H, Bogel K, Sureau P. IMVI ESSEN/WHO 1988 :315-319.
- 22-Perrin P, Lafon M, Sureau P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of the glycoprotein content of rabies vaccines. Meslin F, Kaplan M, Koprowski H. Laboratory Techniques in Rabies, 4th ed. Geneva, WHO, 1996:383-388.

CAMPYLOBACTER JEJUNI EN UNA GRANJA DE POLLOS CAMPEROS

G Giacoboni¹, C López², D Tellechea², A Agostini²

¹Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
²Area Veterinaria en Salud Pública. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad de Buenos Aires.

Resumen: *Campylobacter jejuni*, reconocido causante de diarrea en el hombre, tiene como reservorio natural a las aves. La producción de pollos camperos tiene características particulares que pueden influir en la proporción de aves portadoras de este agente. El objetivo fue estudiar la prevalencia de *Campylobacter jejuni* en pollos camperos en etapa de recría y terminación, como en su carne dispuesta para la venta, cuyos aspectos sanitarios se conocen poco. Se tomaron muestras de materia fecal de aves y muestras de pollos enteros recién faenados previo a la comercialización. Se encontró una prevalencia en pollos en recría del 94%, en terminación del 30% y un 60% en carne aviar. El mayor porcentaje correspondió a *C. jejuni* biotipo II. Los sistemas de producción donde las aves no tienen un confinamiento permanente favorecen la presencia de aves portadoras del agente. La alta prevalencia encontrada en carne aviar, considerando que esta se comercializa fresca, representa un riesgo para la salud humana.

Palabras claves: *Campylobacter jejuni*, prevalencia, pollos camperos.

CAMPYLOBACTER JEJUNI IN A FREE-RANGE POULTRY FARM

Abstract: *Campylobacter jejuni*, recognized as a causative agent of diarrhea in man, has birds as natural reservoirs. Free-range poultry production has particular characteristics that may influence the proportion of carrier birds of this agent. The prevalence of *C. jejuni* isolates was determined at the middle and at the end of the rearing period as well as in poultry meat. Faecal samples from pre-mortem poultries and meat samples from poultries after slaughter but before commercialization were collected. The prevalences observed at the middle and at the end of the rearing period and in poultry meat were 94%, 30% and 60%, respectively. The highest percentage corresponded to *Campylobacter jejuni* biotype II. In production systems where birds are not under permanent confinement enhances the occurrence of carrier birds of this agent. The high prevalence observed in poultry meat represents a risk for human health considering it is offered fresh for retail.

Key words: *Campylobacter jejuni*, prevalence, free-range poultry.

Fecha de recepción: 11/10/02

Fecha de aprobación: 20/06/03

Dirección para correspondencia: Clara López. Chorroarín 280. (C1427CWO) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Tel: +54-011-45248453.

E-mail: spublica@fvvet.uba.ar

INTRODUCCIÓN

Las especies termotolerantes de *Campylobacter*, especialmente *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, son reconocidos como causantes de diarrea en el hombre (1). Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en el mundo y tienen como reservorios naturales una gran cantidad de especies animales, particularmente las aves.

Campylobacter sp ha sido aislado tanto en pollos vivos (2) como en carne de ave dispuesta para la venta (3).

La producción de pollos camperos surge a partir de 1990 ante la demanda de los consumidores por la calidad de la carne de pollo. Mediante la investigación del INTA-Pergamino, se desarrollaron líneas de pollos de crecimiento lento cuyo ciclo de vida se cumple parcialmente al aire libre, alimentados con productos naturales, sin aditivos químicos y faenados en la madurez sexual. El producto así obtenido, posee características organolépticas particulares. La carne es de color más oscuro, de consistencia más firme y sabor más pronunciado que la obtenida de pollos provenientes de sistemas «industriales».

Este nuevo tipo de producción cobró importancia a partir del crecimiento sostenido de la industria avícola en Argentina en un contexto sociopolítico que al favorecer la concentración en un menor número de productores, determinó que surgiera como una alternativa apropiada para las pequeñas empresas familiares.

Debido a los escasos años de desarrollo que lleva en nuestro país, poco se conoce sobre los aspectos sanitarios de este tipo de producción y no se tiene información sobre la importancia de estas aves como reservorios y fuente de infección de la campylobacteriosis para el hombre.

