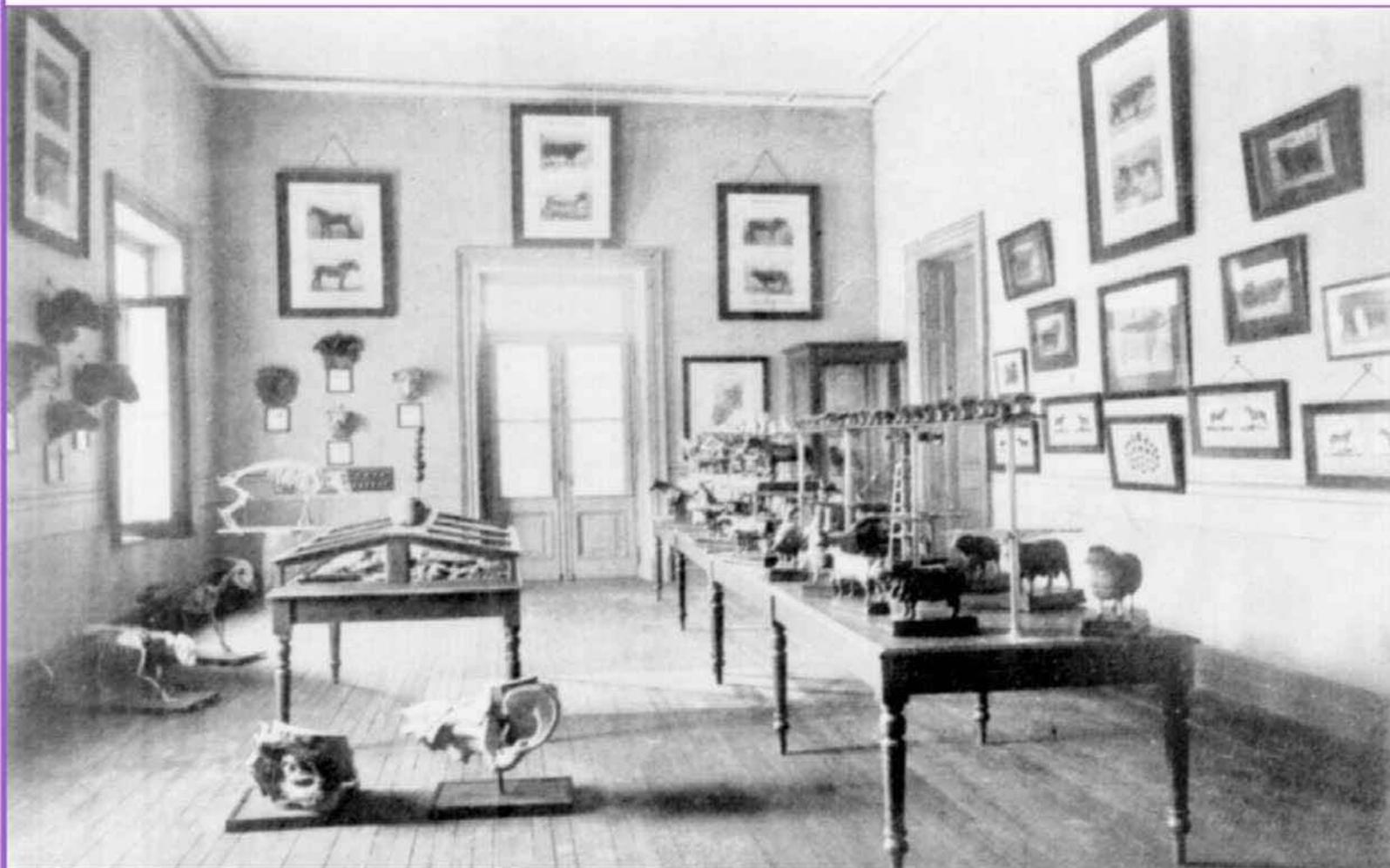


ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Volumen 28 n° 2 año 2008





FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 28 n° 2, 2008

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

Autoridades

Decano

Dr. Edgardo Nosetto

Vicedecano

Bac. Reinaldo Fonrouge

Secretario Académico

Dra. Sara Williams

Secretario de Postgrado

Dr. Eduardo Mórtola

Secretario de Extensión Universitaria

Méd.Vet. Eduardo R. Pons

Secretario de Ciencia y Técnica

Dra. Cecilia Galosi

Secretario de Asuntos Estudiantiles

Méd.Vet. Fernando Marino

Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. María Gabriela Echeverría

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretaría de Redacción

Dra. Yanina Corrada

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité Editorial

(Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi

Méd.Vet. Enrique Pennimpe

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

Clasificada nivel 1 (superior de excelencia) por
CAICYT-CONICET

Evaluadores de trabajos de Analecta Veterinaria:

G. Antúnez Sánchez (Cuba), L Basso (Argentina), HA Brusco (Argentina), F Capano (Uruguay), A Conigliaro (Argentina), L Estol (Argentina), J Idiart (Argentina), RA Fernández (Argentina), J Lasta (Argentina), A Fernández Alosa (Brasil), H Tersolo (Argentina), J Zorzópulos (Argentina), E Gimeno (Argentina), C Schenk (Argentina), E Coppos (Argentina), LM Friche Passos (Brasil), JM Gutiérrez (Costa Rica), R Cacchione (Argentina), F Cortés Benavides (España), M Carballo (España), RM Dauder (España), R de Torres (Argentina), P Ostrosky-wegman (España), J Surralles Calonge (España), N Auza (Argentina), M Barrandeguy (Argentina), M Carballo (Argentina), JA Coppo (Argentina), C Corbellini (Argentina), F Costa (Argentina), C Eddi (Argentina), A Fosatti (Argentina), E Gentilini (Argentina), N Gómez (Argentina), S Gómez Cabrera (Argentina), C Gómez Dumm (Argentina), J González Tomé (Argentina), G. González (Argentina), A Guglielmone (Argentina), I von Landzewitsch (Argentina), N Leardini (Argentina), L León Vizcaino (España), C Lerena (Argentina), JC Lorente (Argentina), M Mariano (Argentina), H Molinuevo (Argentina), M Monina (Argentina), E Moras (Argentina), SJ de Oliveira (Brasil), A Parma (Argentina), 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), P Soto (Argentina), E.Romero (Argentina), R Alberio (Argentina), A Soraci (Argentina).

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

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 and of extension that they are developed in this College.

ISSN 0365514-8 Versión Impresa

ISSN 1514-2590 Versión Electrónica

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

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 del material impreso en esta revista sin el consentimiento expreso del Editor. Está autorizada la reproducción con fines académicos o 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 accediendo a la página en la Web

www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html

Los números de la revista a partir del Volumen 18 están disponibles en formato de archivo: pdf (Portable Document File-Adobe Acrobat Reader®) y pueden 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.

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

Revisión de estilo: Per. Eleonora Rolleri

Diseño

Prof.Dr. Nestor Oscar Stanchi

Diseño de Tapa

Andrea López Osornio (DCV)

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)

BIOSIS (<http://www.biosis.org>)

Infocyt <http://www.redhucyt.oas.org/infocyt/>

Se solicita canje - On demande l'échange - We ask for exchange - Si prega lo scambio
Man bitter um austausch - Pedese permuta - Oni petas intersangon

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 vet* (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 vet* (CD-ROM) 2001; 21, 1: 54-57 (4 pantallas).

Impresión

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&

Etimología: LatinModerno *analecta*, del Griego *analekta*, plural neutro de *analektos*, verbo de *analegein* recolectar, de *ana-* + *legein* reunir: selección miscellanea de pasajes escritos, cartas.



Foto de tapa: Facultad de Veterinaria (Museo de Zootecnia). Mediados del siglo XX.

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

El Editor se reserva el derecho de editar los artículos para clarificarlos y modificarles el formato para adecuarlos al estilo de ANALECTA VETERINARIA.

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

The Editor reserves the right to edit articles for clarity and to modify the format to fit the publication style of ANALECTA VETERINARIA

Impreso en papel libre de ácido

Printed in acid-free paper

Impreso en Argentina

Printed in Argentina



Artículos de Investigación

Research articles

- La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino.** Electron microscopy as a tool for canine semen evaluation. S Jurado, P Sarmiento, A Stornelli **7-14**
- Micotoxinas en alimentos: evaluación del daño cromosómico inducido por ocratoxina A en dos modelos experimentales *in vitro*.** Mycotoxins in Food: Assessment of Chromosomal Damage Induced by Ochratoxin A in Two In Vitro Experimental Models. JC De Luca, A Seoane **15-20**
- Estudio del comportamiento del pH en filetes de pejerrey de laguna (*Odonthestes bonariensis*), conservados con y sin vacío, utilizando distintos tratamientos y almacenados a temperaturas de 4, 0 y -1.5 °C.** Study of the behavior of pH in filets of lagoon's pejerrey (*Odonthestes bonariensis*), under aerobic and vacuum packaging conditions, using different treatments and stored at 4, 0 and- 1.5 °C. J Copes, K Pellicer, G del Hoyo, S Brocardo, L Gianuzzi **21-25**
- Criterios para la construcción de materiales curriculares y su evaluación en un curso de Biología Celular para estudiantes de Veterinaria.** Elaboration criteria for curricular materials and their evaluation in a Cell Biology course for Veterinary students. González NV, Flamini MA, Andrés Laube PF, Barbeito CG **26-37**

Comunicaciones breves

Short communications

- Multifocal Anaplastic Astrocytoma in the Lumbar-Sacral Spinal Cord of a 7 year-old Blood Hound.** Astrocitoma multifocal anaplásico en el segmento lumbosacro de la médula espinal en una perra Blood Hound de 7 años. NE Vecchio, TA Tobias **38-41**

Revisiones

Review

- Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino.** Maternal recognition of the pregnancy and embryo implantation: bovine model. López AP, Gómez LF, Ruiz Cortés ZT, Olivera M, Giraldo CA **42-47**
- Cianobacterias y cianotoxinas: rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua.** Cyanobacteria and Cyanotoxins: Role of Microcystins on Human and Animal Health and Their Detection In Water Samples DS Pérez, AL Soraci, MO Tapia **48-56**

Artículos de Investigación

Research articles

- Efectividad del muestreo para detectar prevalencia de enfermedades podales en ganado lechero del partido de Tandil.** Effectiveness of Sampling to Detect Prevalence of Foot Diseases in Dairy Cattle of Tandil County. Confalonieri O, Passucci JA, Rodríguez EM, West M, Tapia MO, Soraci A **5-8**
- Puesta a punto e interpretación de la aspiración con aguja fina en el diagnóstico de hiperplasia prostática y prostatitis crónica canina.** Fine Tuning and Interpretation of Needle Aspiration Biopsy in the Diagnosis of Benigne Prostatic Hyperplasia and Chronic Prostatitis in the Dog. González G, Maffrand C, Guendulain C, Otegui F, Gobello C **9-14**
- Prevalencia y detección de factores de riesgo de patologías podales y su influencia en la producción láctea en bovinos de la cuenca lechera mar y sierras de Tandil.** Prevalence And Determination of Risk Factors of Hoof Pathologies and their Influence in Milk Production in Tandil Mar y Sierras Basin. Confalonieri OE, Soraci AL, Passucci JA, Rodríguez EM, Becaluba HM, Tapia MO **15-20**
- Caracterización de secuencias del virus de la arteritis equina obtenidas directamente de muestras de semen de equinos seropositivos.** RT-PCR in Semen Samples Belonging to Positive Horses to Equine Arteritis Virus: Analysis Of New Argentinean Sequences Metz GE, Serena MS, Díaz S, Echeverría MG **21-26**

Comunicaciones breves

Short communications

- Biotipos y sensibilidad antimicrobiana de *Pasteurella multocida* subespecie multocida aisladas de pulmones de cerdos de la Provincia de Buenos Aires.** Biotypes And Antimicrobial Susceptibility of *Pasteurella multocida* Subspecies *multocida* Isolated from Pneumonic Lungs From Pigs of Buenos Aires Province. Moredo F, Vigo G, Leotta G **27-30**
- Evaluación del crecimiento de la línea tumoral humana A549 en las cepas de ratones inmunodeficientes BALB/cAn-nu Y C57BL/6 nu.** Assessment of the Human Tumor Line A549 Growth in Immunodeficient Mice Strains BALB7 cAn-nu and C57BL/6-nu. Cagliada P, Milocco S, Carriquiriborde M, Maschi F, Ayala M, Carbone C **31-33**

Revisiones

Review

- Metabolismo y deficiencia de zinc en bovinos.** Metabolism and Zinc Deficiency in Cattle. Rosa DE, Fazzio LE, Picco SJ, Furnus CC, Mattioli GA **34-44**
- Uso de análogos de GNRH en el control de la reproducción indeseada canina.** GNRH Analogs in the Control of the Undesirable Canine Reproduction. Valiente C, García Romero G, Gobello C **45-51**

EFECTIVIDAD DEL MUESTREO PARA DETECTAR PREVALENCIA DE ENFERMEDADES PODOALES EN GANADO LECHERO DEL PARTIDO DE TANDIL

Confalonieri O¹, Passucci JA², Rodríguez EM³,
West M², Tapia MO⁴, Soraci A⁴

¹ Área de Semilogía Depto. de Clínica; ² Área de Epidemiología Básica. Depto. SAMP;

³ Área de Bioestadística. Depto. SAMP⁴, Área de Toxicología. Depto. FisFarVet.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad
Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires

RESUMEN: Las enfermedades podales del ganado lechero, producen importantes pérdidas económicas. Fue evaluada la efectividad de un muestreo para estimar la prevalencia de enfermedades podales, comparando dicho estimador con el parámetro obtenido al revisar todos los animales. De una población de 12132 se muestrearon 369 animales en 24 tambos en Tandil, durante 2005, estratificados según tamaño. El método de selección fue al azar simple para las vacas en ordeño y en forma sistemática para las vacas secas. El estimador y el parámetro de la prevalencia de enfermedades podales en general y de pietín en particular, fueron comparados mediante el test binomial. La prevalencia muestral de enfermedades podales fue 2.168% (IC95% 0,94-4,23), y el parámetro fue 2,703%, respecto al pietín, el estimador fue 0.813% (IC95% 0,17-2.36) y el parámetro 0,668%. En ambos casos la diferencia no fue significativa ($P > 0.05$). El miembro más afectado fue el posterior derecho tanto en la muestra como en la población (46,95% y 62.,% respectivamente). El grado de claudicación 3 fue el más frecuente tanto en la población (60,37%), como en la muestra (75%). Los parámetros de prevalencia están incluidos dentro de los intervalos de confianza de los estimadores, validando la metodología de muestreo empleada.

Palabras clave: muestreo, enfermedades podales, prevalencia, ganado lechero.

EFFECTIVENESS OF SAMPLING TO DETECT PREVALENCE OF FOOT DISEASES IN DAIRY CATTLE OF TANDIL COUNTY

ABSTRACT: Foot diseases of dairy cattle produce significant economic losses. We evaluated the effectiveness of a sampling to estimate the prevalence of foot diseases. We compare the estimator with the parameter obtained by reviewing all animals. A sample of 369 animals was taken from a population of 12132 animals, in 2005 year and we considerer starts according animals size. The selection method was simple random for milking cows and dry cows in a systematic way. The estimator and the prevalence parameter of foot diseases in general and digital dermatitis in particular, were compared using the binomial test. The sample prevalence in foot diseases was 2,168% (95% CI 0.94 - 4.23), and the parameter was 2,703%, compared with the digital dermatitis, the estimator was 0.813% (95% CI 0.17 - 2.36) and the parameter 0.668%. In both cases the difference were not significant ($P > 0.05$). As well in sample and in population the most affected member was right back (46.95% and 62.5% respectively). Claudication 3 degree was the most common in the population (60.37%) as in the sample (75%). We conclude that the prevalence parameters are included within the confidence intervals of the estimators, validating the sampling methodology employed.

Key words: sampling, foot diseases, prevalence, dairy cattle.

Fecha de recepción: 20/11/07

Fecha de aprobación: 22/04/08

Dirección para correspondencia: O. Confalonieri. Área de Semilogía Depto. de Clínica. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA Pinto 399. Tel/fax: 54-2293-439850. (7000) Tandil. Pcia. de Buenos Aires. Argentina.

E-mail: oonfa@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades podales afectan a los bovinos, particularmente al ganado lechero y cuya incidencia varía relacionándose con características propias de los animales, con el clima y la topografía, entre otras. Estas patologías producen pérdidas económicas importantes, traducidas en pérdida de peso, disminución de la producción láctea, disminución de la actividad sexual y aumento del número de animales eliminados de los rodeos (1, 2).

Una de las formas de obtener información respecto a la prevalencia de una enfermedad en una población es por medio de la realización de un muestreo. Como ventaja fundamental de la utilización del mismo, es el mejorar la calidad de la información recabada y la disminución en los costos. Por el contrario, dentro de las desventajas de utilizar dicha herramienta, figuran el no conocer el total de la población y el que debe ser realizado por un especialista. Una muestra es representativa, no sólo cuando posee un tamaño adecuado, sino que también, que el método de selección sea el correcto, de manera que todas las características de la población estén representadas de forma adecuada.

El objetivo del presente estudio fue determinar el grado de efectividad del muestreo para la detección de la prevalencia de enfermedades podales en tambos del partido de Tandil a través de comparar dichos resultados con los obtenidos al revisar la población.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el año 2005, se estudió la prevalencia de enfermedades podales en vacas de 24 tambos del partido de Tandil, por medio de 2 estrategias diferentes: 1) muestreo estratificado y probabilístico y 2) realizando un censo.

Los tambos fueron clasificados según el número de vacas en:

Tambos chicos: menos de 150 vacas en ordeño

Tambos medianos: entre 150 y 500

Tambos grandes: entre 501 y 1000

Megatambos: más de 1000

Para la primera estrategia se procedió a calcular el tamaño muestral de la siguiente manera:

Determinación del tamaño muestral

Al no contar con información básica sobre prevalencia de enfermedades podales en la zona a estudiar fue considerado el escenario más desfavorable asumiendo una prevalencia (P) del 50% de animales pretendiéndose un error máximo del 10% y una confianza del 95% (3). La cantidad de animales a muestrear fue de 384.

La cantidad de animales a muestrear por establecimiento se asignó en forma proporcional el tamaño del mismo, tomando 5 animales en establecimientos chicos, 16 animales en medianos o grandes y 22 en los megatambos (Tabla 1).

Tabla 1. Cantidad de animales según el tamaño del establecimiento y cantidad de animales a muestrear

Table 1. Number of animals depending on the size of the establishment and number of animals sampled

Tipo de tambo	N° animales*	%	N° establecimientos a muestrear	N° animales a muestrear por establecimiento	N° animales a muestrear
Chicos	1394	5	4	5	20
Medianos	8937	32	8	16	128
Grandes	9358	34	8	16	128
Mega	8155	29	5*	22	110
Total	27.844	100	25		386

* Extraído de las planillas de la Sociedad Rural de Tandil

** Sólo hay 5 megatambos

Forma de selección de la muestra

Una vez determinado el número de animales a muestrear en cada establecimiento se procedió a la selección de los mismos, muestreando tanto vacas en ordeño como vacas secas, pero la metodología utilizada para cada grupo fue diferente. En el grupo de vacas en ordeño, fue realizado un muestreo al azar simple utilizando una tabla de números aleatorios. Una vez obtenidos los números de los animales a muestrear, se procedió a la elección de los mismos, de acuerdo al orden en el cual ingresaban a la sala de ordeño, para no perturbar el trabajo diario dentro de la misma,

por ejemplo para un establecimiento chico los números fueron 64, 35, 128, 15 y 85. En este ejemplo se muestrearon los animales que fueron ordeñados en el 15°, 35°, 64°, 85° y 128° lugar. Dentro del grupo de las vacas secas, se realizó un muestreo sistemático, aprovechando los trabajos rutinarios realizados con este grupo de animales, obteniéndose la información en la medida que los mismos pasaban por la manga.

Para la segunda estrategia, se procedió a revisar todos los animales con enfermedades podales presentes en los 24 establecimientos muestreados, siendo 12132 vacas el total de animales

que conformaban la población en estudio.

Posteriormente a partir de los datos del muestreo se estimó la prevalencia de enfermedades podales y el intervalo de confianza del 95% y a partir de la información del censo fue calculado la verdadera prevalencia poblacional (parámetro).

Para comparar ambas prevalencias, se realizó un test para igualdad de proporciones, test binomial (4). Igualmente se procedió a comparar la prevalencia de pietín entre el valor estimado y el parámetro.

Además se compararon entre ambos grupos las siguientes variables: miembro afectado, grado de claudicación y pezuña afectada.

RESULTADOS

Por razones ajenas al diseño de la muestra es que sólo se muestrearon 369 animales distribuidos en 24 tambos, lo cual determina que el error aceptado o precisión fue del 10,2 % de la prevalencia.

De los 369 animales revisados en la mues-

Tabla 2. Miembros afectados por enfermedades podales en animales de ganado lechero, en el muestreo y la población. Tandil. 2005

Table 2. Members affected by foot diseases in animals of dairy cattle, in the sampling and population. Tandil. 2005

Miembro/s afectados	Muestreo		Población	
	Frec.	%	Frec.	%
Anterior Derecho	-	-	14	4.27
Anterior Izquierdo	1	12.50	25	7.62
Posterior Derecho	5	62.50	154	46.95
Posterior Izquierdo	2	25.00	109	33.23
Ambos posteriores	-	-	24	7.32
Los 4 miembros	-	-	2	0.61
Total	8	100	328	100

En la tabla 3 se muestran los grados de claudicación alcanzados por las patologías podales, en el muestreo y la población.

Tabla 3. Grado de claudicación de las enfermedades podales en animales de ganado lechero, según muestreo y población. Tandil. 2005

Table 3. Degree of claudication of foot diseases in animals dairy cattle, according to sampling and population Tandil. 2005

Grado de claudicación	Muestreo		Población	
	Frec.	%	Frec.	%
1	-	-	3	0.91
2	2	25	73	22.26
3	6	75	198	60.37
4	-	-	51	15.55
Sin especificar	-	-	3	0.91
Total	8	100	328	100

DISCUSIÓN

Los parámetros de prevalencia están incluidos dentro de los intervalos de confianza de los estimadores correspondientes, no encontrándose diferencias significativas en las proporciones de enfermedades podales.

tra, el 2,168% (8/369) de los mismos tenían enfermedad podales. El intervalo de confianza binomial exacto del 95% de dicho estimador fue 0,94 – 4,23. De los 12132 animales que componían la población, 328 presentaron enfermedades podales, que representa una prevalencia del 2,703%. El test binomial no detectó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambas proporciones.