Considerando que el tipo de hábitat y el modo de crianza son factores que pueden hacer más alta la proporción de aves portadoras que en las explotaciones industriales, se estudió la prevalencia de *Campylobacter sp* en pollos camperos en etapa de recría y terminación, como así también en su carne dispuesta para la venta.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en una granja ubicada en la localidad de Pilar, provincia de Buenos Aires, siendo una empresa de tipo familiar cuya actividad principal es la cría de pollos

camperos.

Durante los meses de octubre y noviembre de 2001, se realizaron visitas para tomar muestras y recoger información sobre las características del establecimiento.

En una primera etapa se obtuvieron datos de tipo de cama, limpieza de los galpones, provisión de agua, alimentación, provisión de pollitos BB y medidas sanitarias habituales.

En una segunda instancia, se recolectaron muestras de materia fecal con hisopos comerciales (CultureSwab transport system, DIFCO) de 50 pollos en recría (36 días de edad) y de 50 en terminación (75 días de edad) para cultivo y aislamiento del agente.

Los hisopados en medio de Stuart fueron refrigerados a 4 °C y procesados en el laboratorio dentro de las 48 h de recogidos. Se sembraron en agar Skirrow modificado (agar brucella, sangre ovina, Cefalotina, Trimetoprima, Vancomicina y Polimixina B), e incubaron 48 h a 42 °C en microaerofilia.

Se tomaron también 10 muestras al azar de pollos enteros recién faenados y refrigerados a 4°C, manteniéndose a esa temperatura hasta la recepción en el laboratorio dentro de las 48 h. Cada pollo entero fue trozado y colocado en medio de enriquecimiento (100 ml de caldo brucella adicionado con 10 mg/ml de vancomicina, 10 mg/ml de cefalotina, 5 mg/ml de trimetoprima) incubándose 6 h a 37 °C en microaerofilia. Luego se agregaron 20 UI/ml de Polimixina B incubándose 24 h más a 42 °C. Sobre placas de agar Skirrow se colocaron filtros de poro de 45 µm, a través del cual se filtraron 6 gotas del caldo descripto, llevándose a incubar 48 h a 42 °C en microaerofilia.

La identificación presuntiva se realizó por morfología - coloración de Gram- y microscopía de contraste de fase. Los aislamientos compatibles morfológicamente con *Campylobacter sp*, fueron identificados bioquímicamente según lo propuesto por Vandamme y De Ley (4) y la tipificación se realizó según el método de Lior. Para la confirmación de los biotipos se utilizó el sistema API CAMPY® (Biomerieux).

RESULTADOS

Características del establecimiento:

La granja en estudio se ubica en Pilar, provincia de Buenos Aires. Su actividad principal es

la cría de pollos camperos. En el momento del muestreo la población estaba constituida por 140 animales en la categoría cría, 130 en recría y 160 en terminación. Los pollitos eran provistos en su totalidad por el INTA- Pergamino. Ocasionalmente, vendían lechones producidos en el lugar. Se observó, además, la presencia de patos y pavos criados sin fines comerciales.

Las instalaciones correspondientes a cría y recría eran contiguas y enfrentadas a un galpón destinado a la terminación de los pollos. El espacio comprendido entre ambos galpones era utilizado para liberar a las aves durante el día. Este espacio era de tierra apisonada, sin pastura.

El primer galpón mencionado era de mampostería de ladrillos en todos sus laterales, así como la división para separar las categorías. Puertas y ventanas eran completas con alambre tejido, mientras que el techo era de chapa de cinc.

Los implementos para la crianza consistían en dos bebederos planetarios plásticos y tres comederos del mismo tipo pero de metal. El llenado de los implementos era manual.

El galpón destinado a la terminación tenía en las paredes laterales un zócalo de 40 cm de mampostería que luego se continuaba con alambre tejido. Un sistema de cortinas permitía cierta regulación de la temperatura y la ventilación. No se observó la presencia de pediluvios.

En los pollos de recría y terminación, los bebederos eran de tipo lineal y los comederos de tipo planetario, ambos de metal. El suministro de alimentos y agua se realizaba manualmente.

En las tres categorías se utilizaba cama de viruta de madera de 3 a 4 cm de espesor.

Los ingredientes para la formulación de las raciones se almacenaba en un galpón destinado a tal fin, donde también había un cilindro de mezcla y un pequeño molino. Las raciones se preparaban cada dos días.

La provisión de agua provenía de dos pozos de 80 y 40 metros de profundidad. El productor no clorinaba el agua.

La alimentación de los pollos se realizaba en base a las fórmulas propuestas por el INTA-Pergamino de acuerdo a los requerimientos de las distintas categorías. No incluía en ellas, proteínas de origen animal.

La limpieza de los galpones se realizaba cada 15 días y al final de cada crianza. Consistía en la incineración y renovación de la cama de viruta, retiro de bebederos y comederos los que se lavaban con agua a presión para retirar la suciedad más grosera y luego con agua con lavandina.

Si bien se mencionó la presencia de roedores, no se implementaban medidas de control.

El establecimiento no recibe asesoramiento veterinario de rutina, ni se aplican medidas sanitarias preventivas (vacunación). Se señaló la utilización de anticoccidiósicos pero sólo ante la presentación del problema.

La faena era realizada una vez por semana en el mismo establecimiento que no contaba con habilitación oficial. Los pollos se faenaban luego de los 75 días de edad cuando alcanzaban un peso de 2,300 a 2,500 kg y se refrigeraban a 4 °C distribuyéndose inmediatamente en bocas de expendio.

Se comercializaban aproximadamente, 20 pollos por semana que eran vendidos a comercios minoristas o a particulares de la provincia de Buenos Aires, con fecha de consumo dentro de los 7 días de faenados.

Los resultados de laboratorio se presentan en la tabla 1.

DISCUSIÓN

La cría de pollo campero surge por demanda de los consumidores y en nuestro país este tipo de producción es llevada a cabo por pequeños emprendimientos familiares cuyo objetivo es obtener mayores ingresos. Esto trae consigo el menor control sanitario de la cadena de producción y faena.

La circulación y consumo de alimentos no controlados pone en riesgo a la población humana, principalmente a niños menores de dos años quienes representan el grupo más vulnerable (5) de padecer campylobacteriosis.

La infección por *Campylobacter jejuni* es frecuente en la producción industrial de aves. Altas proporciones de positividad han sido informadas, lo que ha motivado diversas investigaciones epidemiológicas para conocer los mecanismos de contaminación y diseminación de este agente en los planteles.

Tabla 1. Prevalencia de aislamientos de diferentes especies y biotipos de *Campylobacter sp* en muestras de hisopado cloacal y carne de pollos camperos. Pilar, Provincia de Buenos Aires, 2001.

Table 1. Isolates prevalence of different species and biotypes of *Campylobacter sp.* in cloacal swabs and free-range poultry meat samples. Pilar, Province of Buenos Aires, 2001.

Muestra	n	% positivos	IC 95%	Especie	biotipo	%
Recría	50	94	87.3	<i>C. jejuni I</i>		31,9%
			100.0	<i>C. jejuni II</i>		63,6%
				<i>Campylobacter sp</i>		4,2% ^(*)
Terminación	50	30	17.1	<i>C. jejuni I</i>		40,0%
			42.8	<i>C. jejuni II</i>		53,3%
				<i>Campylobacter sp</i>		6,6% ^(*)
Carne de ave	10	60	26.2	<i>C. jejuni II</i>		83,3%
			87.8	<i>C. coli I</i>		16,6%

(*) Sin tipificar

La vía de transmisión más frecuente es la horizontal a través de camas, instalaciones con inadecuada limpieza y desinfección, agua o alimentos contaminados. Es importante la presencia de roedores u otras especies animales que pueden actuar como fuentes de infección. Se cita también la transmisión mecánica por insectos o por medio de la ropa del personal. No hay suficiente evidencia para confirmar una transmisión vertical (2).

La importancia de la campylobacteriosis en los pollos ha sido observada por distintos autores en distintos sistemas de producción.

En América latina se han realizado estudios para determinar la prevalencia de *Campylobacter sp.* bajo distintos sistemas de explotación. Fernández y cols (6) en Chile, observaron que en aquellas aves sometidas a sistemas de explotación de tipo familiares la frecuencia de aislamiento de *Campylobacter sp* fue del 66,7 % de los cuales el 88 % fue *Campylobacter jejuni* predominando los biotipos I y II. En aves de postura bajo cría intensiva tradicional, las prevalencias halladas fueron del 29,4 % siendo 76 % *Campylobacter jejuni*.