Dentro de las enfermedades podales, se determinó la prevalencia de pietín en ambos grupos. En el muestreo la prevalencia fue del 0,813% (8/369) con un intervalo de confianza binomial exacto del 95% que va entre 0,17 y 2,36. La prevalencia de pietín en la población fue del 0.6676% (81/12132). El test binomial tampoco detectó diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambas proporciones.

En la tabla 2 se muestran las frecuencias y los porcentajes de miembros afectados de enfermedades podales, tanto en el muestreo como en la población.

Por ultimo, se presentan los resultados obtenidos, según pezuña afectada por enfermedades podales en animales de tambo, según muestreo y población.

Tabla 4. Pezuña afectada por enfermedades podales en animales de ganado lechero, según muestreo y población. Tandil. 2005

Table 4. Hoof affected by foot diseases in animals ganado lechero, according to sampling and population. Tandil. 2005

Pezuña afectada	Muestreo		Población	
	Frec.	%	Frec.	%
Lateral	-	-	125	38.11
Medial	1	12.5	40	12.20
Ambas	3	27.5	35	10.67
Sin especificar	4	50	128	39.02
Total	8	100	328	100

El miembro más afectado por las mismas fue el miembro posterior derecho con un 46,95% en la población y un 62,5% en la muestra.

Respecto al grado de claudicación, en la población el grado 3 fue el que tuvo mayor proporción, con un 60,37% y en la muestra el mismo fue de 75%.

O. Confalonieri y col.

Por último y al comparar la/s pezuña/s afectada/s, encontramos que en la población la más afectada es la lateral, mientras que en la muestra son ambas pezuñas.

Los resultados obtenidos a partir de la muestra para detectar animales con patologías podales fue representativo de lo que ocurre en la población, validando la metodología de muestreo empleada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Greenough, H. Lameness in cattle. Eds. Greenough PR, Weaver ad. Philadelphia: W B Ssaunders, 1997, pp 3-13.
2. Schneller, W. Pezuñaas sanas bovinos sanos. Ed. M.C.R. Barcelona. 1985.
3. Marchevsky, N. Procedimientos para estudios de prevalencia de enfermedades crónicas por muestreo. CEPANZO. Nota técnica. 1989. N°18/rev.1.
4. Conover, W. J. Practical Nonparametric Statistics. John Wiley & Son Inc. New York. 1971.

PUESTA A PUNTO E INTERPRETACIÓN DE LA ASPIRACION CON AGUJA FINA EN EL DIAGNOSTICO DE HIPERPLASIA PROSTÁTICA Y PROSTATITIS CRONICA CANINA

González G^{1*}, Maffrand C¹, Guendulain C¹,
Otegui F¹, Gobello C²

¹ Universidad Nacional de Río Cuarto

² Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: La hiperplasia prostática benigna (HPB) y sus complicaciones infecciosas son las enfermedades prostáticas más prevalentes en perros de edad avanzada. Aunque la biopsia ofrece el diagnóstico definitivo, la aspiración con aguja fina (AAF) con guía ecográfica es una herramienta rápida y segura para el diagnóstico citológico presuntivo de las alteraciones prostáticas. El objetivo del presente trabajo fue poner a punto la técnica de AAF prostática ecodirigida y la interpretación del material obtenido en casos de HPB y prostatitis crónica (PC). Se evaluó ecográficamente y se aspiró por vía transabdominal ecodirigida la próstata de 45 caninos. Se tomaron muestras para estudio histopatológico en 16 de los animales. El estudio ecográfico reveló 21 casos de glándulas normales y 24 de HPB (12 con quistes) mientras que el citológico 27 y 15 de los mismos grupos e incluso detectó 3 casos de PC que fueron corroborados por histopatología. Esta última reveló también 4 próstatas normales y 9 HPB. Debido al procedimiento de AAF del tejido prostático, tres animales (6.7%) presentaron hematuria, que en todos los casos fue autolimitante. Este estudio sugiere un acuerdo entre la citología y el diagnóstico histopatológico en la HPB y la prostatitis crónica, lo que califica a la AAF ecodirigida como una maniobra diagnóstica útil para la evaluación de enfermedades no supurativas, no neoplásicas de la glándula prostática del perro.

PALABRAS CLAVES Perro- próstata – aspiración por aguja fina- citología

FINE TUNING AND INTERPRETATION OF NEEDLE ASPIRATION BIOPSY IN THE DIAGNOSIS OF BENIGNE PROSTATIC HYPERPLASIA AND CHRONIC PROSTATITIS IN THE DOG

ABSTRACT: Benign prostatic hyperplasia (BPH) and its infectious complications are very prevalent diseases in the aging dog. Although biopsy offers the definitive diagnosis, ultrasound guided-fine needle aspiration (US-FNA) cytology is a safe and quick tool for the presumptive diagnosis of prostatic conditions. The aim of this study was to fine tune the technique and interpretation of US-FNA in cases of BPH and chronic prostatitis (CP). The prostate of 45 dogs were transabdominal ultrasounded and aspirated. Tissue for histopathological diagnosis was also carried in 16 dogs. Ultrasound examination presented 21 cases of normal gland and 24 cases of BPH (12 with cysts) while cytology showed 27 and 15 cases of the same groups and even detected 3 cases of CP that were corroborated by histopathology. This last technique also revealed 4 normal and 9 hyperplastic glands. Three animals (6.7%) presented transient hematuria. This study suggests an agreement between cytology and histopathologic diagnosis of BPH and chronic prostatitis which guarantees the use of US-FNA in the evaluation of non suppurative, non- neoplastic diseases in the canine prostate.

KEY WORDS Canine - prostate- fine needle aspiration - cytology

Fecha de recepción: 20/02/07

Fecha de aprobación: 20/6/08

Dirección para correspondencia G. González. Enlace ruta 8 y 36, km 602, (5800) Río Cuarto Fax (358) 468280

Email: ggonzalez@ayv.unrc.edu.ar

INTRODUCCION

La próstata es la única glándula sexual accesoria del macho canino, se localiza con predominio en el espacio retroperitoneal, caudal a la vejiga y se relaciona con el recto dorsalmente y con la sínfisis púbica y la pared abdominal ventralmente (1). En términos generales, las enfermedades prostáticas pueden clasificarse como neoplásicas, infecciosas u hormonales; la hiperplasia prostática benigna (HPB) es la entidad que se presenta con mayor frecuencia (2,3).

La HPB se caracteriza por un desarrollo anormal del tejido glandular y una irregularidad en el tamaño y forma de los acinos prostáticos. ⁽⁴⁾ Más del 80% de los caninos enteros mayores de 5 años exhiben hiperplasia y el volumen de la glándula de esos animales es 2.6 veces más grande que en perros normales de igual peso (5,6). La hiperplasia glandular suele acompañarse de alteraciones quísticas más o menos importantes (7,8).

La prostatitis crónica (PC) es una infección prolongada en el tiempo, que puede ser asintomática y solo ser descubierta luego del diagnóstico de infecciones urinarias recurrentes. La *Escherichia coli* es el organismo aislado con mayor frecuencia (9). La inflamación crónica puede causar fibrosis y variaciones en la consistencia pero sin aumento de tamaño, aunque, en casos de presentar coelctas (quistes y/o abscesos) su tamaño puede aumentar. A la ecografía se observa un aumento marcado de la ecogenicidad, focal o difusa y puede estar acompañada de áreas anecoicas de distintos tamaños que representan abscesos, lo que impide diferenciarla de la HPB o la neoplasia (10).

La ecografía es útil para detectar cambios en el parénquima de la glándula y diferenciar lesiones sólidas de cavitarias, sirve como guía para realizar las aspiraciones y biopsias, minimiza la morbilidad y asegura la colección de muestra en la enfermedad localizada.⁽¹¹⁾ No obstante, el examen ecográfico en la HPB no permite emitir un diagnóstico certero, tampoco distinguirla de la prostatitis crónica o de ciertas lesiones tumorales, por lo que es indispensable la citología y/o biopsia para confirmar el diagnóstico (12,13).

La aspiración con aguja fina (AAF) tiene varias ventajas para el diagnóstico de las enfermedades prostáticas por ser una técnica rápida, segura, poco invasiva; el principal objetivo de esta técnica de diagnóstico es obtener un número significativo de células intactas que reflejen la composición de una lesión focal o generalizada. ⁽¹⁴⁾ A pesar de ello tiene limitaciones específicas, por ejemplo, está contraindicada en prostatitis supurativa o en abscesos prostáticos ya que un amplio número de bacterias pueden ser sembradas a lo largo del trayecto de la aguja; también esta técnica puede proveer insuficiente material

para el diagnóstico y las lesiones pequeñas pueden no ser detectadas. Las complicaciones de la aspiración son raras, ocasionalmente ha sido observada una hematuria transitoria (15).

La histopatología de las enfermedades prostáticas continúa siendo la mejor prueba diagnóstica, ya que, tanto la arquitectura del tejido como cada detalle, puede ser valorado (16,17). Con frecuencia la biopsia es usada para verificar un diagnóstico tentativo de la AAF. Estudios previos demostraron una correlación de la citología con la histopatología del 80% en el adenocarcinoma y de un 75 % en las prostatitis (18). No obstante, por distintas razones que incluyen las económicas, anestésicas entre otras, la biopsia no es frecuentemente realizada en muchas situaciones clínicas.

El objetivo del presente trabajo fue poner a punto la técnica de AAF prostática ecodirigida y la interpretación del material obtenido en casos de HPB y PC en el Servicio de Ecografía y de Análisis Clínicos de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC.

MATERIALES Y METODOS

Se evaluaron 45 caninos adultos, provenientes de la perrera municipal, cuyas edades oscilaban entre 1 y 14 años y sus pesos entre 9 y 40 kg. Inicialmente se clasificaron los animales por ecografía (Eckhoson SONO ACE, Seoul, Corea, transductor convex de 5 y 6,5 Mhz) de acuerdo a la ecogenicidad, volumen y morfología de la glándula prostática como normales, con HPB o con hiperplasia prostática quística (HPQ).

Se consideró una glándula ecográficamente normal aquella con textura granular media, uniforme, con una delgada cápsula hiperecoica, de forma circular o elíptica al corte longitudinal y bilobulada (forma de mariposa) y simétrica, al corte transversal (19,20). Contrariamente, una glándula con HPB se definió como aquella asimétrica con parénquima hiperecoico o hipoecoico, aunque, mantuviera la arquitectura normal (10,11,13). Cuando la HPB se acompañaba de quistes dentro del parénquima se la denominó HPQ (19,20).

Inmediatamente después los caninos fueron sedados con maleato de acepromacina (Acedán®, Holliday) 0,5-1 mg/kg vía im y colocados en decúbito dorsal sobre la camilla. La piel a nivel del área inguinal se preparó como un campo quirúrgico aséptico. El transductor del ecógrafo se ubicó a un lado del prepucio y la aspiración ecodirigida de la glándula prostática la realizó la misma persona. Con una mano guiaba el transductor y con la otra la aguja de punción. Se utilizaron agujas espinales con estilete de 6-15 cm de longitud. La aguja se introdujo en forma perpendicular al haz de ultrasonido dirigida hacia la próstata y se controló su avance en la pantalla

del monitor. Una vez lograda la posición deseada dentro de la glándula, se retiró el estilete, se acopló una jeringa de 20 ml y se movilizó la aguja en distintos sentidos aplicando presión negativa reiteradas veces (21,22).

Con el material obtenido se realizaron por deslizamiento en forma inmediata los extendidos en portaobjetos, en número variable dependiendo de la cantidad de material y se colorearon con la tinción de May Grunwald Giemsa. Cada preparado fue observado en 10x y 100x con inmersión y de acuerdo a la celularidad observada se lo clasificó como normal, con HPB o con PC según Zinkl (23).

En aquellos casos que se visualizaron quistes intraprostáticos se los aspiró para su estudio citológico y cultivo de bacterias aeróbicas. El líquido aspirado fue centrifugado a 1000 rpm en una citocentrífuga durante 10 min, se tomó una gota del sedimento se realizó un frotis que se fijó al aire y se tiñó con May Grunwald-Giemsa (21,22). Cuando el material fue muy viscoso se colocó una gota de solución fisiológica entre dos portaobjetos y cuando la misma se extendió a su diámetro máximo, se separaron de modo que quedaron dos extendidos (23). Cada muestra fue observada como se explicó anteriormente.

En 16 de los animales se tomaron, además, muestras para su estudio histopatológico, las que se fijaron en formalina y colorearon con hematoxilina-eosina de acuerdo a técnicas previamente descriptas (21,23).

RESULTADOS

El estudio ecográfico de los 45 animales reveló 21 casos normales, 12 con HPB y 12 con HPQ (Tabla 1). Ningún caso de prostatitis crónica pudo ser detectado por este método.

En 2 casos (4,4 %) la celularidad aportada por la aspiración fue insuficiente para la clasificación del preparado ya que solo se observaban eritrocitos y escasos neutrófilos. En estos casos se repitió la aspiración obteniéndose material suficiente en esta segunda oportunidad.

En las próstatas citológicamente normales las células epiteliales observadas fueron cúbicas, columnares y escasas transicionales. Las células epiteliales cúbicas se encontraban aisladas en grupos, eran de tamaño pequeño o medio, con núcleo redondo o ligeramente oval, y de ubicación central o periférica. El citoplasma de estas células era ligeramente basófilo con aspecto finamente granular y ocasionalmente vacuolizado. Cuando las células aparecían agrupadas no siempre se distinguieron los bordes citoplasmáticos (Figura 1). Las células columnares resultaron más cilíndricas, con núcleo redondeado o ligeramente oval ubicado en la porción basal. El citoplasma era levemente basófilo y en algunas células se observaron pequeñas vacuolizaciones en el borde

Tabla 1: Resultados de los estudios ecográficos, citológicos, bacteriológicos e histopatológicos prostáticos, realizados en 45 caninos machos.
Table 1: Ultrasonographic, cytological, histopathological and bacteriological prostatic findings in 45 male dogs.

Canino	Ecografía	Citología	Histopatología	Cultivo
1	normal	normal	no se realizó	no se realizó
2	HPQ	HPB	no se realizó	negativo
3	HPQ	HPB	no se realizó	negativo
4	HPQ	normal	Normal	negativo
5	HPQ	normal	no se realizó	positivo
6	HPB	HPB	HPB	no se realizó
7	normal	normal	no se realizó	no se realizó
8	HPB	HPB	no se realizó	no se realizó
9	HPQ	HPB	HPB	negativo
10	HPQ	PC	PC/HPQ	positivo
11	HPQ	HPB	HPB	negativo
12	HPQ	HPB	no se realizó	negativo
13	normal	normal	no se realizó	no se realizó
14	normal	normal	no se realizó	no se realizó
15	HPQ	PC	PC/HPQ	positivo
16	HPB	normal	no se realizó	no se realizó
17	HPB	normal	no se realizó	no se realizó
18	normal	normal	no se realizó	no se realizó
19	HPB	HPB	no se realizó	no se realizó
20	normal	normal	no se realizó	no se realizó
21	normal	normal	no se realizó	no se realizó
22	normal	normal	no se realizó	no se realizó
23	normal	normal	no se realizó	no se realizó
24	HPB	HPB	no se realizó	no se realizó
25	HPQ	PC	PC/HPQ	positivo
26	normal	normal	no se realizó	no se realizó
27	normal	normal	no se realizó	no se realizó
28	normal	normal	no se realizó	no se realizó
29	normal	normal	no se realizó	no se realizó
30	HPQ	HPB	HPB	negativo
31	normal	normal	no se realizó	no se realizó
32	normal	normal	normal	no se realizó
33	normal	normal	no se realizó	no se realizó
34	normal	normal	no se realizó	no se realizó
35	normal	normal	normal	no se realizó
36	normal	normal	no se realizó	no se realizó
37	HPB	normal	HPB	no se realizó
38	HPB	HPB	HPB	no se realizó
39	normal	normal	HPB	no se realizó
40	HPB	HPB	HPB	no se realizó
41	HPB	HPB	BPB	no se realizó
42	HPQ	HPB	no se realizó	positivo
43	normal	normal	normal	no se realizó
44	HPB	normal	no se realizó	no se realizó
45	HPB	HPB	no se realizó	no se realizó

HPB: Hiperplasia prostática benigna **HPQ:** Hiperplasia prostática quística **PC:** Prostatitis crónica

basal y granulaciones acidófilas en el apical, relacionadas posiblemente con la actividad secretoria de las mismas (Figura 2).

En las próstatas con diagnóstico citológico de HPB se observaron cambios poco evidentes, como celularidad escasa a moderada, citoplasma basófilo y ligeramente granular. Los núcleos eran redondeados, de localización excéntrica en la mayoría de los casos y rara vez fueron observados nucleolos. La relación núcleo/citoplasma se encontró aumentada con respecto a la próstata normal. En algunos extendidos se observó un incremento en el número de células epiteliales, aumento en la basofilia y marcada vacuolización citoplasmática (Figuras 3 y 4). En un solo caso se observó la presencia de un cuerpo amiláceo, de aspecto homogéneo, fuertemente eosinofílico.

En las PC se observó junto a la presencia de neutrófilos, un incremento de mononucleares, linfocitos y macrófagos. En algunos casos, los macrófagos presentaban eritrofagocitosis o hemosiderina como un indicador de la actividad

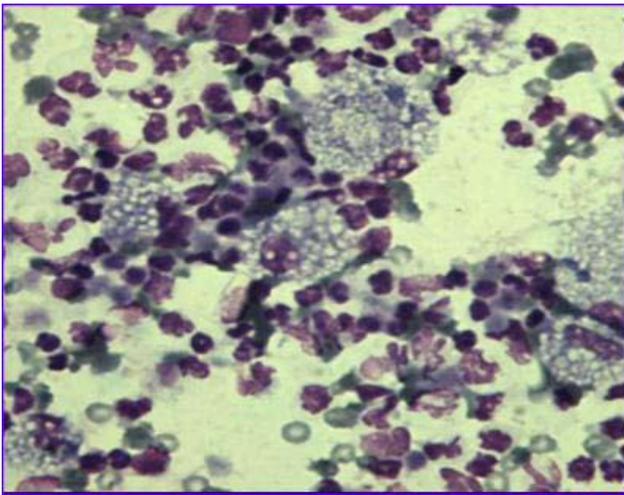


Fig. 1: Células epiteliales, con núcleos ligeramente ovales, excéntricos y citoplasma acidófilo.

Fig. 1. Epithelial cells, with slightly oval, eccentric nuclei and acidophilic cytoplasm. H&E 600x

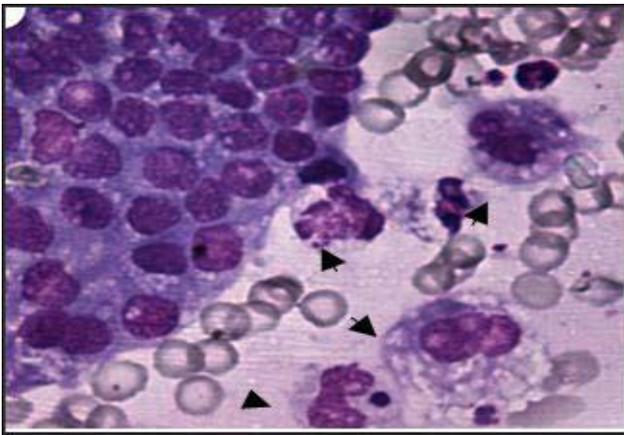


Fig. 2: Glándula prostática normal con células columnares con núcleos periféricos y abundante citoplasma. May Grünwald 1000x

Fig.2: Normal prostate with columnar cells with peripheral nuclei and abundant cytoplasm. May Grünwald. 1000x

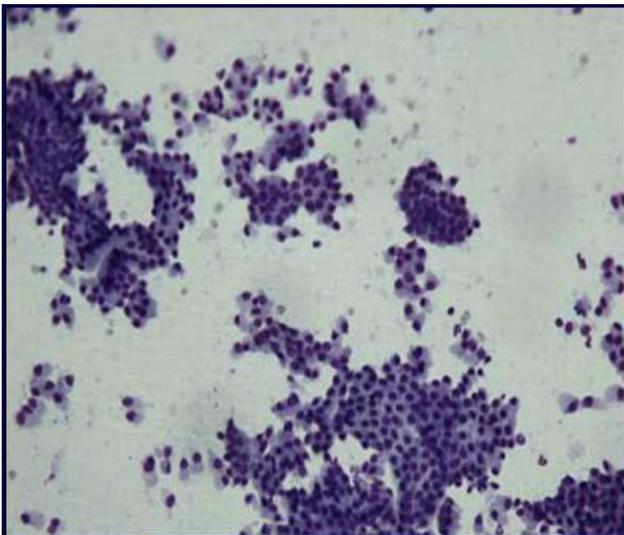


Fig.3: Células epiteliales dispersas y en colgajos. May Grünwald 200x.

Fig. 3: Dispersed and grouped epithelial cells.

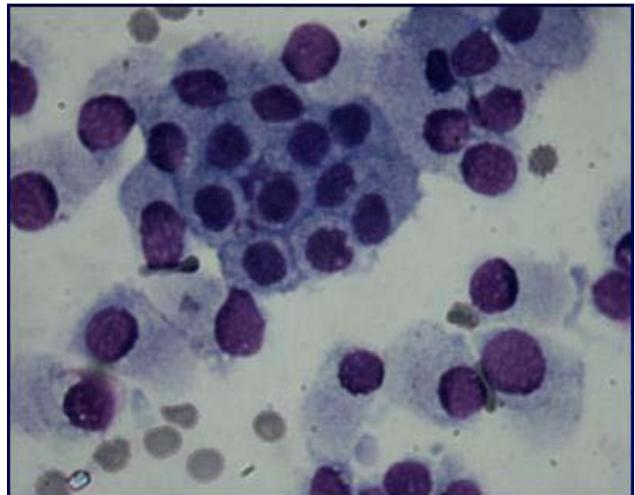


Fig. 4: Colgajo de células epiteliales con marcada basofilia citoplasmática. H&E 1000x

Fig. 4: Groups epithelial basophilic cells. H&E 1000x

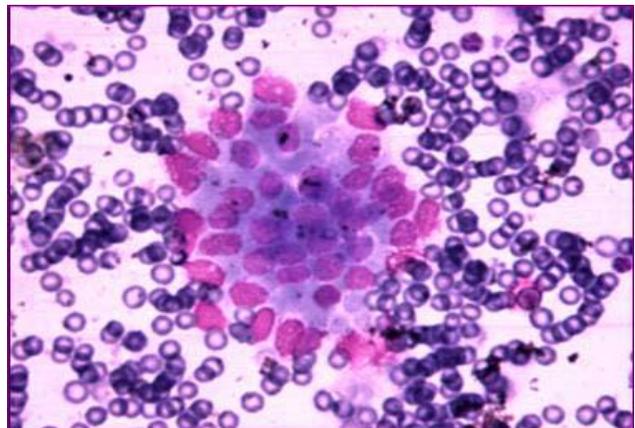


Fig. 5: Racimo de células epiteliales con citoplasma basófilo y macrófagos (flechas). May Grünwald. 1000x

Fig.5: Cluster of epithelial cells with cytoplasmic basophilic and macrophages (arrows). May Grünwald. 1000x

reparativa de estas células frente al proceso inflamatorio y diapédesis de eritrocitos (Figura 5).

El líquido obtenido de los quistes fue acelular y negativo al cultivo en 7 casos (58,3 %). Al concentrarlo, la citología no difirió prácticamente de la glándula normal, se visualizaron unas pocas células epiteliales, escasos neutrófilos y algunos desechos celulares. En los casos que el cultivo del líquido aspirado resultó positivo, 5 de los 12 casos, (41,6%) 2 fueron a *Staphylococcus aureus*, 2 a *Escherichia coli* y 1 a *Proteus sp* y la población bacteriana en todos los casos fue >100.000/ml.

Del total de 45 caninos a los que se les realizó AAF, sólo 3 (6,7 %) presentaron hematuria autolimitante durante 3 días posteriores a la misma. La presencia de células transicionales en el extendido de uno de los casos hace suponer que se atravesó accidentalmente la uretra prostática.

DISCUSIÓN

Como era de esperar, la visualización ecográfica de la próstata previa al estudio citológico fue de gran utilidad en la evaluación del parénquima y la detección de anormalidades locales o difusas para su posterior aspiración. Incluso, es importante hacer notar, que el diagnóstico de las formas quísticas dependió casi exclusivamente de esta técnica.

La escasa celularidad es una limitante conocida de la AAF (1, 15, 23), en este estudio no resultó ser un gran inconveniente ya que se presentó en un escaso porcentaje de pacientes y fue fácilmente solucionado con una segunda aspiración.

El porcentaje relativamente alto de falsos negativos de la AAF para el diagnóstico de HPB puede deberse a que las alteraciones citológicas fueron sutiles comparadas con los de próstata normal. Este hallazgo concuerda con la bibliografía que señala que la citología es menos efectiva en enfermedades hiperplásicas no neoplásicas (18,24). En cambio la PC resultó mucho más fácil de diagnosticar debido al hallazgo constante de células típicas de la inflamación.

La evidencia citológica de inflamación se correlacionó en todos los casos con la infección prostática diagnosticada por el cultivo (1, 24). Solo en 2 casos en que la citología informó normalidad, el cultivo fue positivo, esto refuerza la idea que el líquido aspirado de un quiste siempre debe ser cultivado. La población bacteriana hallada coincide con la informada por la bibliografía (1, 2) para la prostatitis crónica séptica, hallándose cultivos puros para un determinado microorganismo.

La única complicación de la AAF fue la aparición de hematuria leve en un bajo porcentaje de animales en los que no hubo que realizar ningún tratamiento.

El acuerdo encontrado entre AAF y biopsia para el diagnóstico de esas condiciones anormales de la próstata esta en línea con lo publicado previamente (75%) para los desórdenes prostáticos caninos (15).

Este estudio con 45 animales ha permitido familiarizarnos con la técnica e interpretación de AAF ecodirigida, la que demostró ser segura e incluso tener una buena correlación con la histopatología para el diagnóstico de la HPB y PC.

Estos estudios garantizarán en el futuro el uso de la AAF ecodirigida como una maniobra diagnóstica inicial para la evaluación de enfermedades no supurativas, no neoplásicas de la glándula prostática del perro.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica (UNRC). 185/05. Los autores agradecen a la empresa

Royal Canin, por la provisión de alimento balanceado.

BIBLIOGRAFÍA

- Ling G. Enfermedades del aparato urinario de perros y gatos. Diagnóstico-Tratamiento Médico-Prevención. Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina), 1996; p. 23-56.
- Barsanti J, Finco D. Canine prostatic diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1986; 16 (3):587-99.
- Gobello C, Corrada Y. Non infectious disorders of canine prostate: A medical approach. *Compendium of Continuing Education* 2001; 24 (2):99-107.
- Ichihara I, Kawai N, Heibronner R, Rohr H. Stereologic and fine-structural studies of prostatic acinar basal cells in the dogs. *Cell Tissue Res* 1985; 242:519-25.
- Bauzaité N, Albina A. Association of age and breed of dog with distribution of benign prostate hyperplasia (BPH) and mixed lesions. *M. Weterynaryjna* 2003; 59 (8): 686-690.
- Kamolpatana K, Jhonston GR, Jhonston SD. Determination of canine prostatic volume using transabdominal ultrasonography. *Vet Radiol Ultrasound* 2000; 41 (1): 73-77.
- Klausner J, Johnston S, Bell F. Transtornos prostáticos caninos. En: Kirk. R, Bonagura, J. (eds) *Terapéutica Veterinaria*. Ed Mc Graw Interamericana, Buenos Aires (Argentina), 1997; p.1187-93.
- Johnston S, Kamolpatana M, Root--Kustritz MV, Johnston GR. Prostatic disorders in the dog. *Anim Reprod Science* 2000; 60 (61):405-15.
- Ling GV, Nyland TG, Kennedy PR, Hager DA, Johnson DL. Comparison of two sample collection methods for quantitative bacteriologic culture of canine prostatic fluid. *J Am Vet Assoc* 1990; 196 (9):1479-82.
- González GM, Guendulain C, Suárez A, Wheeler T, Otegui F. Ecografía de la próstata canina: normal y patológica. *Pet's Ciencia Veterinaria* 2000; 16 (86):48-56.
- Ruel Y, Barthez P, Mailles A, Begon D. Ultrasonographic evaluation of prostate in healthy intact dogs. *Vet Radiol* 1998; 39 (3):212-16.
- Melograma F, Oertel Y, Kwart AM. Prospective controlled assessment of fine-needle prostatic aspiration. *Urology* 1982; 19 (1):47-51.
- Perez G, Acosta Ortega J, García Solano J. The continuing role of fine-needle aspiration of the prostate gland into the 21 st century: A tribute to Torsten Lowhegen. *Diagnosis Cytopathology* 2004; 32 (5):315-19.
- Maksem JA, Johanning PW, Galang CF. Prostatitis and aspiration biopsy cytology of prostate. *Urology* 1988; 32 (3):263-68.
- Powe JR, Canfield PJ, Martin P. Evaluation of the cytologic diagnosis of canine prostatic disorders. *Veterinary Clinical Pathology* 2004; 33 (3):150-54.
- Cooney RE, Cartee BW, Rumph GP. Ultrasonography of the canine prostate with histologic correlation.

G. González y col.

Theriogenology 1992; 38:877-95.

17. Reyes A, Humphrey P. Diagnostic effect of complete histologic sampling of prostate needle biopsy specimens. *American Journal of Clinical Pathology* 1998; 109 (4):416-22.

18. Ghisleni G, Roccabianca P, Ceruti R, Stefanello D, Bertazzolo W, Bonfanti U, Caniatti M. Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats. *Vet Clin Pathol* 2006; 35 (1):24-30.

19. Feeney D, Johnston G, Klausner J, Ford B. Canine prostatic Ultrasonography. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 1989; 4:44-57.

20. Mattoon J, Nyland T. Ultrasonography of the Genital System. En: Nyland T, Mattoon J. (eds.) *Veterinary Diagnostic Ultrasound*, Ed. W. B. Saunders. Philadelphia (USA), 1995; p. 141-64.

21. Root Kustritz MV. Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology* 2006; 66:567-74.

22. Maksem JA, Johenning PW, Galang CF, Tannenbaun M. Aspiration biopsy

of the prostate gland. *Urol Clin North Am* 1998; 15 (4):555-75.

23. Zinkl JG. Citología del aparato reproductor masculino. En: Cowell R, Tyler R, Meinkoth J. (eds). *Citología y hematología diagnóstica en el perro*. Multimédica (Argentina) 1999; p.231-37.

24. Cohen M, Bohling NW, Wright JC, Welles EA, Spano JS. Evaluation of sensitivity and specificity of cytologic examination: 269 cases (1999-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222 (7):964-7.

25. Sheskin D. *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*, Ed. Delmar Publishers CRC Philadelphia (USA) 3rd ed. 2004.

PREVALENCIA Y DETECCIÓN DE FACTORES DE RIESGO DE PATOLOGÍAS PODOALES Y SU INFLUENCIA EN LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS DE LA CUENCA LECHERA MAR Y SIERRAS DE TANDIL

Confalonieri OE¹, Soraci AL², Passucci JA³,
Rodríguez EM³, Becaluba HM⁴, Tapia MO²

¹Area de Semiología, Depto. de Clínica. ²Area de Toxicología, Depto. de Fisiopatología.

³Area de Bioestadística, Depto. de Sanidad y Medicina Preventiva.

⁴Area de Clínica Médica y Quirúrgica de Grandes Animales. Depto de Clínica.
Facultad de Ciencias Veterinarias.

Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires

RESUMEN: Las patologías podales que afectan a los bovinos, tienen particular importancia en el ganado lechero. Ante la falta de antecedentes en rodeos de la Cuenca Lechera Mar y Sierras, fue realizado un estudio para determinar la prevalencia, su clasificación y detectar factores de riesgo como también la implicancia de las mismas en la producción láctea. Fueron examinados 24 tambos pertenecientes a dicha cuenca entre marzo y diciembre del 2005. El test de locomoción de Sprecher, D. J. y col. (1997)⁸, fue utilizado para determinar el grado de claudicación. El efecto de dichas patologías en la producción fue evaluado por medio de ANOVA y el análisis de riesgo uni y multivariado mediante regresión logística. La prevalencia poblacional de enfermedades podales fue de 2,71 %. Las principales patologías diagnosticadas fueron dermatitis interdigital, dermatitis digital y laminitis crónica. Los animales con mayor producción fueron los más afectados ($p < 0,05$). El análisis de riesgo detectó que la no utilización de toros mejorados de patas y el tipo de suelo del establecimiento "no deseado" fueron factores de riesgo significativos para la presentación de patologías podales ($p < 0,05$), evidenciando la componente ambiental (tipo de suelo) y genética (aploidos) de estas patologías.

Palabras clave: patologías podales, dermatitis digital, laminitis, factores de riesgo, ganado lechero.

PREVALENCE AND DETERMINATION OF RISK FACTORS OF HOOF PATHOLOGIES AND THEIR INFLUENCE IN MILK PRODUCTION IN TANDIL MAR Y SIERRAS BASIN

ABSTRACT: In order to determine the prevalence of lameness, the type of the lesions and degree of cow's lameness a study was carried out in 24 dairy farms. The farms were visited once each between March and December, 2005. In each visit all the cows milked at the time of the visit were observed during locomotion. In lame cows all four feet were examined. The degree of lameness was scored according to Sprecher et al., 1997 scoring of dairy cattle. The mean total prevalence was (2,71 %). The three most frequent lesions were interdigital dermatitis, digital dermatitis and chronic laminitis. In the area of Mar y Sierras dairy basin in Tandil. The univariate risk analysis detected that use of semen of bull improvers of feet and the kind of soil of the establishment are significant risk factors for the development of hoof pathologies.

Key words: hoof. diseases, digital dermatitis, laminitis, risk factors, dairy cattle.

Fecha de recepción: 14/07/08

Fecha de aprobación: 30/09/08

Dirección para correspondencia: O. Confalonieri. Área de Semiología Depto. de Clínica. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA Pinto 399. Tel/fax: 54-2293-439850. (7000) Tandil. Pcia. de Buenos Aires. Argentina.

E-mail: oonfa@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Las patologías podales son enfermedades que afectan a los bovinos, particularmente al ganado lechero, generando diferentes grados de dificultad en la locomoción. Esta situación impide el logro de un pastoreo efectivo. Los animales caminan y se alimentan menos, permanecen más tiempo echados, pierden peso, disminuyen su producción láctea (entre 20 y 50%) (1, 2) y calidad (disminución de materia grasa y de proteína) y por ende se afecta la eficiencia reproductiva y el manejo general del rodeo lechero, representando, junto con otras problemáticas reproductivas y de mastitis, las principales causas de reposición en los tambos. Además y desde el punto de vista económico, estas patologías incrementan los costos terapéuticos, como así también, el tiempo y la mano de obra capacitada requerida. No debemos olvidar que la importancia de las cojeras radica en su efecto sobre el bienestar animal (3). En el toro las lesiones podales, disminuyen tanto la cantidad como la calidad del semen, y además cuando las lesiones en las extremidades posteriores son suficientemente importantes, el animal renuncia a la monta debido intenso dolor que ello ocasiona, resultando no apto para la reproducción (4).

Un aspecto involucrado en la presentación de estas patologías está relacionado con el tipo de instalaciones y manejo de los animales, tipo de suelo y patio en sala de ordeño, (suelos abrasivos), caminos adyacentes al tambo (secos y entoscados), higiene (acúmulo de materia fecal en los pisos de antesala y post-sala de espera), medidas de profilaxis (uso de pediluvios) a los que se ve enfrentada la vaca durante su vida productiva (5, 6, 7).

La disminución de la producción de leche diaria comienza antes que la afección podal se haya diagnosticado clínicamente y exigiendo varios meses post-tratamiento para recobrar los valores iniciales de producción, en el mejor de los casos (2). El reconocimiento precoz de una determinada patología podal (aplicando los conceptos del score de locomoción (8), favorece la pronta recuperación del animal, minimizando significativamente las mermas en la producción láctea.

Podemos resaltar que estas patologías representan un problema mundial fuertemente vinculado con las exigencias de incremento en la producción lechera (9). En un relevamiento realizado en Uruguay, sobre 14 tambos durante el año 1995, fueron encontrados entre el 7 y 20% de animales afectados por diferentes grados de cojera (10). En Argentina, estudios realizados (11), durante un período de 17 meses y sobre establecimientos lecheros de las provincias de Buenos Aires y Santa Fé, mostraron una prevalencia inicial de 23 % y una prevalencia final

de 4.5 % sobre un total de 4621 animales. Los costos anuales de los rodeos de vacas lecheras afectadas por patologías podales muchas veces son subestimados en nuestro país. Estudios realizados en Inglaterra, Canadá y Estados Unidos arrojan un costo anualizado por vaca afectada de U\$S 389 (12).

Ante la falta de antecedentes acerca de la prevalencia de patologías podales en los rodeos lecheros de la Cuenca Lechera Mar y Sierras, particularmente en explotaciones de la zona de Tandil, se ha considerado importante realizar un estudio que permita determinar la prevalencia, la clasificación de las mismas, el grado de claudicación de los animales afectados, la influencia sobre la producción láctea y detectar posibles factores de riesgo que favorezcan su presentación.

MATERIALES Y METODOS

Fueron examinados 24 tambos pertenecientes a la Cuenca Lechera Mar y Sierras en el periodo comprendido entre marzo y diciembre de 2005. Los tambos fueron seleccionados en base al interés de los propietarios por acceder al estudio. Atendiendo las sugerencias provenientes de la Comisión Nacional de Control Lechero, se establecieron 4 categorías de tambos: megatambos (más de 1000 animales); tambos grandes (entre 500 y 1000 animales); tambos medianos (entre 150 y 500 animales) y tambos chicos (menos de 150 animales). De las 12.132 vacas pertenecientes a los 24 establecimientos lecheros, fueron muestreadas 486 vacas registrando la edad, el número de lactancias, los días de lactancia y la producción de leche diaria. El test de locomoción (8), fue utilizado para determinar el grado de claudicación de alguno de los miembros y la consecuente presencia de patologías podales, en todos los animales de los 24 establecimientos. Este test clasifica a la locomoción de las vacas lecheras observando el animal parado y caminando, con especial énfasis en la postura de su espalda. A partir de estas observaciones se determina un score de claudicación como manifestación secundaria del dolor. En la tabla 1 se muestran los scores y la descripción de cada uno.

DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES

Los animales que presentaron algún grado de claudicación fueron separados del rodeo y llevados a la manga para realizar una exhaustiva inspección de sus miembros (incluyendo las pezuñas) y diagnosticando el tipo de lesión presente. Para la clasificación de las afecciones podales se utilizó la siguiente clasificación internacional: a) ENFERMEDADES PRIMARIAS, como son la Laminitis, la Dermatitis Interdigital, la Dermatitis Digital, el Flemón Interdigital o Panandizo.

Tabla 1. Descripción de los Escores de locomoción según Sprecher y col.1997.

Table 1. Locomotion Scores according to Sprecher et al . 1997.

Scores	Condición clínica	Descripción
1	Normal	Se para y camina con postura de la espalda plana. Su paso es normal.
2	Cojera leve	Se para con postura de la espalda plana, al caminar la postura de la espalda es arqueada. Su paso es un poco anormal.
3	Cojera moderada	Se para o camina con postura de espalda arqueada. Pasos cortos con una o más patas.
4	Cojera	Se para o camina con postura de espalda arqueada. Pasos cortos con una o más patas. Una o más patas descansan del peso.
5	Cojera severa	Espalda arqueada. El animal se niega a soportar peso en alguna pata, puede negarse o costarle mucho pararse.

b) ENFERMEDADES SECUNDARIAS, que están relacionadas con alteraciones del corion y con la consiguiente alteración del tejido córneo relacionado. Suelen ser secundarias a las Laminitis, entre las que se encuentran: Contusión, Hemorragia, Ulcera, Separación de la Línea Blanca, Fisura de Talón e Hiperplasia Interdigital y c) COMPLICACIONES, como: Abscesos (de Talón y Retroarticulares), Tendinitis, Artritis Séptica, Osteomielitis, Infección en Vaina Tendinosa y Pododermatitis Séptica Generalizada.

Toda lesión diagnosticada clínicamente fue registrada en una ficha individual incluyendo los datos del propietario, del establecimiento, fecha de la visita, número de caravana del animal, raza, edad (a través de su respectiva ficha de nacimiento y control lechero), producción de leche, número de lactancias, tipo de servicio, distancia recorrida hasta la sala de ordeño, cantidad de ordeños diarios, grado de claudicación, miembro y pezuña afectada, tipo de lesión encontrada y la ubicación de la misma. Además junto con los antecedentes de cada animal se llevó a cabo una encuesta predial, con el objeto de caracterizar las condiciones edilicias del establecimiento lechero, el estado de los accesos a la sala de ordeño, las condiciones de los pisos de la misma y de los corrales de espera y de post-ordeño y el suelo de los potreros donde pastorean los animales como así también los datos sobre el manejo y el lugar de alimentación de los mismos (13).

Respecto al tipo de suelo del establecimiento el mismo fue categorizado en “deseable” en

aquellos casos donde el mismo era permeable y “no deseable” cuando era o muy seco o directamente inundable. Además se consideraron los establecimientos que usaban para reproducción semen proveniente de toros que mejoraban los aplomos o que no lo hacían.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La variable producción de leche diaria, obtenida a partir de los datos del control lechero oficial, fue analizada mediante un Análisis de Variancia (ANOVA) contemplando en el modelo, la edad, el número de lactancias, el establecimiento y la presencia o no de patologías podales. De acuerdo al momento de la lactancia en que se encontraban las vacas, las mismas fueron agrupadas en dos categorías: una con los animales que se encontraban en los primeros tres meses de lactancia (1^{er}, 2^{do}, 3^{er}) y una segunda categoría con las vacas con cuatro o más meses de lactancia. Para el análisis fue utilizado el procedimiento PROC GLM del SAS V9.1.3. La estimación del riesgo (OR) fue realizada mediante regresión logística univariada y multivariada, con el procedimiento PROC LOGISTIC del SAS (14).

RESULTADOS

La tabla 2 muestra el número de vacas observadas en cada tambo, teniendo en cuenta el estado fisiológico-productivo de las mismas y la cantidad de tambos muestreados, agrupados por su tamaño.

Tabla 2. Número de tambos y cantidad de vacas, según tamaño del establecimiento.

Table 2. Number of dairy farms and numbers of dairy cows according to stablishment size.

Tamaño del Establecimiento	Tambos cantidad	Vacas		
		En ordeño	secas	total
Megatambos (más de 1000 vacas)	4	3464	1534	4998
Tambos grandes (500 y 1000 vacas)	4	2143	885	3028
Tambos medianos (150 y 500 vacas)	12	2731	1030	3761
Tambos chicos (menos de 150 vacas)	4	218	127	345
Total	24	8556	3576	12132

La prevalencia poblacional de enfermedades podales fue de 2.71%, las principales patologías observadas fueron: dermatitis interdigital, dermatitis digital y laminitis crónica, con prevalencias de 0,81%, 0,69% y 0,54%, respectivamente.

En la tabla 3 se detallan todas las patologías diagnosticadas.

Tabla 3. Distribución de las patologías podales presentadas en la población.

Table 3. Distribution of Of. Pathologies observed.

Patología	Frecuencia	%
Dermatitis interdigital	98	29.79
Dermatitis digital	84	25.53
Laminitis cronica	66	20.06
Doble suela	36	10.94
Flemon coronario	19	5.78
Ulcera podal	12	3.65
Fractura de muralla	9	2.73
Erosion talones	2	0.61
Exongulacion traumatica	2	0.61
Limax	1	0.30
Total	329	100

Los miembros más afectados fueron los posteriores, el derecho en un 46.95% el izquierdo en un 33.23% y un 7,32% en ambos.

En la tabla 4 se muestran los promedios y su error estándar (e.e) de la producción de leche diaria, la cantidad de lactancias y la edad de las vacas con y sin patologías podales, agrupadas según el periodo de su lactancia.