Otro trabajo que compara las prevalencias en pollos domésticos y pollos industriales es el realizado por Tresierra Ayala y cols (7) en Perú, observando mayor frecuencia de aislamientos de *Campylobacter sp.* en el primer sistema (54 %), en comparación con el segundo (35 %). De estos porcentajes, 27 % y 16 % correspondieron a *C. jejuni* y *C. coli*, respectivamente.

Nuestros hallazgos (prevalencia general 62 %) coinciden con los de otros autores para este

tipo de producción, como así también los biotipos encontrados. Esto hace suponer que las aves que no tienen confinamiento permanente tienen mayores probabilidades de ser portadoras de este agente porque la persistencia del mismo y el grado de exposición a él es mayor que en la producción intensiva.

Atanassova y Ring (8) en Alemania, registraron una prevalencia del 45,9 % en muestras provenientes de aves en plantas de faena, en las cuales el 46 % fue *C. jejuni* biotipo II. Lammerding y cols (9) publican un relevamiento de *Campylobacter jejuni* en plantas de faena realizado en Canadá y registraron una prevalencia del 38,2 % perteneciendo a los biotipos I y II.

Hood y cols (10) en Inglaterra, encontraron una prevalencia de *Campylobacter jejuni* del 48 % en pollos frescos de comercios, señalando que en el 61% de los casos la contaminación era de superficie.

Sakuma y cols (11) determinaron la prevalencia de *C. jejuni* y *C. coli* en pollos obtenidos en comercios de Brasil, observando una prevalencia de *Campylobacter sp.* del 13 %, correspondiendo un 86 % a *C. jejuni* y un 14 % a *C. coli*. Estos autores sugieren que la baja prevalencia observada se debería a que previamente los pollos podrían haber sido congelados.

En nuestro país, Giacoboni y cols (12) estudiaron 120 muestras de menudos y carcasas de pollos congeladas obtenidos en comercios de la ciudad de La Plata. Observaron que el 35,8 % resultaron positivas a *Campylobacter sp.* y de estas, el 35 % correspondieron a *C. jejuni*.

Las condiciones en que se realiza la faena del pollo industrial no elimina totalmente la carga bacteriana. El escaldado (alta temperatura en corto tiempo, con alta concentración de materia orgánica) reduce el número de bacterias, pero durante el eviscerado se produce la mayor contaminación cruzada. El proceso de "chilling" posterior disminuye la carga bacteriana, pero las bacterias remanentes son viables hasta siete días después en pollos refrigerados. Si bien el cloro es un buen desinfectante para este agente, la alta cantidad de materia orgánica hace que no sea tan efectivo (2).

En la producción campera el proceso de faena es llevado a cabo en el mismo establecimiento, en condiciones de estructura e higiene que podrían favorecer la contaminación del producto final. La mayor prevalencia encontrada en nuestro caso puede deberse a los factores ya mencionados y al hecho de que la carne se comercializa fresca.

Distintas investigaciones se han orientado hacia la identificación de factores de riesgo para la presentación de la campylobacteriosis en pollos. La edad podría ser una de las variables importantes en relación a la frecuencia de aislamientos positivos de *Campylobacter sp.* Engvall y cols (13) no logran aislarlo sino pasadas las 3 semanas de edad, mientras que Evans y Sayers (14), al realizar un seguimiento de un ciclo productivo (un año), encuentran que más del 40 % de los pollos estaban infectados a la cuarta semana y más del 90 %, a la séptima semana de edad. Estos autores también observan asociación significativa entre la edad a la faena y la prevalencia de *Campylobacter sp.*, encontrando un OR de 5 cuando la faena se realiza a los 43-49 días que asciende a 33 cuando la faena se realiza superada esta edad. La prevalencia hallada en este trabajo fue mayor para los animales en recría, pero al no haberse hecho un seguimiento durante todo el ciclo productivo no puede relacionarse la edad con la prevalencia. Al realizarse en este tipo de producción la faena a mayor edad, sería de esperar una mayor probabilidad de infección del animal terminado.