La mayoría de los animales se encontraban en el primer tercio de la lactancia y durante esta etapa no se observaron diferencias significativas entre el grupo de animales con y sin patologías podales ($P > 0.05$). En las vacas que se encontraban en la segunda parte de su lactancia (4 meses o más) se observó que la producción de leche diaria fue estadísticamente diferente entre el grupo de animales con patologías podales y las sanas ($P = 0,0005$), mostrando que las vacas enfermas tenían una mayor producción. Estos animales generalmente presentan un tamaño de ubre mayor y concuerda con la elevada proporción de miembros posteriores afectados. También

fueron significativamente diferentes la cantidad de lactancias y la edad ($P = 0.0156$ y $P = 0.0027$ respectivamente).

Por otra parte, en relación a la manifestación clínica de las lesiones encontradas, un 60,37% presentaron una claudicación de grado 3, lo que representa una claudicación moderada, que inhabilita a los animales a desarrollar su actividad productiva en el tambo. Las claudicaciones de grado 2 fueron encontradas en un 22,26%.

El análisis de riesgo univariado detectó que la no utilización de semen de toros mejoradores de patas y el tipo de suelo “no deseado” del establecimiento, fueron factores de riesgo significativos para la presentación de patologías podales ($P < 0.05$) (tabla 5).

La “No utilización de toro mejorador de patas” fue detectado como un factor de riesgo, observando que en los establecimientos que no usan toros mejoradores de patas, hay 1.91 veces más chance de que se presenten patologías podales, que en aquellos que si utilizan toros mejoradores. ($OR = 1.91$, $Li = 1.53$, $Ls = 2.39$). Para el tipo de suelo, el cociente de chance estimado fue de $OR = 2.20$ ($Li = 1.73$, $Ls = 2.80$), por lo tanto en los establecimientos que tienen suelos no deseables (o muy secos o inundables) hay 2.20 veces más chance que se presenten patologías podales, que en aquellos que tienen suelos permeables.

Cuando se analizaron las variables en forma conjunta (multivariada) ambos factores siguen siendo factores de riesgo, los contrastes, teniendo en cuenta ambos factores resultaron significativos ($P < 0.05$). En los establecimientos con suelo no deseable y que no usan toros mejoradores, las vacas tienen 2.58 veces más chances de presentar patologías podales que en los establecimientos con suelo deseable y toro mejorador de patas. Aún cuando en los establecimientos es utilizado semen de toros mejoradores de patas, las vacas que es encuentran expuestas a suelos secos o inundables tienen más chance ($OR = 1.89$) de presentar patologías podales que aquellas que se encuentran sobre pisos deseables. Por último, cuando se comparó el uso de toros mejoradores y los suelos no son deseables, se observó que el

Tabla 4. Promedio y error estandar de la producción de leche diaria, número de lactancias y edad, para cada etapa de la lactancia, según la presencia o no de patologías podales.

Table 4. Mean and estandar desviation of daily milk production, lactancy, and age, for each different lactancies according to the presence or absence of hoof Pathologies.

Etapa de la Lactancia	Sanas			Enfermas			P valor
	N	Media	e.e.	N	Media	e.e.	
1° al 3° mes							
Producción diaria	217	20.91	0.5	210	19.63	0.4	0.9204
Cantidad lactancias	217	3.20	0.1	210	2.38	0.1	0.6419
Edad (en años)	217	5.73	0.1	210	4.6	0.1	0.1341
4° mes o más							
Producción diaria	41	20.51	0.9	18	23.68	1.2	0.0005
Cantidad lactancias	41	2.98	0.9	18	2.67	0.3	0.0156
Edad (en años)	41	5.13	0.3	18	4.75	0.33	0.0027

Tabla 5: OR estimadas para el factor “ Usa o No toros mejoradores de patas” y tipo de suelo del establecimiento.

Table 5. O R estimate for the factor use or no use of bull improvers of feet and kind of soil of the establishment.

tor	Con patología	Sin patología	OR	LC95%
ivariados				
No usa toro mejorador	142 (4.1)	3353 (95.9%)		
Si usa toro mejorador	187 (2.2%)	8450 (97.8%)	1.91	1.53-2.39
Suelo no deseable	236 (3.6%)	6320 (96.4%)		
Suelo deseable	93 (1.7%)	5483 (98.3%)	2.20	1.73-2.81
Itivariados (Contrastes)				
o no deseable y toro no jorador	138 (4.1%)	3209 (95.9%)		
o deseable y toro mejorador	89 (1.6%)	5339 (98.4%)	2.58	1.97-3.38
o no deseable y toro mejorador o deseable y toro mejorador	98 (3.1%) 89 (1.6%)	3111 (96.9%) 5339 (98.4%)	1.89	1.41-2.53
o no deseable y toro no jorador	138 (4.1%)	3209 (95.9%)		
o no deseable y toro mejorador	98 (3.1%)	3111 (96.9%)	1.37	1.05-1.78

no usar semen de toros mejoradores aumenta la chance de presentar patologías en 1.37 veces.

DISCUSION

Este trabajo representa el primer estudio sobre prevalencia de lesiones podales en la Cuenca Lechera Mar y Sierras, involucrando un importante número de animales examinados. La prevalencia poblacional de enfermedades podales encontradas fue de 2,7%. Dicho valor difiere con los establecidos (15, 16) en Uruguay y Chile, cuyos rangos fueron del 11 al 21% y 9,1% respectivamente.

Otros estudios realizados en nuestro país (11), durante un período de 17 meses y sobre establecimientos lecheros de las provincias de Bs. As. y Santa Fé, mostraron una prevalencia inicial de 23,3% (1071 vacas) y una prevalencia final de 4,5% (207 vacas) sobre un total de 4621 animales.

Existen otros autores que han llevado adelante estudios de prevalencia en otras partes del mundo mostrando diferentes porcentajes: (9) 16,7%, (17 y 18), señalan prevalencias entre un 8 a un 15%, (19 y 20) de un 7% para Australia y Nueva Zelanda. Estas variaciones en prevalencias se relacionan fuertemente con años y lugares en que se realizan los estudios, diseño experimental para la toma de datos, cantidad de establecimientos muestreados y diferentes patologías estudiadas.

Las patologías podales más frecuentemente encontradas en los muestreos, fueron la Dermatitis Interdigital y la Dermatitis Digital, 29,8% y 25,5% respectivamente. Dichos valores son semejantes a los expresados (6), pero mayor al establecido con una prevalencia de Dermatitis Interdigital de un 13,5% en un estudio realizado en Belo Horizonte(21). En la Universidad de Tennessee (U.S.A.) (5) determinaron valores

mayores de 37,4% para la Dermatitis Digital. Estas patologías han sido clasificadas como las de mayor problemática en producción lechera (6). Sin embargo, estos hallazgos difieren en tipo y porcentaje con los estudios en Chile (16), quien destaca que la patología más observada es la Deformación Crónica de la pezuña con un porcentaje del 19,8% del total de las patologías podales encontradas. Otros trabajos señalan a la Laminitis y Pezuña en Tijera con prevalencias del orden de 3 a 5 %, (22y 23).

Las claudicaciones de grado 2, clasificadas como claudicaciones leves, fueron observadas en un 22.26%, coincidiendo con lo expresado (16).

En nuestro trabajo, los miembros más afectados fueron los posteriores, particularmente el derecho con un 46.95% de patologías y luego el izquierdo con un 33.23% de lesiones podales. En este sentido, estos resultados concuerdan con la mayoría de los autores. (16, 21, 24, 25, 26, 27 y 28).

Coincidimos con lo que expresa (9) en cuanto a que las patologías podales son un problema fuertemente vinculado a las exigencias de incremento en la producción lechera porque en nuestro trabajo, en el lote de vacas que se encontraban en la segunda parte de su lactancia (4 meses o más),se observó que la producción de leche diaria fue estadísticamente diferente entre el grupo de animales con patologías podales y las sanas mostrando que las vacas enfermas en la segunda etapa de la lactancia (a partir del 4to. mes) tenían una mayor producción. Esto podría estar relacionado a que los animales más productores, sean más propensos a dichas patologías ya que al aumentar la producción disminuiría la rusticidad. Además, las diferencias comienzan a ser detectadas, recién a partir del 4to. mes de lactancia, donde la merma de producción se hace mas evidente.

Surgen como factores de riesgo para la presentación de lesiones podales, el tipo de piso no deseable (muy duro o inundado) y la no utilización de semen de toros mejoradores de patas.

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de este estudio consideramos que es muy importante educar a los productores de la industria lechera para que no desestimen la utilización de toros mejoradores de patas, al igual que el tipo de suelo del establecimiento y que le asignen a las patologías podales la importancia que realmente tienen, en la producción, reproducción y por sobre todas las cosas en el confort y bienestar animal. De esta manera se logrará disminuir los costos de producción, aumentar la productividad del sector y competir con los mercados internacionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Münzenmayer, W. Afecções podales em rodeos lecheros: desafio profissional. *Therios* (suppl). 1997; 1-31.
2. Green LE, Hedges VJ, Schukken YH, Blowey RW, Packington AJ. The impact of clinical lameness on the milk yield of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2002; 85, 2250-2256.
3. Rushen J. Assessing. The welfare of dairy cattle. *J. Appl. Anim. Welf SCI.* 2001.
4. Schneller W. Pezuñas sanas bovinos sanos .Ed. M. C. R. Barcelona. 1985.
5. van Amstel, S. R.; Shearer, J.K.; Palin, F. L.; Cooper, J, Rogers, G. The effects of party, days in milk, season and walking surface on thin soles in dairy cattle. Presentación oral-14 Simposio internacional cojeras en ruminantes. Colonia. R.O. Uruguay. 2006.
6. Zemljic B. Digital dermatitis. The costs and benefits of the control. Prestación oral. 14 Simposio internacional cojeras en ruminantes. Colonia-R.O. Uruguay. 2006.
7. Bergsren C. Haemorrhages of the sole horn of dairy cows as a retrospective indicator of laminitis: an epidemiological study. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 1994; 35 55-66.
8. Sprecher DJ, Hostetler DE, Kaneene JB. Lameness scoring system that use posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriologeno-logy.* 1997; 47: 1179-1187.
9. Greenough H. Lameness in cattle. Eds. Greenough PR, Weaver ad. Philadelphia: W B Saunders. 1997; p.3-13.
10. Acuña R. Dermatitis digital del bovino. Enfermedad de Mortellaro. *Veterinaria.* 1996; Vol. 32. N°131. 22-23.
11. Rutter B. Occurrence of foot lameness in dairy cow in Argentina XIX W.B.C. Edinburgh. 1996; July 132.
12. Enting H, Kooij D, Dijkhuizen AA, Huirve RMB, Noordhuizen Stassen EN. Economic losses due to clinical lameness in dairy cattle. *Livestock Production Science.* 1997. 49, 3. 253-267.
13. Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, Dicker RC, Sullivan K, Fagan RF, Arner TG. *Epi Info Version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers.* Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, U.S.A. 1994.
14. Statistical Analysis Systems, Version 9.1.3 (SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA)
15. Acuña R. Lameness is Uruguay's biggest problem. *The hoof trimmers association newsletter.* 2001; p. 10-11.
16. Tadich NA, Hettich E, Van Schaik G. Prevalencia de cojeras en vacas de 50 rebaños lecheros del sur de Chile. *Arch Med Vet.* 2005; vol. XXXVII N° 1. p 29-36.
17. Wells SJ, Trent AM, Marsh WE, Williamson NB, Robinson RA. Some risk factor associated with clinical lameness in dairy herd in Minnesota and Wisconsin. *Vet Rec.* 1995; 136 p. 537-540.
18. Warnick LD, Pelzer KDd, Meadows AW, Dilorenzo KA, Whittier WD. The relationship of clinical lameness with days in milk, lactation number, and milk production in a sample of Virginia dairy herds. *J Dairy Sci.* 1995; 78 (Suppl.1), 169.
19. Cagienard B. Some observations on disease incidence among dairy cattle in North Taranaki. *N Z Vet J.* 1973; 21, p. 170-174.
20. Dewes HF. Some aspects of lameness in dairy cattle herds. *N.Z. Vet.J.* 1978; 26, p.147-148 and 157-159.
21. Molina LR, Caravalho AU, Facury Filho Baggot DG. Lameness in cattle. *Brit. Vet.J.* 1981; 137, p.113-132. E.J. Prevalence and classification of foot problem in lactating cows in Belo Horizonte, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec,* 1999, 51.149-152.
22. Greenough PR. Horizontal fissure and other conditions affecting the wall of the bovine claw. *Vet. clinic North Am. Food animal Pract.* 2001; 17(1):93-110. Review.
23. Russell AM, Rowlands GJ. Survey of lameness in dairy cow. *Vet Rec.* 1982; 111, p. 155-160.
24. Enevoldsen C, Gröhn YT. Sole ulcers in dairy cattle: associations with season, cow characteristics, disease, and production. *Journal of dairy science.* 1991; 74 (4) p. 1284-1298.
25. Tranter WP. A case study of lameness in tree dairy herds. *New Zeland Vet.J.* 1991; 39; p.88-96.
26. Fitzgerald T, Norton BW, Elliot R, Podlich H, Svendsen OL. The influence of long term supplementation with biotin on the prevention of lameness in pasture fed dairy cows. *J Dairy Sci.* 2000; 83, p.338-344.
27. O'Callaghan K. Lameness and associated pain cattle challenging tradicional percepción. In practice. 2002; 24, p.212-219.

CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS DEL VIRUS DE LA ARTERITIS EQUINA OBTENIDAS DIRECTAMENTE DE MUESTRAS DE SEMEN DE EQUINOS SEROPOSITIVOS

Metz GE¹, Serena MS¹, Díaz S², Echeverría MG²

Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata,
¹ Becarios del CONICET, ² Investigadores del CONICET, IGEVET CCT-LA PLATA

Resumen: Arteritis Viral Equina (AVE) ocasiona infecciones, en su mayoría subclínicas, pero puede causar abortos y enfermedad respiratoria. Los ORF5 y ORF6 del virus codifican las proteínas de envoltura GP5 y M cuya interacción es crítica para la infectividad y expresión de determinantes antigénicos del virus. Existe un solo serotipo de AVE, aunque hay variabilidad entre aislamientos de regiones geográficas diferentes, sobre todo a nivel del ORF 5. En Argentina se realizaron 5 aislamientos en 2001, 2002 y 2007. En este trabajo se caracterizan y comparan entre sí nuevas secuencias de virus de arteritis obtenidas de muestras de semen de archivo con las 5 cepas Argentinas. En el análisis de identidad, se evidencia que las secuencias LP02/R, LP02/C, LP02/P, LT-LP-ARG, RO-LP-ARG y RZ-LP-ARG resultaron las más similares entre sí (99%) mientras que las secuencias RO-LP-ARG y LT-LP-ARG tienen 100% de identidad. En el árbol filogenético, todas las secuencias a excepción de LP01 forman un único cluster. La secuenciación de esta porción del genoma permite determinar las características moleculares de las cepas circulantes en Argentina, aunque en estudios futuros debería determinarse si estas variaciones son responsables de las diferencias de tropismo, antigenicidad y virulencia de las cepas.

Palabras claves: arteritis viral equina – RT-PCR- semen- secuencias ORF 5

RT-PCR IN SEMEN SAMPLES BELONGING TO POSITIVE HORSES TO EQUINE ARTERITIS VIRUS: ANALYSIS OF NEW ARGENTINEAN SEQUENCES

Abstract: Equine arteritis virus causes subclinical infections characterized by respiratory disease, abortion or pneumonia. The interaction of proteins GP5 and M, codified on ORF 5 and 6, respectively, is critical for infectivity. Only one serotype of EAV is described although variations between isolates from different geographic regions exist. In Argentina 5 EAV strains were isolated in 2001 (LP01 strain) in 2002 (LP02/R, LP02/C and LP02/P) and in 2007 (LT-LP-ARG strain). In this work we compare and characterize new sequences of EAV obtained from 3 archive semen samples together with the Argentinean strains. LP02/R, LP02/C, LP02/P, LT-LP-ARG, RO-LP-ARG and RZ-LP-ARG showed 99% homology by sequences identity, meanwhile RO-LP-ARG and LT-LP-ARG have 100% identity. Phylogenetic tree analysis identified one cluster including LP02/R, LP02/P, LP02/C, LT-LP-ARG, RO-LP-ARG, RZ-LP-ARG and KB-LP-ARG. The results obtained allowed us to determine molecular characteristics between the Argentinean strains. Further studies will be needed in order to determine if the variations found are responsible for antigenicity, tropism and virulence.

Key Words: equine viral arteritis – RT-PCR- semen samples- ORF 5 sequences

Fecha de recepción: 25/07/08

Fecha de aprobación: 10/08/08

Dirección para correspondencia: María G. Echeverría, Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata, Argentina.

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

INTRODUCCIÓN

Arteritis Viral Equina (AVE) es una enfermedad caracterizada por trastornos respiratorios en adultos, abortos y neumonía en potrillos [1]. Si bien la mayoría de las infecciones son subclínicas, un alto porcentaje de los padrillos se transforman en portadores persistentemente infectados que eliminan virus en semen por periodos variables [2]. El genoma del virus de la Arteritis Equina (VAE) está formado por una molécula de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 12,7 kb que incluye 9 marcos abiertos de lectura (ORF), que codifican entre otras, 7 proteínas estructurales, denominadas E, GP2, GP3, GP4, GP5, M y N, localizadas en los ORF 2 a y 2 b, 3, 4, 5, 6, y 7 respectivamente [3]; [4]. A excepción de la proteína N, las demás están localizadas en la envoltura viral, de las cuales, las principales son: la GP5, glicoproteína mayor de la envoltura, y la proteína M. Ambas forman un heterodímero unido por puentes disulfuro resultando crítica su interacción para la infectividad y la expresión de los determinantes antigénicos de la partícula viral [5]; [6]. Aunque existe un solo serotipo de VAE, se ha informado que existe variabilidad entre aislamientos de distintas regiones geográficas mediante la comparación de las secuencias que codifican principalmente para las proteínas M, N y GP5 [7]; [8]. Esta variabilidad existente en la población viral, podría ser la responsable de las diferencias en el tropismo, antigenicidad y virulencia entre las distintas cepas aisladas. En Argentina, el primer aislamiento de VAE denominado LP01 se realizó en 2001 [9], mientras que en el 2002 se realizaron 3 nuevos aislamientos denominados LP02/R, LP02/C y LP02/P. La cepa aislada en el 2001 como las aisladas en el 2002 provenían de dos establecimientos distintos, ambos con alta prevalencia de anticuerpos pero sin signos clínicos aparentes de enfermedad [10]. La cepa LT-LP-ARG fue un nuevo aislamiento realizado en 2007 y estudios previos demuestran que podría ser la línea parental que dio origen al resto de las cepas Argentinas [11]. Las evidencias experimentales muestran que las cepas aisladas en Argentina tienen diferente patrón de neutralización ya que la cepa de referencia Americana CVDLS, utilizada en los test diagnósticos por nuestro laboratorio, es neutralizada en menor medida por antisueros heterólogos (Echeverría, comunicación personal).

Se describe en la bibliografía que el VAE es relativamente sencillo de obtener a partir de la inoculación de cultivos celulares con muestras de semen de padrillos serológicamente positivos. De no ser posible recuperar viriones de las muestras inoculadas, debido a la pérdida de infectiosidad por dificultades en la toma de la muestra, su almacenamiento y/o su transporte, se acepta la detección de ARN viral como diagnóstico positivo

de AVE [12].

Se describe al ORF 5 como uno de los más variables del genoma de VAE y es por ese motivo que es uno de los más estudiados para hallar diferencias entre las cepas [12]; [13]; [14]. Asimismo en el ORF 5 se identificaron 3 regiones variables comprendidas entre los aminoácidos 61 y 121 (V_1), entre los 141 y 178 (V_2) y entre los 202 y 222 (V_3) [7]. Los datos que se presentan en este estudio caracterizan y comparan entre sí secuencias de VAE obtenidas a partir de muestras de semen de archivo, de animales seropositivos con aislamiento viral negativos, de padrillos localizados en los dos Haras de donde fueron aisladas las primeras cepas virales en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS DE SEMEN DE ARCHIVO:

Se analizaron 8 muestras de semen pertenecientes a 8 padrillos positivos a AVE, que llegaron a nuestro laboratorio entre 2000 y 2002. En el momento de arribo, las muestras fueron procesadas para aislamiento viral, resultando negativas de acuerdo a la metodología internacional. De estas 8 muestras de semen, 4 de ellas denominadas PT, TF, LN y RO pertenecían a padrillos alojados en el Haras A, mientras que las 4 restantes pertenecían a los padrillos RZ, CD, KB y PL alojados en el Haras B. Ambos Haras están situados en la Provincia de Buenos Aires y poseen animales de salto y otros deportes. En ambos establecimientos se determinó una alta prevalencia de anticuerpos contra AVE, pero los equinos no presentaron signos clínicos detectables. Sin embargo, las cepas virales anteriormente descritas fueron aisladas de ambos establecimientos: LP01 del Haras A mientras que LP02/P, LP02/R y LP02/C del Haras B.

CEPAS VIRALES ARGENTINAS:

Las secuencias de las 5 cepas virales aisladas en Argentina utilizadas en este estudio comparativo fueron registradas en el banco de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) bajo los siguientes números de acceso: LP01 (DQ435439); LP02/R (DQ435440); LP02/C (DQ435441); LP02/P (DQ435442); LT-LP-ARG (EU622859) [10]; [11].

EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL Y RT-PCR:

Las muestras de semen se descongelaron del archivo y centrifugaron a 10.000 rpm para obtener al menos 500 μ l de plasma seminal. El ARN total fue extraído con Trizol (Invitrogen Corporation), de acuerdo a las especificaciones del fabricante, y luego fue precipitado con isopropanol y resuspendido en agua. Cinco (5) μ l de ARN fueron usados para síntesis de ADNc,

mediante el agregado de transcriptasa reversa (MMLV Moloney Murine Leukemia Virus) y hexámeros al azar (retrotranscripción). Para la amplificación por PCR a partir del ADNc, se utilizó el siguiente par de primers específico para el ORF 5: GL105F 5' GCTGACGGATCGCGGCGT-TATT 3' (posición 11250-11271), y GL673R 5' ATAGTGGGCCTACCTGGGACTAA 3' (posición 11840-11818). Se realizaron 35 ciclos de 94° C 45", 60° C 1' y 72° C, 90" [15]. Cada producto de PCR fue examinado en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y observados bajo luz ultravioleta.

SECUENCIACIÓN:

Previamente, los productos de PCR fueron purificados por precipitación con polietilenglicol (PEG 20%, NaCl 2,5 mM), y cuantificados en gel con estándar de peso molecular conocido. Se realizó secuenciación directa, utilizando el siguiente par de primers internos: CR2 5' GCCAATTTGCT-GCGATATGATGA 3' (posición 11272-11294), y EAV32 5' TGGGCCTACCTGGGACTAACAAAC 3' (posición 11836-11814) [14]. Ambas cadenas de cada amplicón fueron secuenciadas en forma automatizada por el método dye-terminator en equipo Mega BACE™ 1000 en el Servicio de Secuenciación del IGEVET (FCV-UNLP).

ANÁLISIS FILOGENÉTICO:

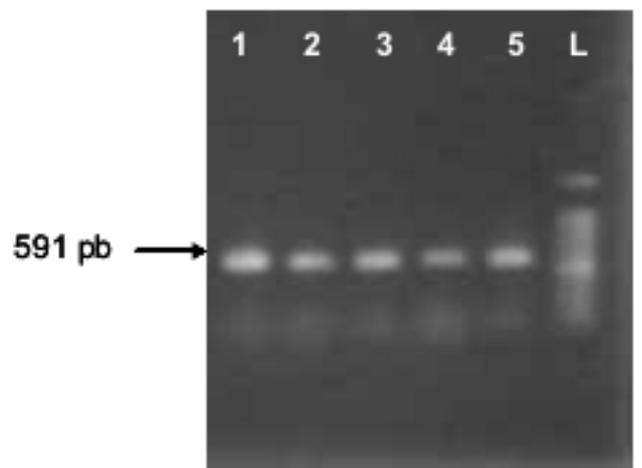
El análisis de las secuencias se realizó con programas disponibles en la web: CLUSTAL W [16] y por medio del programa MEGA versión 4 [17] y DNASTar, se construyeron los árboles filogenéticos por el método de Neighbor Joining [18] usando el test de "bootstrap" con 1000 iteraciones [19].

RESULTADOS

EXTRACCIÓN DE ARN Y RT-PCR:

Usando como molde ARN extraído de cada una de las muestras analizadas, se realizó la síntesis de ADNc, con los cuales se realizó la PCR con los primers GL105F y GL673R obteniendo un producto de 591 pares de bases, con las muestras RO, KB y RZ. La obtención del producto del tamaño esperado luego de la amplificación, permitió corroborar la presencia de ARN específico de VAE en las muestras de semen analizadas (Figura 1).

FIGURA 1: amplificación de ORF 5 parciales (591 pb) a partir de ARN de semen de padrillos RO, RZ y KB. Las cepas de VAE Argentinas LP01 y LT-LP-ARG fueron utilizadas como control.
FIGURE 1: PCR products of partial ORF 5 (591 bp) obtained from semen of stallions RO, RZ and KB. The Argentinean LP01 and LT-LP-ARG strains were used as control.



1= LP01; 2= LT-LP-ARG; 3=RO; 4=RZ; 5=KB; L marcador de 100 pb

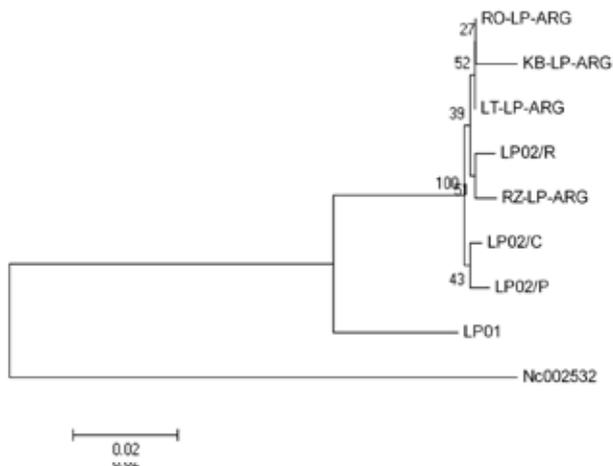
TABLA 1: Porcentajes de identidad nucleotídica (diagonal superior) y aminoácídica (diagonal inferior) sobre un total de 519 nucleótidos y 172 aminoácidos respectivamente, y entre las secuencias del ORF 5 de los aislamientos Argentinos del VAE. Los valores de identidad se calcularon mediante el programa CLUSTAL W

TABLE 1: Pairwise nucleotide identity (upper right) and amino acid (lower left) from a total of 519 and 172 respectively, of 8 Argentinean EAV based on ORF 5 sequences. The identity was obtained using CLUSTAL W

	<i>LP01</i>	<i>LP02/R</i>	<i>LP02/C</i>	<i>LP02/P</i>	<i>LT-LP-ARG</i>	<i>RO-LP-ARG</i>	<i>RZ-LP-ARG</i>	<i>KB-LP-ARG</i>
<i>LP01</i>	--	94,6	95,0	95,2	95,2	95,2	94,6	94,4
<i>LP02/R</i>	95,9	--	99,2	99,0	99,4	99,4	99,2	98,7
<i>LP02/C</i>	96,5	98,3	--	99,4	99,4	99,4	99,2	98,7
<i>LP02/P</i>	96,5	98,3	98,8	--	99,2	99,2	99,0	98,5
<i>LT-LP-ARG</i>	96,5	99,4	98,8	98,8	--	100,0	99,4	99,2
<i>RO-LP-ARG</i>	96,5	99,4	98,8	98,8	100,0	--	99,4	99,2
<i>RZ-LP-ARG</i>	96,5	98,8	98,3	98,8	99,4	99,4	--	98,7
<i>KB-LP-ARG</i>	94,8	97,7	97,1	97,1	98,3	98,3	97,7	--

FIGURA 2: Árbol filogenético que muestra las relaciones entre las secuencias argentinas del Virus de Arteritis Equina (VAE). Los números sobre las ramas indican los valores del test de Bootstrap (con 1000 iteraciones) y 2 parámetros de Kimura para ese nodo. La cepa americana NC002532 fue utilizada como grupo externo (OG)

FIGURE 2: Phylogenetic tree showing the relationships among ORF 5 Argentinean EAV nucleic acid sequences. Numbers on branches indicate Bootstrap values (1000 iterations) and Kimura-2 parameters. American NC002532 strain was used as outgroup



ANÁLISIS DE SECUENCIAS:

La secuencia completa del ORF 5 comprende 768 nucleótidos (posiciones 11146 -11913 del genoma viral). La secuenciación con los primers internos permitió obtener un fragmento de 519 nucleótidos dentro del ORF 5. En el análisis se observaron solamente sustituciones nucleotídicas, sin deleciones ni inserciones. Las secuencias de nucleótidos de los productos del ORF 5 de cada una de las muestras de semen analizadas en este estudio fueron registradas en la base de datos GenBank (www.ncbi.nih.gov/Genbank) con los siguientes números de acceso: RO-LP-ARG EU622862; RZ-LP-ARG EU622861; KB-LP-ARG EU622860. Del análisis de nucleótidos de la tabla 1 puede observarse que sólo alrededor del 6% de los sitios son variables entre secuencias (que involucran 29 cambios nucleotídicos en total). Sin embargo, las secuencias de LP02/C y LP02/R sólo difieren en 3 posiciones de nucleótidos. La identidad de más del 99% entre pares de secuencias evidencia que los aislamientos LP02/R, LP02/C, LP02/P, LT-LP-ARG, RO-LP-ARG y RZ-LP-ARG como los más similares entre sí y que las secuencias RO-LP-ARG y LT-LP-ARG tienen 100% de identidad. LP01 presenta la mayor divergencia entre todas (menos del 96%). Las mayores diferencias ocurren entre la cepa LP01 y el resto de las secuencias Argentinas (Tabla 1). La traducción a aminoácidos (172 de 255 totales) reflejó que las sustituciones nucleotídicas involucraron 9 cambios de aminoácidos dentro

de las regiones variables, (~5%) entre las cepas Argentinas y las nuevas secuencias descritas. Siete de estos cambios ocurren dentro de la región V_1 , mientras que 1 ocurre en la V_2 y el último en la V_3 .

Las diferencias y similitudes entre las secuencias analizadas se reflejan en el árbol filogenético de la Figura 2. Las secuencias LP02/R, LP02/P, LP02/C, LT-LP-ARG, RO-LP-ARG, RZ-LP-ARG y KB-LP-ARG forman un mismo cluster (Bootstrap =100%) mientras que LP01 queda separada de este grupo.

DISCUSIÓN

En este estudio comparamos el ORF 5 parcial de la glicoproteína GP5 de 3 nuevas secuencias de VAE con las 5 cepas aisladas en Argentina con anterioridad [10]. El análisis de las secuencias parciales del ORF 5 mostró que las diferencias observadas correspondieron a variaciones de nucleótidos puntuales. Los valores de identidad y las relaciones filogenéticas entre las secuencias, confirmaron que LP01 es diferente del resto de las cepas Argentinas. Este padrillo podría haberse infectado con anterioridad al arribo a nuestro país. Nuestros resultados siguen confirmando que las secuencias Argentinas pertenecen al grupo Europeo. Es importante remarcar que la secuencia RO-LP-ARG fue obtenida de un padrillo del Haras A, de donde fue aislada la primera cepa Argentina en 2001 (LP01) [9] y que las secuencias RZ-LP-ARG y KB-LP-ARG se obtuvieron de padrillos localizados en el Haras B, de donde fueron aisladas las cepas del grupo LP02 [10]. A pesar que todavía ocurren brotes de AVE en el mundo, generalmente no se evidencian signos clínicos, aún cuando se registra una alta prevalencia de anticuerpos. Como ocurre en otros lugares, en nuestro país se ve la misma situación y se postula que las cepas circulantes hoy en día son de reducida virulencia [20]; [21].

Si bien las muestras de semen fueron conservadas en forma adecuada, el aislamiento viral no fue posible en nuestras condiciones de laboratorio a pesar de haber resultado positivas por RT-PCR. Esto si bien indica la presencia ARN viral no implica que el mismo necesariamente sea infectivo [15]. La cepa LT-LP-ARG fue obtenida de un testículo de un padrillo ingresado a nuestro país con anterioridad a 1998, importado de Europa, positivo por serología a AVE del cual no se conocían más datos, ni el lugar de alojamiento, ni la realización de pruebas biológicas en otros laboratorios de referencia en Argentina [11]. Sin embargo, esta situación no parece influir, ya que el tránsito de animales de deporte entre distintos establecimientos es muy frecuente.

El valor de identidad estimado para las secuencias LT-LP-ARG y RO-LP-ARG es del 100%.

Si bien no hay datos preliminares que relacionen a los animales, sobre la base de la secuencia analizada, corresponderían al mismo equino, a pesar de provenir teóricamente de distintos animales localizados en distintos establecimientos. Cabe determinar si existen diferencias entre las secuencias LT-LP-ARG, RO-LP-ARG y LP02/R (de la cual difieren en solo tres posiciones de nucleótidos que derivan en un único cambio de aminoácido) a nivel de otra porción del ORF 5 o de otros ORFs.

La evidencia experimental muestra que las cepas aisladas en Argentina tienen diferente patrón de neutralización y que la cepa de referencia Americana CVDLS, utilizada en los test diagnósticos por nuestro laboratorio, es neutralizada en menor medida por antisueros heterólogos (Echeverría, comunicación personal).

La secuenciación de esta porción de genoma permite determinar las características moleculares de las cepas circulantes en Argentina, aunque en estudios futuros debería determinarse si las variaciones halladas son responsables de diferencias de tropismo, antigenicidad y virulencia de las cepas.

Si bien los datos aportados son relevantes en cuanto a la diferenciación de las cepas Argentinas del virus, estamos abocados a estimar las relaciones filogenéticas sobre la base de la secuencia parcial del ORF 5, estudio que permitirá establecer el probable origen de las cepas Argentinas de VAE.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subvencionado parcialmente por ANPCyT (PICT 01-13541). Nuestro mayor agradecimiento al personal técnico de la Cátedra de Virología de la FCV-UNLP, Srta. María del Carmen Mondragón, Sra. Adriana Conde y Sr. Claudio Leguizamón.

BIBLIOGRAFÍA

1. Glaser AL, Rottier PJM, Horzinek MC, Colenbrander B. Equine arteritis virus: a review of clinical features and management aspects. *Vet Q* 1996, 18: 95-99
2. Timoney PJ, McCollum WH. Equine viral arteritis. *Vet Clin N Am Equine Pract* 1993, 9: 295-309
3. Snijder E. *Fields Virology*. Edited by Knipe, DM, Howley PM. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, (USA) 2001, 1205-1220
4. Wieringa R, de Vries A, Raamsman M, Rottier P. Characterization of two new structural glycoproteins, GP(3) and GP(4), of equine arteritis virus. *J Virol* 2002, 76: 10829-10840
5. Balasuriya UB, Rossito PV, DeMaula CD, MacLachlan NJ. 29 K envelope glycoprotein of equine arteritis virus expresses neutralization determinants recognized by murine monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 1993; 74: 2525-2529

6. Snijder E, Van Tol H., Pedersen K, Raamsman M, de Vries A. Identification of a novel structural protein of arteriviruses. *J Virol* 1999, 73, 6335-6345
7. Balasuriya UBR, Hedges JF, Timoney PJ, McCollum WH, MacLachlan NJ. Genetic stability of equine arteritis virus during horizontal and vertical transmission in an outbreak of equine viral arteritis. *J Gen Virol* 1999; 80: 1949-1958
8. Chirnside ED, Wearing CM, Bims MM, Mumford JA. Comparison of M and N gene sequences distinguishes amongst equine arteritis virus isolates. *J Gen Virol* 1994; 75: 1491-1497
9. Echeverría MG, Pecoraro M, Galosi C, Etcheverrigaray M, Nosoetto E. The first isolation of equine arteritis virus in Argentina. *Rev Sci Tech* 2003, 22: 1029-1033
10. Echeverría MG, Díaz S, Metz GE, Serena MS, Panei CJ, Nosoetto EO. Genetic typing of Equine Arteritis Virus isolates from Argentina. *Virus Genes* 2007, 35: 313-320
11. Metz GE, Serena MS, Martin Ocampos GP, Panei CJ, Fernandez VL, Echeverría MG. Equine Arteritis Virus: a new isolation from the presumable first carrier stallion in Argentina and its genetic relationships among the unique four reported Argentinean strains. *Arch Virol On line* 2008 DOI: 10-1007/s00705-008-0224-5
12. Hornyak A, Bakonyi T, Tekes G, Szeredi L, Rusvai M. A novel subgroup among genotypes of Equine Arteritis virus: genetic comparison of 40 strains. *J Vet Med Sci B* 2005, 52: 1-7
13. Balasuriya UBR, Hedges JF, Smalley VL, Navarrette A, McCollum WH, Timoney PJ, Snijder EJ, MacLachlan NJ. Genetic characterization of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J Gen Virol* 2004, 85: 379-390.
14. Stadejek T, Bjorklund H, Ros Bascunana C, Ciabatti IM, Scicluna MT, Amaddeo D, McCollum WH, Autorino GL, Timoney PJ, Paton DJ, Klingeborn B, Belak S. Genetic diversity of equine arteritis virus. *J Gen Virol* 1999, 80: 691-699
15. Mittelholzer C, Johansson I, Olsson A, Roneus M, Klingeborn B, Belak S. Recovery of Swedish Equine arteritis viruses from semen by cell culture isolation and RNA transfection. *J Virol Meth* 2006, 133: 48-52
16. Thompson J, Higgins D, Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994, 22: 4673-4680
17. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007, 24:1596-1599
18. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987, 4: 406-425
19. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985, 39: 783-791
20. Larsen LE, Storgaard T, Holm E. Phylogenetic char-

G. Metz y col.

acterization of the GL sequences of Equine Arteritis Virus isolated from semen of asymptomatic stallions and fatal cases of Equine Viral Arteritis in Denmark. *Vet Microbiol* 2001, 80: 339-346

21.Szeredi L, Hornyak A, Denes B, Rusvai M. Equine viral arteritis in a newborn foal: parallel detection of the virus by immunohistochemistry, polymerase chain reaction and virus isolation. *J Vet Med B* 2003, 50: 270-274

BIOTIPOS Y SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE PASTEURELLA MULTOCIDA SUBESPECIE MULTOCIDA AISLADAS DE PULMONES DE CERDOS DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

MOREDO F^{1*}, VIGO G¹, LEOTTA G²

1 Cátedra de Microbiología, 2 Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas
Facultad de Ciencias Veterinarias

RESUMEN: Se estudiaron 37 aislamientos de *Pasteurella multocida* subespecie *multocida* obtenidas entre los años 2004 – 2007, a partir de pulmones de cerdos de la provincia de Buenos Aires, con diagnóstico de neumonía, con el objeto de determinar sus biotipos y la sensibilidad antimicrobiana frente a ampicilina, florfenicol, estreptomycin, enrofloxacin, tetraciclina y fosfomicina, utilizándose el método de difusión en agar. Los biotipos se determinaron en función a la fermentación de arabinosa, dulcitol, sorbitol, trehalosa, xilosa y lactosa y a la producción de indol. El 83,8 % de los aislamientos fueron biotipo 3 mientras que el 16,2 % biotipo 2. Todos los aislamientos fueron sensibles a ampicilina y florfenicol, el 94,6 % a enrofloxacin y fosfomicina, el 83,8 % a tetraciclina y el 48,6 % a estreptomycin. Se demostró que en pulmones de cerdos con neumonía predomina el biotipo 3 de *Pasteurella multocida*. Además, se detectaron aislamientos resistentes a tetraciclina, enrofloxacin y estreptomycin. En los establecimientos de producción porcina, debería reconsiderarse la utilización de los antimicrobianos en forma preventiva, para evitar la diseminación de la resistencia presente e inclusive la aparición de nuevos fenotipos resistentes de *Pasteurella multocida*.

Palabras claves: *Pasteurella multocida*, biotipos, sensibilidad antimicrobiana, cerdos.

BIOTYPES AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF PASTEURELLA MULTOCIDA SUBSPECIES MULTOCIDA ISOLATED FROM PNEUMONIC LUNGS FROM PIGS OF BUENOS AIRES PROVINCE

ABSTRACT: Thirty-seven *Pasteurella multocida* subspecies *multocida* isolates, obtained between 2004– 2007 were studied, from lungs of pigs with pneumonia lesions, with the purpose to determine biotypes and antimicrobial susceptibility against ampicillin, florphenicol, streptomycin, enrofloxacin, tetracycline and phosphomycin using the agar diffusion method. The biotypes were determined according to the fermentation of arabinose, dulcitol, xilose and lactose and indol production. 83.8 % of isolates were biotype 3 while 16.2 % biotype 2. All isolates were sensible to ampicillin and florphenicol, 94.6 % to enrofloxacin and phosphomycin, 83.8 % to tetracycline and 48.6 % to streptomycin. Although, for epidemiological studies we must have most strains, the information obtained until now indicates the predominance of *Pasteurella multocida* biotype 3 in pigs with lung lesions of pneumonia, the appearance of resistance against tetracycline and enrofloxacin and the increase against streptomycin. In pig farms, it must reconsider the utilization of preventive antimicrobial to avoid the dissemination of resistance and inclusive the appearance of new *Pasteurella multocida* resistant phenotype.

Key words: *Pasteurella multocida*, biotypes, antimicrobial susceptibility, pigs.

Fecha de recepción: 12/11/07

Fecha de aprobación: 22/04/08

Dirección para correspondencia: Fabiana Moredo, Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: fmoredofcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Pasteurella multocida es un miembro de la familia *Pasteurellaceae*, cocobacilo gram negativo, habitualmente se tiñe de manera bipolar con la coloración de Gram. La mayoría de las cepas forman cápsula. Es anaerobio facultativo y desarrolla en medios de cultivo enriquecidos; no lo hace en agar Mac Conkey, no produce hemólisis ni requiere la presencia de los factores de crecimiento V y X. Es oxidasa positivo, inmóvil, indol positivo y ureasa negativo (6). *P. multocida* presenta tres subespecies según su capacidad de utilizar trehalosa, dulcitol y sorbitol: *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *septica* y *P. multocida* subsp. *gallicida* (3). La pasteurelosis es considerada una enfermedad zoonótica, cuyo reservorio principal son los animales domésticos y silvestres. En cerdos, se asocia a diversos procesos infecciosos como rinitis atrófica, neumonía enzoótica y complejo respiratorio porcino. Estas enfermedades tienen un alto impacto económico ya que el sistema de cría de los cerdos es intensivo (7). El principal método para el control de estas enfermedades es el manejo sanitario; sin embargo, en los criaderos de cerdos se utilizan antimicrobianos de manera preventiva. Hasta el presente, en Argentina sólo se realizó un trabajo que informa acerca de los biotipos y la sensibilidad antimicrobiana que presenta *P. multocida* frente a los antimicrobianos de uso masivo en granjas productoras de cerdos (4). El objetivo del presente trabajo fue determinar los biotipos y los patrones de sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *P. multocida* subsp. *multocida*, obtenidas a partir de pulmones de cerdos con lesiones de neumonía.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 37 aislamientos de *P. multocida* subsp. *multocida*, obtenidos entre los años 2004 y 2007, provenientes de pulmones de cerdos con lesiones neumónicas. Los animales pertenecían a granjas de cría intensiva de la provincia de Buenos Aires. Las lesiones se observaron como hallazgos de frigorífico. Las muestras de pulmones se sembraron en agar sangre base (DIFCO) adicionado con 5 % de sangre desfibrinada de carnero; se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Los aislamientos se identificaron por sus características tintoriales, morfológicas y bioquímicas (2, 3, 4). La identificación de subespecie se realizó en función a la capacidad de utilizar trehalosa, dulcitol y sorbitol (3, 6). Para determinar los biotipos se estudió la producción de indol y la fermentación de arabinosa, dulcitol, sorbitol, trehalosa, xilosa y lactosa (4).

La determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se realizó según las recomendaciones del NCCLS (actualmente CLSI) (1,5), por el método de difusión en agar. Se probaron los

siguientes antimicrobianos de uso habitual en granjas de producción porcina: ampicilina 10 µg (AMP) (Britania), estreptomycin 10 µg (S) (Oxoid), tetraciclina 30 µg (TET) (Britania), enrofloxacin 5 µg (ENR) (Oxoid), fosfomicina 50 µg (FOS) (Bedson) y florfenicol 30 µg (FFC) (Vetanco). La interpretación de los resultados se realizó en base a los documentos M31-A2 (5) teniendo en cuenta los valores definidos para *P. multocida* y M100-S15 (1) teniendo en cuenta los valores definidos para *Enterobacteriaceae*. Como cepa control se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922.