Otro aspecto estudiado son las prácticas de higiene (2, 14, 15). Los diferentes autores coinciden al afirmar que las medidas de higiene ambiental influyen significativamente en la presentación de este microorganismo. Evans y Sayers (14) señalan a estas prácticas como un factor de protección, a su vez Gibbens y cols (15), al realizar un estudio de intervención, observan una reducción del 50 % de la infección por *Campylobac-*

ter sp. en el grupo en el que se aplicaron medidas higiénicas intensivas. Si bien las prácticas en esta explotación eran de rutina, no están normatizadas ni sistematizadas por lo que puede haber diferencias entre los distintos planteles.

El agua ha sido implicada en la transmisión de *Campylobacter sp.* en pollos, particularmente aquella que favorece el desarrollo de este agente como es la que presenta bajo pH., frecuente en aguas no tratadas debido a la contaminación por distintos agentes (16). Es relativamente común que las producciones familiares no cuenten con planes sanitarios de aplicación sistemática.

Las medidas de intervención en granjas de pollo todavía no están desarrolladas por falta de conocimiento sobre la ecología del *Campylobacter* en ellas. Para su control es necesario múltiples aproximaciones en distintos segmentos de la producción.

Sin embargo el riesgo de contaminación de la carne aviar puede ser reducido en este tipo de explotaciones por una combinación de buenas prácticas de higiene en la producción, el mejoramiento del proceso de faena y la decontaminación del producto final.

El desarrollo de este tipo de producción en nuestro medio, no sólo aporta a una demanda diferenciada emergente, también significa una fuente de desarrollo para los pequeños productores familiares. Sin embargo, es deseable que en el futuro las organizaciones estatales coordinen la formación de cooperativas que promuevan la oferta de un producto de calidad diferenciada en todo sentido, incluyendo el sanitario, desde la sumatoria de esfuerzos aislados, favoreciendo, de esta manera, el desarrollo de esta industria incipiente en favor de los consumidores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández H. Thermotolerant *Campylobacter* species associated with human diarrhea in Latin America. J Braz Ass Adv Sc 1992; 44 (1): 39-43.
2. Berndtson E, Emanuelson U, Engvall A, Danielsson-Tham ML. A 1-year epidemiological study of campylobacters in 18 Swedish chicken farms. Preventive Veterinary Medicine 1996; 26:167-185.
3. Willis WL, Murray C. *Campylobacter jejuni* seasonal recovery observations of retail market broilers. Poultry Science 1997; 76:314-317.
4. Vandamme P, De Ley J. Proposal for a new family, Campylobacteraceae. Int J System Bact 1991; 41: 451 - 455.

5. López C, Agostini A, Giacoboni G, Cornero F, Tellechea D, Trinidad JJ. Campylobacteriosis en una comunidad de bajos recursos de Buenos Aires, Argentina. Rev Científica y Técnica OIE 2003; 22 (3) (en prensa).
6. Fernandez H, Salazar R, Landskron E. Occurrence of *Campylobacter* in three groups of hens maintained under different environmental conditions. Rev Microbiol 1993; 24 (4) :265-268.
7. Tresierra-Ayala A, Fernandez H, Bendayan M E, Pereyra G, Bernuy A. Aislamiento de especies termotolerantes de *Campylobacter* en dos poblaciones de pollos criados con y sin confinamiento. Rev Saúde Pública 1995; 29(5):389-392.
8. Atanassova V, Ring C. Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry meat in Germany. International Journal of Food Microbiology 1999; 51:187-190.
9. Lammerding AM, Garcia MM, Mann ED, Robinson Y, Dorward WJ, Truscott RB, Tittiger F. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal and poultry in Canada. Journal of Food Protection 1988; 51(1):47-52.
10. Hood AM, Pearson AD, Shahamat M. The extent of surface contamination of retailed chickens with *Campylobacter jejuni* serogroups. *Epidem Inf* 1988; 100:17-25.
11. Sakuma H, Franco B D G M, Fernandez H. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in and *Campylobacter coli* in retail raw chicken meat and giblets in Sao Paulo, Brazil. Rev Microbiol 1992; 23(1):13-16.
12. Giacoboni G, Puchuri MC, Cerda R. *Campylobacter* termotolerantes en menudos y carcasas de pollos provenientes de diferentes comercios de la ciudad de La Plata. Analecta Veterinaria 1999; 19 (1/2):51-54.
13. Engvall A, Bergqvist A, Sandstedt K, Danielsson-Tham ML. Colonization of broilers with *Campylobacter* in conventional broiler-chicken flocks. Acta Vet Scand 1986; 27:540-547.
14. Evans SJ, Sayers AR. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. Preventive Veterinary Medicine 2000; 46:209-223.
15. Gibbens JC, Pascoe SJS, Evans JS, Davies RH, Sayers AR. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. Preventive Veterinary Medicine 2001; 48 (2) : 85-99.
16. Refregier-Petton J, Rose N, Denis M, Salvat G. Risk factors for *Campylobacter* spp. Contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. Preventive Veterinary Medicine 2001; 50(1-2):89-100.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