RESULTADOS

De los 37 aislamientos de *P. multocida multocida*, 31 (83,8 %) pertenecieron al biotipo 3 y seis aislamientos (16,2 %) al biotipo 2 (Tabla 1).

Todos los aislamientos fueron sensibles a florfenicol y ampicilina; uno presentó resistencia a fosfomicina, dos a enrofloxacin, cinco a tetraciclina y nueve a estreptomycin (Tabla 2). Nueve aislamientos presentaron resistencia a un antimicrobiano, uno frente a dos y dos frente a tres antimicrobianos; estos últimos fueron obtenidos a partir de pulmones provenientes de una misma granja y en un mismo momento. Los aislamientos resistentes a enrofloxacin y tetraciclina se aislaron en 2007. El patrón de resistencia a estreptomycin se diferenció según el año de aislamiento. En 2004, no se observaron aislamientos resistentes. En 2005 y 2006 la resistencia a estreptomycin fue de 18,2 y 14,3 respectivamente. Durante el año 2007, la resistencia a este antimicrobiano fue de 46,1 %.

DISCUSION

Los aislamientos de *P. multocida* biotipo 3 (83,8 %) encontradas, coinciden con trabajos previos en los cuales se estudiaron cepas aisladas durante los años 2000 y 2002 (4). Por lo cual concluimos, que el biotipo 3 de *P. multocida* es el más frecuentemente encontrado a partir de pulmones de cerdos con lesiones de neumonía enzoótica. En segundo lugar se encontraría el biotipo 2.

Los resultados obtenidos mediante la utilización de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, coinciden en parte con los hallados por Leotta y col (4). En ambos trabajos no se observó resistencia a ampicilina y florfenicol. En el caso de los aislamientos resistentes a enrofloxacin y tetraciclina, fueron aislados durante el año 2007.

Analizando los resultados obtenidos en este trabajo, observamos que en 2004 no se observaron aislamientos resistentes a estreptomycin, en 2005 y 2006 se aisló un promedio de 16 % y en 2007 el 46 % la presentaron. Estos movimientos de la resistencia podrían estar di-

Tabla 1. Biotipos de 37 aislamientos de *Pasteurella multocida multocida* obtenidas de pulmones de cerdos con lesiones de neumonía.

Table 1. Biotypes of 37 *Pasteurella multocida* isolates obtain from pigs lungs with pneumonia lesions.

Características bioquímicas	Biotipo	
	2	3
Producción de indol	+	+
Fermentación de:		
Arabinosa	-	-
Dulcitol	-	-
Sorbitol	+	+
Trehalosa	+	-
Xilosa	+	+
Lactosa	-	-
N= 37	6 (16,2 %)	31 (83,8 %)

Tabla 2. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Pasteurella multocida multocida* obtenidas de pulmones de cerdos con lesiones de neumonía (1).

Table 2. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolates obtain from pig lungs with pneumonia lesions.

Antimicrobiano	Sensible	S. intermedia	Resistente
Ampicilina	37 (100)	0	0
Estreptomicina	18 (48,6)	10 (27)	9 (24,3)
Tetraciclina	31 (83,8)	1 (2,7)	5 (13,5)
Enrofloxacina	35 (94,6)	0	2 (5,4)
Fosfomicina	35 (94,6)	1 (2,7)	1 (2,7)
Florfenicol	37 (100)	0	0

1: los valores expresados corresponden a la cantidad de aislamientos; entre paréntesis se expresa en porcentaje.

rectamente relacionados con la utilización del antimicrobiano en las granjas de producción porcina. Es interesante mencionar que es uno de los antimicrobianos utilizados con mayor asiduidad en los granjas productoras de cerdos de la República Argentina.

Si bien, para estudios epidemiológicos se debería contar con un mayor número de cepas, la información obtenida hasta aquí indica el predominio del *P. multocida* biotipo 3 en casos de cerdos con lesiones pulmonares de neumonía enzoótica, la aparición de resistencia frente a

tetraciclina y enrofloxacina y el incremento frente a estreptomicina. En los establecimientos de producción porcina, debería reconsiderarse la utilización de antimicrobianos en forma preventiva, para evitar la diseminación de la resistencia presente e inclusive la aparición de nuevos fenotipos resistentes de *P. multocida*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por un subsidio automático otorgado por el Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología de la

Nación, en el marco del Programa de Incentivo a Docentes-Investigadores (V/151).

BIBLIOGRAFÍA

1. Clinical and Laboratory Standard Institute. Disk diffusion. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement, 2005; M100-S15. Wayne, Pa (USA)

2. Fegan N, Blackall PJ, Pahoff JL. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Vet Microbiol* 1995; 47:281-6

3. Koneman EW, Stephen DA, Williams MJ, Schrenberger PC, Washington CW. Diagnóstico microbiológico. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, (Argentina), 1999; p.388-461

4. Leotta GA, Vigo GB, Chinen I, Prieto M, Callejo R, Rivas M. Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Argentina. *Rev Arg Microbiol* 2006; 38:125-129

5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. 2nd edition, 2002; M31-A2. Wayne, Pa, (USA)

6. Olsen I, Dewhirst FE, Paster B, Busse HJ. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. Springer Science, New York (USA), 2005; p.851-866

7. Pijoan C. Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames (USA), 1999; p.511-520

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA LÍNEA TUMORAL HUMANA A549 EN LAS CEPAS DE RATONES INMUNODEFICIENTES BALB/cAn-nu Y C57BL/6 nu

Cagliada P, Milocco S, Carriquiriborde M, Maschi F, Ayala M, Carbone C

Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio.
Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

Resumen. El desarrollo de modelos animales capaces de reproducir enfermedades humanas permite realizar estudios sobre las características, la prevención y el tratamiento de las mismas. Desde 1962, se utiliza el stock de ratones inmunodeficientes N:NHI(S)-nu (nude) para transplantes de tumores de otras especies, inclusive de origen humano. En el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) se producen estos ratones inmunodeficientes desde 1995. Para evitar la alta variabilidad genética que presentan los stocks y lograr resultados más uniformes y reproducibles, en el año 2003 se incorporó el gen nu para obtener las cepas BALB/cAn-nu y C57BL/6-nu, mediante la incorporación del gen nude. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de la línea tumoral A549 de adenocarcinoma de pulmón humano en estos ratones endocriados. Se utilizaron 60 ratones divididos en 3 grupos de 20 animales y se inocularon con una suspensión de células de la línea A549. Las mediciones para la evaluación del crecimiento tumoral realizadas diariamente durante 15 días arrojaron los siguientes resultados: en el grupo control N:NIH(S)-nu, y en las cepas C57BL/6-nu y BALB/cAn-nu hubo crecimiento tumoral, siendo más rápido en esta última. Al realizar la necropsia no se encontraron metástasis en ningún animal. Se concluyó que las cepas C57BL/6-nu y BALB/cAn-nu son adecuadas para mantener la línea tumoral A549 de adenocarcinoma de pulmón humano, reuniendo las ventajas de los animales endocriados.

Palabras claves: ratones inmunodeficientes, crecimiento tumoral, línea A549

ASSESSMENT OF THE HUMAN TUMOR LINE A549 GROWTH IN IMMUNODEFICIENT MICE STRAINS BALB7 cAn-nu AND C57BL/6-nu

Abstract. The development of animal models which reproduce human diseases allows to study their characteristics, prevention, and treatment. Since 1962, N:NHI(S)-nu stock (nude) is used as an animal model for other species or even human tumor transplantation. In the Laboratory Animal Facility at the National University of La Plata, nude mice are reared since 1995. In order to avoid the high genetic variability of the stocks, and to achieve reliable and reproducible results, in y 2003 BALB/cAn-nu and C57BL/6-nu strains were obtained by introducing the nude gen into BALB/c and C57BL/6 strains. The objective of this study was to evaluate the human lung adenocarcinoma tumor line A549 growth in the above mentioned mice strains. Sixty mice divided into 3 groups of 20 animals each were inoculated with a suspension of A549 cells. The tumor growth was daily evaluated for 15 days. Tumors grew in N:NIH(S)-nu (control), C57BL/6-nu and BALB/cAn-nu mice strains. In the BALB/cAn-nu mice tumors grew faster. The gross anatomy did not show metastasis in any cases. It was concluded that BALB/cAn-nu and C57BL/6-nu mice are suitable for the maintenance of the tumor line A549, counting with the advantages of inbred animals.

Key words: immunodeficient mice, tumor growth, A549 cell line

Fecha de recepción: 25/06/08

Fecha de aprobación: 10/09/08

Dirección para correspondencia: Pilar Cagliada. Calle 60 y 118 s/n (1900) La Plata, Facultad de Veterinaria. Universidad Nacional de La Plata. Telefax: (0221) 421-1276.

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

INTRODUCCIÓN

Uno de los temas de mayor importancia dentro de la ciencia de los animales de laboratorio es el desarrollo de modelos animales capaces de reproducir enfermedades humanas que sirvan para realizar los estudios e investigaciones correspondientes a la enfermedad, sus características, prevención y tratamiento.

Desde 1894, se utilizan ratones para la investigación sobre el cáncer, especialmente para estudiar los procesos de crecimiento tumoral, metástasis y nuevas terapias. A partir de 1921, se comenzaron a utilizar cepas endocriadas que tenían predisposición para el crecimiento de tumores transplantados de la misma especie. En 1962, y como consecuencia de una mutación espontánea, se obtuvo un stock de ratones inmunodeficientes N:NIH(S)-*nu* (*nude*) que se transformó en una importante herramienta para los estudios oncológicos, ya que se pudieron inocular con tumores procedentes de otras especies, inclusive de origen humano, lo que permitió el estudio *in vivo* de los mismos (1, 2).

Estos animales surgen por una mutación espontánea y recesiva asociada a la ausencia de pelo, disgenesia gonadal y aplasia del timo, característica que produce numerosos defectos del sistema inmunológico debido a deficiencias cuantitativas y funcionales de los linfocitos T. La falla en el desarrollo del timo produce un número reducido de células T maduras por lo que los individuos homocigotas recesivos no rechazan tejidos alogénicos ni xenogénicos (2, 3).

El descubrimiento de que los tumores humanos podían crecer en ratones *nude* produjo una gran revolución en el campo de la ciencia. Esta mutación espontánea condujo a designar al ratón *nude* como el primer modelo animal de inmunodeficiencia. Desde entonces, ha sido ampliamente utilizado en la investigación de los factores reguladores del crecimiento de los tumores transplantados y de las metástasis.

Desde 1995, en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata se producen bajo estrictas barreras sanitarias ratones inmunodeficientes del stock *nude* (2, 4, 5). Debido a su condición de exocriados, estos ratones presentan grandes ventajas con respecto a la resistencia los factores ambientales y microbiológicos, además de su alta performance reproductiva. Sin embargo, cuando se utilizan en las investigaciones, su alta variabilidad genética hace que se deban considerar en la experiencia mayores variables inherentes a los individuos. Por esta razón en el año 2003 se comenzaron a producir bajo las mismas condiciones macro y microambientales dos nuevas cepas de ratones inmunodeficientes mediante la incorporación de genes *nude* a las cepas BALB/c y C57BL/6; estas son: BALB/cAn-*nu* y C57BL/6-*nu* (6, 7).

La línea celular A549 fue iniciada en 1972 por Giard a partir de un explanto de adenocarcinoma de pulmón humano. En los últimos años, esta línea celular se ha estudiado intensamente y se conoce que expresa genes para mucinas respiratorias humanas, P53, citoqueratinas, sitios de unión para estrógenos tipo I y II y otros antígenos. Por lo tanto, resulta de fundamental importancia contar con un modelo animal para estudiar la expresión antigénica del tumor en distintos órganos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón humano en ratones de las cepas: BALB/cAn-*nu* y C57BL/6-*nu*.

MATERIALES Y MÉTODOS ANIMALES

Se utilizaron 60 ratones machos de 6 a 8 semanas de edad libres de patógenos específicos (SPF): 20 ratones de la cepa N:NHI(S)-*nu* (grupo A control), 20 de la cepa BALB/cAn-*nu* (grupo B) y 20 de la cepa C57BL/6-*nu* (grupo C) todos provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Los animales se mantuvieron en una cabina aisladora con macro y microambiente controlados: temperatura media 24 °C, humedad relativa 55%, 15 a 20 recambios de aire totales por hora y un fotoperíodo de 12 horas luz/oscuridad. Todos los animales se alojaron en cajas de 30 x 20 x 14 cm de policarbonato autoclavables, con reja superior de acero inoxidable y tolva para colocar el alimento, lecho de viruta de madera estéril, alimento comercial (Cooperación®) y agua de bebida en bebederos individuales autoclavados *ad libitum*; en número de 4 animales por caja (8, 9).

LÍNEA TUMORAL

La línea celular A549 se cultivó en monocapas en frascos plásticos con medio de cultivo Ham F12 (Gibco BRL®, USA) suplementado con suero fetal bovino al 10% (GEN Argentina®), glutamina 2 mM (Merck®), aminoácidos no esenciales (Non essential aminoacids solution N°M7145 Sigma®), vitaminas (Mem vitamins solution N°M6895 Sigma®), gentamicina 50 µg/mL y anfotericina B 1,5 µl/mL (antibiotic/antimycotic solution N°A9909 Sigma®) en estufa a 37 °C con 5% de CO₂.

ESTUDIOS DE TUMORIGENICIDAD

Los 3 grupos de ratones (A, B y C) se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilacina (80-100 mg/kg + 10 mg/kg) intraperitoneal, luego se inocularon por vía subcutánea en la piel laxa del dorso con una suspensión de células viables de la línea tumoral A549, en una concentración de 25 x 10⁴ en 200 µl de solución salina de Hank's. Se realizaron mediciones diarias con un calibre

para verificar el crecimiento tumoral, controlando forma y tamaño.

A los 15 días post inoculación, todos los ratones se sacrificaron con anestesia inhalatoria (CO₂/O₂: 80/20 %) (10). Se realizó la necropsia examinando macroscópicamente los órganos, para detectar la aparición de metástasis. En los animales que presentaron crecimiento tumoral se procedió a la extracción de los tumores. Una fracción de los mismos se colocó en una solución de formol al 10% y otra se almacenó a -70 °C para realizar estudios posteriores. Todos estos procedimientos fueron realizados siguiendo las recomendaciones internacionales del Concejo Canadiense (CCAC) para el Cuidado y Uso de ratones en investigaciones científicas sobre el cáncer (9, 11).

RESULTADOS

A la necropsia no se encontraron metástasis en ningún animal. Hubo crecimiento tumoral en el grupo control N:NIH(S)-*nu*, y en las cepas en estudio C57BL/6-*nu* y BALB/cAn-*nu*. Observándose en esta última un desarrollo más rápido del tumor.

DISCUSIÓN

Las cepas C57BL/6-*nu* y BALB/cAn-*nu* producidas y mantenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNLP son adecuadas para mantener la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón humano. Estos animales por su condición de endocriados presentan la ventaja de tener menos variables individuales, por lo que los resultados que se obtengan a partir de experiencias realizadas en ellos serán más uniformes y comparables, además de contribuir con el principio de reducción del número de animales establecido por Russel y Burch¹². Asimismo, debido a que la velocidad de crecimiento tumoral fue mayor en la cepa BALB/cAn-*nu* que en la C57BL/6-*nu*, estos modelos animales se podrán adecuar a las necesidades de los protocolos experimentales en cuanto al tiempo de desarrollo tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dooley TP, Stamp-Cole M and Ouding R. Evaluation of a *Nude* Mouse Tumor Model Using β -Galactosidase-expressing Melanoma Cells. *Lab Anim Sci* 1993; 43 (1): 48-57.
2. Carbone C, Maschi F. El ratón *nude* (*nu/nu*) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Revista QuímicaViva* 2006; Número 1, Año 5.
3. MacDonald HR, Blanc C, Lees RK and Sordat B. Abnormal distribution of T-cell subsets in athymic mice. *J. Immunol* 1986; 136: 4337-4339.
4. Ayala M et al. Estudio de la interferencia producida por *Clostridium piliforme* en ratones N:NHI(S)-*nu* transplantados con la línea tumoral A 549. *Analecta*

Vet 2006; 26 (1): 16-18.

5. Carriquiriborde M, Milocco SM, Principi G, Cagliada P, Carbone C. *Pasteurella pneumotropica* causa la regresión de tumores humanos trasplantados en ratones inmunodeficientes. *Revista Medicina* (Buenos Aires) 2006; 66: 242-244.

6. Hansen CT. The nude gene and its effects. *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research*, J. Ed. Fogh and B. Giovanella (New York) Academic Press 1978; p. 1-35.

7. Benavides FJ, Guénet JL. *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio, principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá. SECAL. Laboratory Animals Ltd 2003.

8. Hume CW. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. UFAW. 5^{ta} Edición. UFAW. Great Britain by T. & A. Constable Ltd., Edinburgh 1976; 16: 172-192.

9. Canadian Council on Animal Care "Guide to the care and use of experimental animals". CCPA, Manual Vol. 1. (2da. Edición) 1998.

10. American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*, Columbia Inn, Columbia, MD, 1990.

11. *Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 1996.

12. Russell WMS and Burch RL, *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London, 1959. Reprinted by UFAW, 1992: Hamilton Close, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QD England. ISBN 0 900767 78 2.

METABOLISMO Y DEFICIENCIA DE ZINC EN BOVINOS

Rosa DE¹, Fazio LE¹, Picco SJ^{1,2,3}, Furnus CC^{1,2,3}, Mattioli GA¹

¹ Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva

² Conicet, Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

³ IGEVET, Instituto de Investigaciones en Genética Veterinaria,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: El Zn resulta esencial como mineral traza por su rol estructural, catalítico y regulador de la actividad celular. Las funciones más comprometidas durante su carencia serían la expresión génica, la defensa antioxidante del organismo y el consumo de alimento. Los forrajes y granos pueden no cubrir los requerimientos del animal cuando crecen en suelos carentes o se destinan a categorías de altos requerimientos. Su absorción es intestinal y ajustada a las necesidades del animal, no posee depósito orgánico específico y se elimina especialmente por materia fecal. Sus requerimientos son discutibles y variables, aumentando en lactancias intensas o ante situaciones de estrés. Las pérdidas productivas por esta carencia se deberían a fallas inmunológicas, menores ganancias de peso, fallas reproductivas y mayor incidencia de lesiones podales, probablemente en este orden. En Argentina existen varios antecedentes de su diagnóstico y de respuestas positivas a su suplementación, pero lamentablemente ni las zonas de carencia ni sus consecuencias han sido claramente caracterizadas, lo cual permitiría mejorar los planes sanitarios en esas regiones. Momentáneamente resultaría adecuado intensificar su diagnóstico y contemplar suplementaciones que aseguren 30 ppm de Zn para animales en crecimiento, con aumentos estratégicos de su aporte en situaciones de estrés, como partos, destetes, ingresos a feedlot o lactancia exigentes.

Palabras Clave: Zinc, bovinos, minerales.

METABOLISM AND ZINC DEFICIENCY IN CATTLE

Abstract: Zinc is an essential trace mineral due to its structural, catalytic and regulatory roles. Gene expression, antioxidant defenses and food intake are the most affected functions during Zn deficiency. Forage and grains produced on deficient soils may not reach the animals' requirements, especially in categories with high needs. Intestinal Zn absorption is regulated by the animals needs, there is no organic storage of Zn and its elimination occurs through feces. Zn requirements are controversial and variable, they increase during peak lactation and stress. Productive losses due to Zn deficiency include, in a decreasing order, immunological failure, low growth rates, reproductive failure and high incidence of foot diseases. In Argentina, there are reports of diagnosis and treatment-related response, although neither the deficiency areas nor their consequences have been characterized, which would improve sanitary control. In the present situation, it would be useful to improve diagnosis along with a supplementation program of 30 ppm in growing animals, with an strategic increases during stress situations such as calving, weaning, feedlots income and demanding lactations.

Key words: zinc, cattle, minerals.

Fecha de recepción: 06/10/08

Fecha de aprobación: 30/11/08

Dirección para correspondencia: G. Mattioli, Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.
E-mail: mattioli@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El Zn es un microelemento esencial para la salud del bovino. Su carencia genera problemas sanitarios asociados a fallas inmunitarias, reproductivas, de crecimiento y de integridad de la piel y pezuñas. Lamentablemente la deficiencia de Zn no ha sido claramente caracterizada ni en Argentina ni en el resto del mundo. Esto imposibilita hacer un diagnóstico certero de la carencia, establecer fehacientemente los requerimientos por categoría para prevenirla y fundamentalmente reconocer su incidencia subclínica, la cual seguramente genera pérdidas muy superiores a las causadas por la presentación clínica de la carencia.

La propuesta de este trabajo es llegar a comprender los riesgos productivos de la deficiencia de Zn, analizando su metabolismo, los requerimientos establecidos para las diferentes categorías, las posibilidades de diagnóstico, las consecuencias de su carencia y los antecedentes en Argentina (1, 4).

METABOLISMO DEL ZN EN LOS BOVINOS

FUNCIONES DEL ZN EN EL ORGANISMO

El Zn resulta esencial como mineral traza por su rol estructural, catalítico y regulatorio de la actividad celular. Por un lado el Zn actúa estabilizando proteínas, de modo de mantener su conformación espacial y actividad normal. En este sentido entre el 3 y el 10 % de las proteínas asociadas al genoma y más de 300 enzimas son metaloproteínas dependientes de Zn (5). Asumiendo que estas funciones enzimáticas y la expresión génica pueden alterarse ante la carencia, resulta entendible la posible variedad de consecuencias en la salud animal (6).

Las enzimas dependientes de Zn cumplen múltiples funciones y están actuando en vías metabólicas vitales. En este sentido la Cobre-Zinc superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD) es una de las principales enzimas del sistema antioxidante del organismo (7). La fosfatasa alcalina se encarga de liberar grupos fosfatos de moléculas más complejas (8). La anhidrasa carbónica se encarga de interconvertir ácido carbónico en dióxido de carbono, manteniendo la respiración celular y el equilibrio ácido-base del organismo (9). Enzimas presentes en la secreción pancreática, como las carboxipeptidasas A y B son dependientes de Zn en su funcionamiento, y están encargadas de degradar las proteínas del alimento desde su extremo carboxilo terminal (10). Las colagenasas son metaloproteinasas asociadas con la remodelación tisular (11). La piruvatocinasa es una enzima Zn dependiente que participa en la glucólisis y su actividad es un paso limitante

modulado por la insulina. Si bien no existen resultados en bovinos, su actividad se ve afectada durante la carencia de Zn en ratas (12). Cabe agregar aquí que la propia secreción de insulina desde las células β del páncreas es dependiente de Zn, por lo cual se asume que existe un compromiso del metabolismo energético del animal durante la deficiencia (13). Otras hormonas de gran importancia en la regulación metabólica también se ven afectadas durante la carencia de zinc, como las hormonas tiroideas que ajustan el metabolismo basal (14), el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1) que media la actividad de la hormona del crecimiento (15), y el neuropéptido Y que liberado desde el hipotálamo modula el apetito del animal (16).

El Zn es requerido para la división y la diferenciación celular, siendo determinante para la síntesis de ADN (15) y para la inducción de ciclinas de ARNm en las fases G1, S y G2 del ciclo celular (18).

Se le adjudica al Zn la capacidad de aumentar la resistencia del organismo a intoxicaciones por metales tóxicos como mercurio (Hg), cadmio (Cd), cobalto (Co) y Cu. Esto se debe a que el Zn es un potente inductor de la síntesis de metalotioneína (MT), una proteína aniónica con alta capacidad quelante de los citados metales (5). La MT es un péptido de 69 aminoácidos de los cuales 20 son cisteínas, las cuales le aportan su capacidad quelante. Posee dos subunidades, una subunidad alfa responsable del efecto de retención y detoxificación de metales, y una subunidad beta con capacidad de intercambio de metales (18). La MT ha sido objeto de múltiples estudios y actualmente se sabe que cumple otras funciones, como antioxidante, mediadora en procesos inflamatorios y de regeneración celular (19, 20).

Los niveles de zincemia se asocian en forma directa a aumentos o disminuciones en la coagulabilidad sanguínea (21).

FUENTES DE ZN

Los forrajes poseen generalmente entre 25 y 50 ppm (MS) de Zn, con valores promedio de 34 ppm (MS). Los granos poseen valores semejantes, pero con altas concentraciones en las capas externas, lo cual aumenta su aporte en subproductos ricos en ellas. Tanto los forrajes como los granos poseen como principal condicionante de su concentración de Zn el aporte del suelo, por lo cual suelos carentes establecerán zonas de carencia. La leche aporta una concentración equivalente a la del alimento (30 a 40 ppm), siendo cuatro veces superior en el calostro (22).

ABSORCIÓN

El Zn es absorbido principalmente en el intestino delgado (23). Se considera que la efica-

cia de absorción está ajustada a las necesidades del organismo (24, 25, 26, 27). Debido a que el principal factor de interferencia en la absorción del Zn dietario en todas las especies es el ácido fítico, y este es inactivado por la flora ruminal, el coeficiente de absorción del Zn en rumiantes es alto, con informes del 30 al 45 % en dietas con 40 y 17 ppm (MS) respectivamente (24), de alrededor del 50 % en terneros y vacas con dietas deficientes (17 ppm - MS) (21), y del 60 al 70 % tanto desde forrajes como de granos (22). Cuando el ternero es lactante y no posee un rumen funcional sufre las interferencias propias de los monogástricos, como ocurre con el uso de proteínas de soja en los sustitutos lácteos, los cuales aportan fitatos que reducen la absorción del Zn (28).

Las Fuentes de Zn podrían condicionar su absorción. Kincaid y col (29) compararon Zn-lisina y Zn-metionina con óxido de Zn, y evaluando las variaciones de zincemia y reserva hepática encontraron mayor disponibilidad con las fuentes orgánicas que con el óxido, pero emplearon 300 ppm (MS) de cada fuente, valor muy superior al sugerido para la categoría de terneros Holstein de 6 semanas. Cuando se suplementó una dieta base que poseía 28 ppm de Zn con 20 ppm adicionales, ya sea como sulfato o como proteínato, las fuentes no diferenciaron las zincemias pero los sulfatos generaron una mayor concentración hepática de Zn (30). Esto coincide con Cao y col (31) que no encuentran diferencias entre el sulfato de Zn y diferentes fuentes orgánicas en corderos. A pesar de lo expuesto existen informes a favor del empleo de fuentes orgánicas. Spears y Kegley (32) lograron mayores ganancias de peso adicionando con 25 ppm dietas de novillos en terminación, pero a su vez el aumento tendió a ser mayor ($p: 0,10$) para el proteínato que para el óxido. Existen numerosos informes de mejores resultados cuando la suplementación se hace con fuentes orgánicas de zinc, disminuyendo la incidencia de mastitis y laminitis, (33), mejorando la resistencia de la pezuña (34), mejorando la producción lechera (35) y elevando el índice de preñez (36). Resulta también cierto que varios autores no encontraron ventajas en el empleo de fuentes orgánicas sobre las inorgánicas, ya sea evaluando ganancias de peso, conversión alimenticia y consumo voluntario en novillos en terminación (37); como tampoco cuando se evaluaron estos parámetros y la respuesta inmune en vaquillonas en feedlot (38). Estas diferencias entre autores y las razones por las cuales suelen hallarse ventajas en el uso de fuentes orgánicas no está aclarado, pero podría tratarse de diferencias en el metabolismo ruminal y tisular de estas fuentes más que en variaciones de su coeficiente de absorción (39, 40, 41).

Una vez captado el Zn por la superficie apical del enterocito es transferido a la sangre por la membra-

na basolateral por un transportador específico (ZnT1), cuya expresión aumenta ante estados de carencia de Zn (18). En sangre viaja principalmente unido a albúmina (85%) y el resto unido una α 2-macroglobulina (14 %) y a aminoácidos (1 %) (42). Su captación por los tejidos ocurriría por distintos transportadores cuya expresión sería también regulada por el balance celular de Zn (18). Llama la atención que el mecanismo de incorporación a los tejidos involucre una numerosa y compleja variedad de sistemas, que van desde cotransportes con proteínas y aminoácidos como cisteína e histidina, transportadores asociados a la transferencia de hierro y una amplia variedad transportadores específicos (5).

DEPÓSITO ORGÁNICO

El Zn no es depositado en un órgano en particular. Los huesos y los músculos poseen las mayores concentraciones, seguidos por el hígado y la piel. Cuando el aporte por la dieta sobrepasa los requerimientos el Zn se acumula en estos tejidos, mientras que durante un balance negativo sus concentraciones van descendiendo (5, 24, 30).

PÉRDIDAS ENDÓGENAS

Existen tres vías de excreción del Zn endógeno, la digestiva, la renal y por leche. Las pérdidas digestivas están determinadas por la descamación celular y las altas concentraciones de Zn en las secreciones digestivas, especialmente la pancreática y la intestinal (24, 43). Sus concentraciones dependen del estatus de Zn del animal, y posee un reaseguro de reabsorción, debido a que son secretadas desde el páncreas junto a MT, proteína que estimula su reabsorción en el yeyuno (5). La eficacia de la reabsorción es mayor en terneros con deficiencia de Zn, lo cual demuestra que este es otro mecanismo de regulación de pérdidas endógenas (26). La vía renal tiene una importancia secundaria (44). La concentración de Zn en calostro es de alrededor de 30 μ g/ml mientras que en la leche oscila entre 3 y 5 μ g/ml (45), y pueden variar con el aporte de Zn en la dieta (46).

REQUERIMIENTOS

La multiplicidad de funciones, las dudas sobre su metabolismo y la incapacidad de evaluar consecuencias subclínicas de la deficiencia hace que los requerimientos de Zn no sean claros. En este sentido pareciera que concentraciones de Zn en la dieta inferiores a 20 ppm de Zn (MS) se asocian con la carencia (35, 47). El empleo del método factorial para ajustar los requerimientos lleva a establecer un requerimiento de 30 ppm (MS) en el alimento para animales de carne (48), y del mismo valor para bovinos de leche, a excepción de la vaca en lactancia que posee requerimientos mayores, añadiendo 24 mg por kg de leche, llevando los requerimientos de un animal de 650 Kg y 40 Kg de leche por día a 63

ppm de Zn (MS) (49). Nocek y col. (50) lograron mejorar la performance productiva y reproductiva en rodeos lecheros suplementando por encima de los requerimientos del NRC (49). No resulta extraño encontrar sugerencias distintas, como de 19 ppm (MS) para terneros en crecimiento (51), 40 ppm (MS) para cualquier categoría (52) o de 50 a 75 ppm (MS) para animales de engorde a corral (53).

LA ENFERMEDAD

El desarrollo de la carencia de Zn en bovinos sigue una serie de fases comunes a otras carencias minerales. Un animal expuesto a un balance negativo de Zn comienza a movilizarlo desde diferentes tejidos, caracterizando la primera fase de carencia llamada depleción. Posteriormente descienden los niveles en plasma, caracterizando la etapa de deficiencia. Cuando el aporte de Zn a los tejidos es crítico comienzan a fallar las metaloenzimas específicas y las funciones dependientes de Zn, caracterizando la etapa de disfunción. Producto de esta última aparecen las consecuencias subclínicas y luego clínicas de la enfermedad (22) (Figura 1). Este esquema de la patogenia de la deficiencia establece también las alternativas de diagnóstico. La evaluación de concentraciones de Zn en tejidos sería de utilidad, pero resulta poco práctica por su muestreo invasivo (54), salvo emplear muestras de pelo o lana, pero que sin embargo no han ofrecido resultados contundentes (30, 55). La evaluación de enzimas específicas puede resultar poco precisa o demasiado tardía (30). Esperar por evidencias clínicas

sólo asegura que ya existieron daños subclínicos de la carencia (22). Ante esta situación la evaluación de la concentración plasmática de Zn (zincemia) sigue siendo la elección más común para evaluar el estatus de un rodeo, especialmente en condiciones prácticas ya que su muestreo es sencillo y no invasivo, aunque posee limitaciones. Por un lado la zincemia es inestable, descendiendo en respuesta a infecciones o estrés (18, 44, 56, 57, 58). Por otro lado es un marcador indirecto de la carencia, ya que su descenso no implica una disfunción sino simplemente una caída en los valores circulantes a los cuales hay que tratar de asociar con el riesgo de disfunciones. Existe un cierto acuerdo en considerar normal a valores de zincemia superiores a 90 µg/dl, mientras que concentraciones inferiores a 80 µg/dl indicarían carencia, dejando un rango de estado marginal entre ambas (47, 59).

Las consecuencias de la carencia de Zn no están aún bien definidas, pero aquellas que se conocen y valoraron demuestran que se trata de una deficiencia de alto riesgo productivo. Es necesario en este sentido enfatizar los riesgos de menores ganancias de peso (GDP), fallas inmunológicas, menor performance reproductiva y la mayor predisposición a enfermedades podales. Todas ellas serán objeto de análisis en las siguientes secciones.

MENORES GANANCIAS DE PESO

Uno de los primeros signos de la carencia de Zn en todas las especies es la disminución en el apetito. En bovinos se suma en forma incipiente

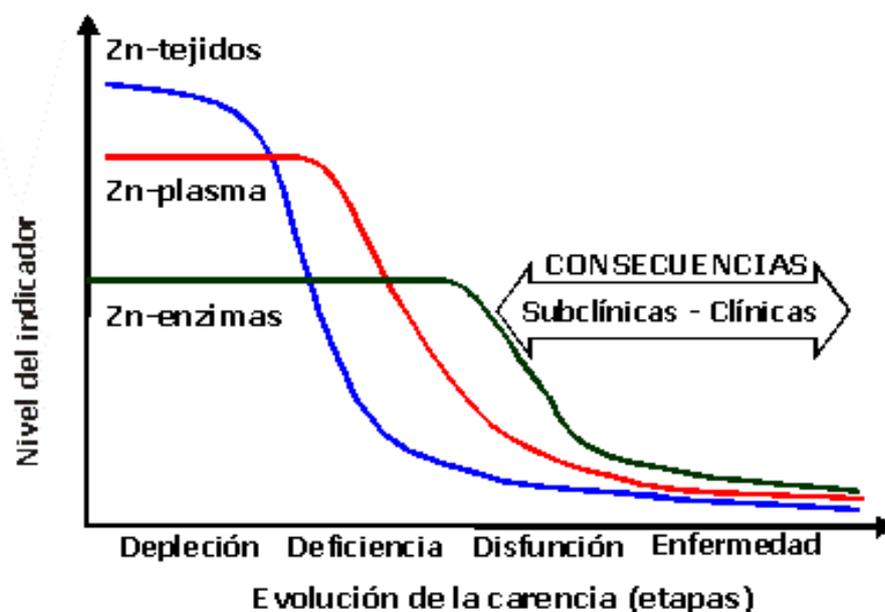


Figura 1. Etapas de la deficiencia de Zn (Modificado de Underwood and Suttle, 1999).

Figure 1: Phases of Zn deficiency (Modified of Underwood and Suttle, 1999)

una marcada disminución en la eficacia alimenticia (60). Por esta razón se puede suponer que la baja ganancia diaria de peso (GDP) en animales en crecimiento sería una secuela importante de la carencia de Zn, ya sea por su efecto directo sobre el ternero como por su efecto indirecto al reducir la producción lechera de la madre (59).

La menor GDP, ya sea por menor apetito o por baja eficiencia alimenticia, es una secuela preocupante en sistemas productivos de cría y engorde. Lamentablemente este tema posee tanta información sobre su riesgo potencial como dudas en su confirmación a campo. Por el lado experimental, la pérdida de apetito es tan evidente en especies de laboratorio que puede ser usado como prueba de la falta de Zn en su ración (13). Antes de la disminución del apetito, se evidencia en ratas un disturbio alimenticio por el cual los animales deficientes tienden a consumir más grasa que hidratos de carbono, aparentemente como una adaptación metabólica a la menor actividad de la piruvatocinasa, enzima Zn-dependiente de acción central en el metabolismo de los azúcares y punto de regulación de la insulina (12). Por otro lado el control hormonal del metabolismo se ve afectado con disminución de las hormonas tiroideas (14). Si bien se les adjudica a la anorexia y a la mala conversión alimenticia el bajo crecimiento, en realidad otros factores pueden estar complicando su comprensión. En este sentido ratones Zn deficientes disminuyen un 25 % su crecimiento y los niveles de Zincemia en un 70 % sin que aún se reduzca el consumo de alimento (61). Por otro lado resulta llamativo que ratas que ya presentan una reducción en el consumo de alimento, pero que son forzadas a comer, igualmente siguen perdiendo peso, postulándose como posible causa una disminución en el consumo de agua (62). También se ha postulado que las fallas en el crecimiento debidas al Zn se generarían por una falla de la señalización celular de la IGF-1 (15), o bien por anorexia secundaria a la inhibición en la liberación de neuropéptido Y desde el hipotálamo (16).

Engle y col (60) demostraron que vaquillonas Hereford x Angus de 200 kg consumiendo una dieta con 17 ppm de Zn presentan en apenas 21 días menores GDP, generada por una menor eficacia alimenticia, sin afectar el consumo voluntario de alimento, al ser comparados con una dieta que aportaba 40 ppm de Zn. Curiosamente las concentraciones de Zn en plasma e hígado no reflejaron el problema. Mayland y col (63) encontraron menores GDP en terneros que consumen menos de 20 ppm Zn, sin que esta misma situación afecte el peso o los índices reproductivos de sus madres. Spears y Kegley (32) informaron que novillos Hereford x Angus de 250 Kg presentaron menores GDP con una dieta que aportaba 33 vs 58 ppm del control, pero sin afectar ni el consumo

ni la conversión alimenticia. Spears (39) informa menores GDP en vaquillonas con 25 vs 49 ppm de Zn, y en este caso las zincemias diferenciaron los grupos. Otros investigadores han hallado diferencias en la GDP con dietas que aportaban 20 ppm de Zn al ser suplementadas con cantidades crecientes de Zn, sin que las concentraciones en plasma o pelo reflejaran claramente esta diferencia (55). La suplementación de dietas por encima de las 40 ppm de Zn durante sus primeros tres meses de vida no mejoró el crecimiento en terneros Holstein (64). Todos estos resultados expresan el riesgo potencial de menores GDP cuando la dieta aporta concentraciones insuficientes de Zn, pero no permiten precisar el valor exacto de riesgo. Un aporte límite tentativo para animales en crecimiento sería entre 30 a 33 ppm de Zn en la dieta, coincidiendo con los requerimientos establecidos por NRC para razas de carne y de lechería respectivamente (48, 49). Por otro lado las zincemias también pueden fallar al evidenciar el riesgo de menores GDP, por lo cual posiblemente el uso conjunto de las concentraciones de Zn en plasma y en el alimento podría mejorar el diagnóstico.

La carencia de Zn posee una incidencia regional debido a que los suelos carentes condicionan el crecimiento de forrajes que no cubren los requerimientos. A pesar de ello no abundan los trabajos de investigación que caractericen zonas de carencia y alerten sobre sus riesgos (65). En Argentina existen antecedentes de carencia de Zn, diagnosticada por bajas concentraciones en forrajes (2, 3, 66, 67), por bajos valores de zincemia (68) o ambas (69). En este último trabajo los autores evaluaron la respuesta a la suplementación oral en 12 ensayos en Corrientes, usando mezclas con óxido de Zn al 1%. Encontraron mejoras en las GDP en 6 de ellos, con diferencias promedio de 15,3 % y un caso de 44% a favor del grupo suplementado. El mejor resultado se observó en pastizales con menos de 20 ppm de Zn. Pechín y col (3) sin embargo no encontraron diferencias en las GDP en un ensayo de suplementación con novillos en La Pampa, donde los forrajes aportaban entre 22 y 27 ppm de Zn.

CONSECUENCIAS INMUNOLÓGICAS DE LA CARENCIA DE ZN

Otra consecuencia sería de la carencia de Zn es la menor resistencia a infecciones (70), debido a fallas en la respuesta inmunitaria celular (61) y humoral (71), con evidente compromiso de los mecanismos de la inflamación y las defensas antioxidantes (72, 73).

Debido a que el Zn es movilizado en situaciones estresantes la mayoría de los ensayos de suplementación se han realizado en animales sometidos a destete, en ocasiones asociados a otros factores estresantes como transportes pos-

destete e incluso ingreso y adaptación a feedlot (44, 74).

Novillos cruza Hereford x Angus de 250 kg que recibieron una dieta con 17 ppm de Zn mostraron menor respuesta a la inyección de fitohemoaglutininas, pero no se diferenciaron en la respuesta vacunal a IBR, comparados con otro grupo que recibía 40 ppm de Zn (60). En dos trabajos con novillos cruza al ingreso a feedlot, aquellos alimentados con 90 ppm de Zn respondieron mejor a un desafío con IBR, mostrando menor disminución y más rápida recuperación del consumo voluntario, con menor temperatura rectal ante la infección, al compararlos con aquellos que recibieron 30 ppm Zn (57). Los mismos autores reproducen idénticos resultados pero sólo cuando la suplementación con Zn era como metionato y no como óxido (58). Otros grupos reconocen diferencias a favor de la suplementación con Zn, especialmente como metionato, cuando se trata de animales estresados y desafiados con virus de IBR. En estos trabajos las dietas control presentaban 25 y 42 ppm de

Zn, y fueron suplementadas para alcanzar los 51 y 71 ppm de Zn respectivamente (75, 76). Contrariamente, Galyean y col (74) redujeron en más del 50 % la incidencia de enfermedades respiratorias en el ingreso a feedlot llevando la dieta de 30 a 100 ppm de Zn, aportado como metionato o como sulfato, pero no obtuvieron resultados cuando la suplementación fue sólo con 35 ppm adicionales como metionato. En novillos cruza Angus x Hereford, no se encontraron diferencias ni en la respuesta inmune celular ni humoral comparando dietas con 33 y 55 ppm de Zn (32). Lo propio ocurrió con la actividad inmunitaria *in vitro* al comparar diferentes concentraciones (65 a 400 ppm de Zn) y fuentes (metionina, lisina y óxido) en terneras Holstein (29). En Argentina, Corbellini y col (1) evaluaron en vacas lecheras la suplementación de dietas marginalmente deficientes (25 a 39 ppm) con óxido de zinc y zinc metionina (50 ppm), logrando disminuir la incidencia de endometritis, problemas podales y el recuento de células somáticas, pero sólo en el grupo con zinc metionina.

Tabla 1: Ensayos de suplementación con Zn evaluando la respuesta inmune de animales bajo condiciones de estrés.

Table 1: Zn supplementation trials evaluating immune response in animal under stress conditions

Cita	Categoría	Zn en alimento	respuesta inmune	tipo de respuesta evaluada
Engle et al, 1997	Novillos cruza Hereford x Angus de 250 kg	17 vs. 40 ppm	Positiva	Respuesta vacunal a virus de IBR y reacción a fitohemoaglutininas
Chirace et al, 1991 (2 ensayos)	Novillos ingreso a feedlot	30 vs 90 ppm	Positiva	Mejor recuperación al desafío con virus de IBR
Chirace et al, 1994	Novillos ingreso a feedlot	30 vs 90 ppm	Positiva sólo con metionato de Zn	Mejor recuperación al desafío con virus de IBR
Spears et al, 1991	Novillos ingreso a feedlot (214 kg)	26 vs 51 ppm	Positiva sólo con metionato de Zn	Respuesta vacunal a virus de IBR
Blezinger et al, 1992	Ingreso a feedlot	42 vs. 71 ppm	Positiva con metionato de Zn	Mejor recuperación al desafío con virus de IBR
Galyean et al, 1995	Novillos ingreso a feedlot	30 vs. 100 ppm	Positiva con metionatos y sulfatos	Disminución leve en enfermedades respiratorias (> 50%)
Corbellini y col., 1995	Vacas lecheras	25 vs 50 ppm	Positiva con metionato de Zn y negativa con óxido	Disminución en afecciones reproductivas y podales
Spears y Kegley (2002)	Novillos cruza Angus x Hereford	35 vs. 55 ppm	Negativa	Respuesta inmune celular y humoral
Kincaid et al, 1997	Terneras Holstein	65 a 400 ppm	Negativa	Actividad inmunitaria <i>in vitro</i>

Cuando todos estos resultados se evalúan en conjunto surge la inquietud de identificar la concentración de Zn en la dieta que limite las fallas inmunológicas por Zn (Tabla 1). En este sentido resulta evidente que los requerimientos aumentan en situaciones de estrés, sobrepasando aquellos propuestos para evitar menores GDP. Igualmente tampoco es posible marcar un límite claro entre concentraciones insuficientes y seguras. Teniendo en cuenta que la máxima concentración que demostró ser insuficiente fue de 42 ppm de Zn (76), se puede sugerir sobrepasar este valor para evitar riesgos, posiblemente tomando como límite máximos los 65 ppm que resultaron seguros incluso para pruebas inmunológicas in vitro (47).