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

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

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

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

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

Normas generales de redacción

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

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

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

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

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

Normas particulares de redacción:

1.Trabajos de investigación:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Si se tratase de trabajos publicados en libros:

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

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

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

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

II. Artículos de revisión

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

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

III. Comunicaciones breves

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

IV. Información institucional

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

V. Cartas al editor

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

Correspondencia

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

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



EDUCACION A DISTANCIA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS / UNLP

Características

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

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

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

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

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

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

¿Cómo son nuestros cursos?

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

¿De qué materiales dispone el estudiante?

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

¿Qué recibe el estudiante que cursa?

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

Informes e Inscripción:

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

ELECTROCARDIOGRAFÍA EN PEQUEÑOS ANIMALES

Director: Daniel O. Arias

Temario: Fundamentos básicos de la electrocardiografía. Técnica de registro electrocardiográfico. Interpretación y diagnóstico electrocardiográfico. **Objetivos:** Entrenar al profesional en el conocimiento de la electrocardiografía como método complementario de diagnóstico de las enfermedades cardiovasculares de los pequeños animales.

HEMATOLOGÍA CLÍNICA Y SU INTERPRETACIÓN EN CANINOS Y FELINOS

Director: Bact. Sandra Arauz

Temario: El hemograma en la clínica. Materiales y equipos de laboratorio. Interpretación. Presentación de casos clínicos y su análisis. **Objetivos:** Capacitar a los profesionales para la obtención de un diagnóstico hematológico en diferentes cuadros clínicos en pequeños animales.

TEMAS DE REPRODUCCIÓN EN PEQUEÑOS ANIMALES

Evaluación de semen. Citología vaginal

Director: María Alejandra Stornelli

Temario: Fisiología reproductiva. Análisis macroscópico, bioquímico y bacteriológico del semen. Evaluación e interpretación de los resultados obtenidos en el estudio de semen. Citología vaginal. Aplicaciones de la citología vaginal en la clínica. **Objetivos:** Analizar la fisiología del macho. Conocer y aplicar las técnicas para obtener y procesar la muestra de semen para realizar un espermograma. Conocer las aplicaciones y las limitaciones del espermograma.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO PRÁCTICO PARA EL MÉDICO VETERINARIO (bacterias aerobias)

Director: Prof. Dr. Nestor Oscar Stanchi

Temario: Urocultivo, Otocultivo, Coprocultivo, Hisopados de heridas y piel. **Objetivos:** Capacitar a los profesionales para el diagnóstico bacteriológico rápido con especial referencia a las muestras clínicas más comunes que involucran a la práctica frecuente en veterinaria.

2º JORNADAS PLATENSES DE MEDICINA EN PEQUEÑOS ANIMALES

Videos de las Conferencias realizadas en septiembre 2001

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

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

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

Signos Clínicos del Perro: aproximación diagnóstica

Director: Dra. Cristina Gobello

Docentes:

M García, A Aprea, Y Corrada, M Piella, B Nuozzi, G Zapata, A Dragonetti, A del Amo, GC Broglia, HA Baschar, A Giordano, E Durante, J Mouly, M Luna, M Díez, D Arias, M Tórtora, A Cruz, R Rodríguez, L Klima

Objetivo: El objetivo de este Curso es el de entrenar al Profesional Veterinario en la resolución de casos clínicos a través del estudio sistemático de algunos de los signos clínicos más frecuentes del perro.