CONSECUENCIAS REPRODUCTIVAS DE LA CARENCIA DE ZINC

El parto es una situación estresante, con compromiso oxidativo del animal y disminución de la zincemia (56). El zinc resulta esencial para la correcta respuesta inflamatoria, la capacidad inmune y la integridad epitelial, incluso de la glándula mamaria, por lo cual su carencia se asocia con mayor incidencia de retenciones placentarias y mastitis, aumento del recuento de células somáticas en leche y desmejoramiento de los índices reproductivos (77, 78). Varios trabajos confirman estos riesgos. La suplementación oral con sales orgánicas e inorgánicas de minerales asociados a las defensas antioxidantes (Zn, Cu y Mn) mejoraron los índices reproductivos en rodeos de carne (36). Con los mismos minerales más el agregado de Co, y todos como sales orgánicas, Ballentine y col (79) mejoraron la producción lechera y los índices reproductivos y redujeron la incidencia de lesiones podales en vacas Holstein. Muehlenbein y col (80) no lograron mejorar los índices reproductivos en vacas Holstein suplementadas con Cu en el parto hasta que lo administraron junto con Zn y lograron aumentar la tasa de preñez. Del mismo modo Campbell y Miller (81) suplementando con 0,8 gr/día de Zn como sulfato o metionato en el parto no modificaron la incidencia de retenciones placentarias en un rodeo Holstein, pero sí redujeron el intervalo parto-primer celo con ambas fuentes. El mismo resultado se obtuvo en Argentina con metionato de zinc, elevando su aporte de 25 a 50 ppm (1). Cuando la suplementación no está dirigida a corregir la carencia sino que se agrega por sobre los requerimientos los resultados pueden ser nulos o hasta negativos (88). En rodeos de carne el riesgo por carencia de Zn en el posparto parece menor, ya que dietas deficientes en Zn y que reducen las ganancias de peso en terneros no llegaron a afectar los índices reproductivos de las madres (63). La diferencia de susceptibilidad entre sistemas está seguramente relacionado

con los mayores requerimientos generados por la producción lechera y el desequilibrante desafío metabólico del parto y la lactancia (49).

CONSECUENCIAS PODOALES DE LA CARENCIA DE ZINC

El Zn cumple función catalítica, estructural y regulatoria de la queratinización a través de sus metaloproteínas, pero además es necesario para la correcta respuesta inmune (31, 83). Esto explica la asociación entre la carencia de Zn y la mayor incidencia de lesiones podales en vacas lecheras (84).

En trabajos originales la incorporación de 2 a 3 gramos por día de sulfato de zinc en vacas lecheras preparto disminuyó la incidencia de problemas podales (85). Basados en la idea que las fuentes orgánicas del Zn evitan la interferencias propias de fuentes inorgánicas como el sulfato (86) se intensificaron los estudios con fuentes orgánicas como Zn-metionina. Así, estudios conducidos en la Universidad de Illinois (USA) demostraron que la suplementación anual con Zn-metionina reducía la incidencia de lesiones podales en vacas en lactancia (87). Investigaciones realizadas desde la Universidad de Kansas (USA) indican que la suplementación con 216 mg diarios de Zn, como Zn-metionina, redujo del 5,38 al 2,45 % la incidencia de lesiones podales en novillos en pastoreo (88). Resultados similares fueron obtenidos en la provincia de Buenos Aires, donde el aporte de 3 gr diarios de óxido de zinc durante el parto y la lactancia de vacas Holando no mejoró la prevalencia de afecciones podales, pero sí la suplementación con 2 gr de Zn-metionina durante igual período, logrando disminuir esta prevalencia del 31 al 13,5% (35).

El auge de los suplementos minerales orgánicos ha determinado que la mayoría de los ensayos de suplementación destinados a evaluar el efecto protector del Zn sobre las afecciones podales se haya hecho comparando fuentes orgánicas e inorgánicas y empleando varios minerales a la vez, situación que impide diferenciar el efecto individual del Zn. De este modo la suplementación desde los 21 parto hasta los 250 días de lactancia con Zn junto a Mn, Co y Cu como complejos de aminoácidos redujo la incidencia de lesiones podales en vacas Holstein (79). La misma comparación llevó a Siciliano-Jones y col (89) a los mismos resultados, pero además obtuvieron con la suplementación orgánica una mejor performance de la lactancia, con mayor producción de proteína y grasa al compararlos con iguales concentraciones minerales aportadas como sulfatos. Nocek y col (90) por el contrario, no encontraron diferencias sustanciales entre fuentes orgánicas e inorgánicas de Cu, Zn, Mn y Co sobre la prevalencia de lesiones podales durante dos ciclos de lactancia, evaluadas incluso

por encima y por debajo de los requerimientos establecidos por NRC (49).

Resulta difícil concluir respecto a la importancia del Zn en la prevención de afecciones podales, ya que si bien existen antecedentes que respaldan su uso los resultados no son siempre evidentes y están impulsados por la incorporación de suplementos orgánicos al mercado mundial. Podría concluirse que la respuesta terapéutica o preventiva de la suplementación con Zn estará supeditada a la existencia de una carencia en la dieta base y a evitar otras causas primarias de lesiones podales, especialmente las acidosis ruminal originada por exceso de grano en la dieta (91).

CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN DEL TEMA

El rol central del Zn en metaloenzimas esenciales para la salud animal alertan sobre los riesgos de su carencia en bovinos. Las funciones más comprometidas serían la respuesta inmune, la defensa antioxidante del organismo, y el consumo de alimento. En este sentido las pérdidas productivas por esta carencia se deberían a fallas inmunológicas, menores ganancias de peso, fallas reproductivas y mayor incidencia de lesiones podales, probablemente en este orden. En Argentina existen varios antecedentes de su diagnóstico y de respuestas positivas a su suplementación, pero lamentablemente ni las zonas de carencia ni sus consecuencias han sido claramente caracterizadas, lo cual permitiría mejorar los planes sanitarios en esas regiones. Momentáneamente resultaría adecuado intensificar su diagnóstico, basado en valores de zincemia menores a 90 µg/dl y contemplar suplementaciones que aseguren las 30 ppm de Zn para animales en crecimiento, con aumentos estratégicos de su aporte en situaciones de estrés, como partos, destetes, ingresos a feedlot o lactancia exigentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Corbellini CN, Mangoni A R, De Mattos CA, Auzmendi J. Efectos de la suplementación con óxido de zinc o metionina-zinc en vacas lecheras marginalmente deficientes. *Revista de Medicina Veterinaria*. 1997; Vol. 78. N° 6: 439-447.
2. Pechín GH, Cseh SB, Corbellini CN, Idiard JL, Moralejo RH, Visconti M, Drake M, Yarrar M. Estudio de las deficiencias minerales en bovinos de carne en el departamento de Maracó, Provincia de La Pampa, Argentina. *Rev Arg Prod Anim*. 1999; 15 (2): 492-494.
3. Pechín GH, Corbellini CN, Cseh SB, Meglia GE, Vergara LA, Moralejo RH. Efecto de la suplementación con óxido de zinc en bovinos para carne alimentados con forrajes marginalmente deficientes en zinc. *Rev Med Vet*. 2001; 82 (6): 308 - 311.
4. Minatel L, Buffarini MA, Scarlata EF, Dallorso ME y Carfagnini JC. Niveles de oligoelementos minerales en bovinos del noroeste de la Provincia de Buenos Aires. *Sitio Argentino de Producción Animal - www.*

produccion-animal.com.ar

5. Tapiero H, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother*. 2003; 57(9):399-411.
6. Sekler I, Sensi SL, Hershinkel M, Silverman WF. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol Med*. 2007; 13(7-8):337-43.
7. Miller AF. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol*. 2004; 8(2):162-8.
8. Millán JL. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal*. 2006; 2(2):335-41.
9. Supuran CT. Carbonic anhydrases--an overview. *Curr Pharm Des*. 2008; 14(7):603-14.
10. Arolas JL, Vendrell J, Aviles FX, Fricker LD. Metalloproteases: emerging drug targets in biomedicine. *Curr Pharm Des*. 2007; 13(4):349-66.
11. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*. 2000; 2(4):252-7.
12. Kennedy KJ, Rains TM, Shay NF. Zinc deficiency changes preferred macronutrient intake in subpopulations of Sprague-Dawley outbred rats and reduces hepatic pyruvate kinase gene expression. *J Nutr*. 1998; 128(1):43-9.
13. Evans SA, Overton JM, Alshingiti A, Levenson CW. Regulation of metabolic rate and substrate utilization by zinc deficiency. *Metabolism*. 2004; 53(6):727-32.
14. Jing MY, Sun JY, Wang JF. The Effect of Peripheral Administration of Zinc on Food Intake in Rats Fed Zn-adequate or Zn-deficient Diets. *Biol Trace Elem Res*. 2008; 124(2):144-56.
15. MacDonald RS. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr*. 2000; 130 (5S Suppl):1500S-8S.
16. Levenson CW. Zinc regulation of food intake: new insights on the role of neuropeptide Y. *Nutr Rev*. 2003; 61(7):247-9.
17. Chesters JK, Petrie L. A possible role for cyclins in the zinc requirements during G1 and G2 phases of the cell cycle. *J Nutr Biochem*. 1999; 10(5):279-90.
18. Cousins RJ, Liuzzi JP, Lichten LA. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem*. 2006; 281(34):24085-9.
19. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59(4):627-47.
20. Cherian MG, Kang YJ. Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006; 231(2):138-44.
21. Tubek S. Zinc supplementation or regulation of its homeostasis: advantages and threats. *Biol Trace Elem Res*. 2007; 119(1):1-9.
22. Underwood EJ, Suttle NF. *The Mineral Nutrition of Livestock*. CABI Publishing. London (UK). 1999; p:

477-512.

23. Hampton DL, Miller WJ, Neathery MW, Kincaid RL, Blackmon DM, Gentry RP. Absorption of zinc from small and large intestine of calves. *J Dairy Sci.* 1976; 59(11):1963-6.

24. Neathery MW, Miller WP, Blackmon DM, Gentry RP, Jones JB. Absorption and tissue zinc content in lactating dairy cows as affected by low dietary zinc. *J Anim Sci.* 1973; 37(3):848-52.

25. Stake PE, Miller WJ, Neathery MW, Gentry RP. Zinc-65 absorption and tissue distribution in two- and six-month-old holstein calves and lactating cows. *J Dairy Sci.* 1975; 58(1):78-81.

26. Miller WJ, Blackmon DM, Gentry RP, Pate FM. Zinc absorption, metabolism, and endogenous excretion in zinc-deficient and normal calves over an extended time. *J Dairy Sci.* 1991; 74(10):3535-43.

27. Spears JW. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J Nutr.* 2003; 133(5 Suppl 1):1506S-9S.

28. Xu C, Wensing T, Beynen AC. The effects of dietary soybean versus skim milk protein on plasma and hepatic concentrations of zinc in veal calves. *J Dairy Sci.* 1997; 80(9):2156-61.

29. Kincaid RL, Chew BP, Cronrath JD. Zinc oxide and amino acids as sources of dietary zinc for calves: effects on uptake and immunity. *J Dairy Sci.* 1997; 80(7):1381-8.

30. Wright CL, Spears JW. Effect of zinc source and dietary level on zinc metabolism in Holstein calves. *J Dairy Sci.* 2004; 87(4):1085-91.

31. Cao J, Henry PR, Guo R, Holwerda RA, Toth JP, Littell RC, Miles RD, Ammerman CB. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. *J Anim Sci.* 2000; 78(8):2039-54.

32. Spears JW, Kegley EB. Effect of zinc source (zinc oxide vs zinc proteinate) and level on performance, carcass characteristics, and immune response of growing and finishing steers. *J Anim Sci.* 2002; 80(10):2747-52.

33. Tomlinson DJ, Mülling CH, Fakler TM. Invited review: formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals, and vitamins in functional claw integrity. *J Dairy Sci.* 2004; 87(4):797-809.

34. Kessler J., I. Morel, P.A. Dufey, A. Gutzwiller, A. Stern, H. Geyer. Effect of organic zinc sources on performance, zinc status and carcass, meat and claw quality in fattening bulls. *Livestock Production Science* 2003; (81): 161-171

35. Mufarrije DJ (1999) Los minerales en la alimentación de vacunos de carne en la Argentina. E.E.A. INTA Mercedes, Corrientes. Trabajo de Divulgación Técnica. disponible en www.produccion-animal.com.ar

36. Ahola JK, Baker DS, Burns PD, Mortimer RG, Enns RM, Whittier JC, Geary TW, Engle TE. Effect of copper, zinc, and manganese supplementation and source on reproduction, mineral status, and performance in grazing beef cattle over a two-year period. *J Anim Sci.* 2004; 82(8):2375-83.

37. Malcolm-Callis KJ, Duff GC, Gunter SA, Kegley EB, Vermeire DA. Effects of supplemental zinc concentration and source on performance, carcass characteristics, and serum values in finishing beef steers. *J Anim Sci.* 2000; 78(11):2801-8.

38. Nunnery GA, Vasconcelos JT, Parsons CH, Salyer GB, Defoor PJ, Valdez FR, Galyean ML. Effects of source of supplemental zinc on performance and humoral immunity in beef heifers. *J. Anim Sci.* 2007; 85:2304-2313.

39. Spears JW. Zinc methionine for ruminants: relative bioavailability of zinc in lambs and effects of growth and performance of growing heifers. *J Anim Sci.* 1989; 67(3):835-43.

40. Spears, JW. Organic trace minerals in ruminant nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1996; 58: 151-163.

41. Spears JW., Schlegelb P, Seala MC, Lloyd KE. Bioavailability of zinc from zinc sulfate and different organic zinc sources and their effects on ruminal volatile fatty acid proportions. *Livestock Production Science*; 2004; 90: 211-217.

42. Jackson MJ. Physiology of zinc: general aspects. Ed. Mills CF. *Zinc in human biology.* London: Springer Verlag (England); 1989; p. 1-14.

43. Miller WJ. New Concepts and Developments in Metabolism and Homeostasis of Inorganic Elements in Dairy Cattle. A Review. *J. Dairy Sci.* 1975; 58 (10): 1549-1560.

44. Nockels CF, DeBonis J, Torrent J. Stress induction affects copper and zinc balance in calves fed organic and inorganic copper and zinc sources. *J Anim Sci.* 1993; 71(9):2539-45.

45. Fransson GB, Lönnerdal B. Distribution of trace elements and minerals in human and cow's milk. *Pediatr. Res.* 1983; 17(11):912-5.

46. Miller WJ, Stake PE. Use and limitations of biochemical measurements in diagnosing mineral deficiencies. (in Proc.) *Ga. Nutr. Conf. Feed Ind.* 1974; p 25.

47. Kincaid RL. Assessment of trace minerals of ruminants: A review. *Proceeding of the American Society of Animal Science* 1999;1-10.

48. NRC- National Research Council. *Nutrient Requirements of Beef Cattle.* 7th ed. National Academy Press, Washington, DC. (USA) 2000; Minerals, p: 54-74.

49. NRC- National Research Council. *Nutrient requirements of dairy cattle.* 7th ed. National Academy Press. Washington, DC. (USA) 2001; Minerals, p: 105-161.

50. Nocek JE, Socha MT, Tomlinson DJ. The Effect of Trace Mineral Fortification Level and Source on Performance of Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 2006; 89:2679-2693.

51. Kirchgessner M, Heindl U. Investigation about the determination of zinc requirement of calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 1993; 70:38.

52. McDowell LR. Recent Advances in Minerals and Vitamins on Nutrition of Lactating Cows. *Pakistan Journal of Nutrition.* 2002; 1(1) : 8-19

53. Boyles S., Loerch S, Fluharty F, Shulaw W, Stanfield H.. 1995. *Feedlot Management Primer.* OSU Ex-

- tension. <http://beef.osu.edu/library/feedlot/index.html>
54. Puschner B, Choi Y, Tegzes JH, Thurmond MC. Influence of age, sex, and production class on liver zinc concentration in calves. *J Vet Diagn Invest.* 2004; 16:278-282
55. Beeson WM, Perry T W, Zurcher TD. Effect of supplemental zinc on growth and on hair and blood serum levels of beef cattle. *J Anim Sci.* 1977; 45(1):160-5.
56. Goff JP, Stabel JR. Decreased Plasma Retinol, a-Tocopherol, and Zinc Concentration During the Periparturient Period: Effect of Milk Fever. *J Dairy Sci* 1990; 73: 3195-3199.
57. Chirase NK, Hutcheson DP, Thompson GB. Feed intake, rectal temperature, and serum mineral concentration of feedlot cattle fed zinc oxide or zinc methionine and challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Anim. Sci.* 1991; 69:4137-4145.
58. Chirase NK, Hutcheson DP, Thompson GB and Spears JW. Recovery rates and plasma zinc and copper concentrations of steer calves fed organic and inorganic zinc and manganese source with or without injectable copper and challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus. *J. Anim. Sci.* 1994; 72: 212-219
59. Enjalbert F, Lebreton P, Salat O. Effects of copper, zinc and selenium status on performance and health in commercial dairy and beef herds: Retrospective study. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2006; 90(11-12):459-66.
60. Engle TE, Nockels CF, Kimberling CV, Weaver DL, Johnson AB. Zinc repletion with organic or inorganic forms of zinc and protein turnover in marginally zinc-deficient calves. *J Anim Sci.* 1997. 75(11):3074-81.
61. King LE, Frentzel JW, Mann JJ, Fraker PJ. Chronic Zinc Deficiency in Mice Disrupted T Cell Lymphopoiesis and Erythropoiesis While B Cell Lymphopoiesis and Myelopoiesis Were Maintained. *Journal of the American College of Nutrition*, 2005; Vol. 24, No. 6, 494-502
62. Norii T. Growth of zinc-deficient rats during intragastric tube feeding. *Biol Trace Elem Res.* 2008; 122(3):266-75.
63. Mayland HF, Rosenau RC, Florence AR. Grazing cow and calf responses to zinc supplementation. *J Anim Sci.* 1980; 51(4):966-85.
64. Arrayet JL, Oberbauer AM, Famula TR, Garnett I, Oltjen JW, Imhoof J, Kehrli ME, Graham TW. Growth of Holstein calves from birth to 90 days: The influence of dietary zinc and BLAD status. *J. Anim. Sci.* 2002; 80:545-552.
65. Corah L R, Dargatz DA, Peters CW. NAHMS Forage Survey: Trace mineral analysis of 352 forage samples collected in 18 states. *J. Anim. Sci.* 1996; 74(Suppl. 1):202 (Abstr.).
66. Mufarrege DJ. El contenido de zinc en pasturas naturales en la Provincia de Corrientes y en la región del NEA. E.E.A. INTA Mercedes, Corrientes, Noticias y Comentarios 2000; N° 341.
67. Faber OW. Los minerales en la Nutrición Mineral y salud animal en la región central de la provincia de Córdoba. Dto. Producción Animal INTA Manfredi (Cba.). 2001; Sitio Argentino de Producción Animal - www.produccion-animal.com.ar
68. Ramírez CE, Mattioli GA, Giuliadori MJ, Yano H., Matsui I. Deficiencia de Zn en Bovinos de Cria de la Provincia de Buenos Aires. *Veterinaria Argentina.* 1998; 15 (142): 114-118.
69. Mufarrege DJ, Aguilar DE. Suplementación con zinc de los bovinos para carne en la provincia de Corrientes. E.E.A. INTA Mercedes, Corrientes, Noticias y Comentarios 2001; N° 348.
70. Klaus-Helge L, Rink L. Zinc-Altered Immune Function. *J. Nutr.* 2003; 133: 1452S-1456S.
71. Prasad AS. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells. *Mol Med* 2008; 14v(5-6): 353-357.
72. Bruno RS, Song Y, Leonard SW, Mustacich DJ, Taylor AW, Traber MG, Ho E. Dietary zinc restriction in rats alters antioxidant status and increases plasma F2 isoprostanes. *J Nutr Biochem.* 2007; 18(8):509-18.
73. Prasad AS. Zinc: Mechanisms of Host Defense. *J. Nutr.* 2007; 137: 1345-1349
74. Galyean ML, Malcolm-Callis KJ, Gunter SA, Berrie RA. Effect of zinc source and level and added copper lysine in the receiving diet on performance by growing and finishing steers. *Prof. Anim. Sci.* 1995; 11:139-148.
75. Spears JW, Harvey RW, Brown TT. Effects of zinc methionine and zinc oxide on performance, blood characteristics, and antibody titer response to viral vaccination in stressed feeder calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991; 199:1731-1733.
76. Blezinger SB, Hutcheson DP, Chirase NK, Mies WL. 1992. Effect of supplemental trace mineral complexes on rectal temperature, feed intake and body weight change with infectious bovine rhinotracheitis virus challenged feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 70(Suppl. 1):301 (Abstr.)
77. Boland, MP. Trace minerals in production and reproduction in dairy cows. *Advances in Dairy Technology.* 2003; 15: 319-330
78. Wilde D. Influence of macro and micro minerals in the peri-parturient period on fertility in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 2006; 96(3-4):240-9.
79. Ballentine HT, Socha MT, Tomlinson DJ, Johnson AB, Fielding AS, Shearer JK, Van Amstel. Effects of Feeding Complexed Zinc, Manganese, Copper, and Cobalt to Late Gestation and Lactating Dairy Cows on Claw Integrity, Reproduction, and Lactation Performance. *The Professional Animal Scientist* . 2002; 18: 211-218.
80. Muehlenbein EL, Brink DR, Deutscher GH, Carlson MP, Johnson AB. Effects of inorganic and organic copper supplemented to first-calf cows on cow reproduction and calf health and performance. *J Anim Sci.* 2001; 79(7):1650-1659.
81. Campbell MH, Miller JK. Effect of Supplemental Dietary Vitamin E and Zinc on Reproductive Performance of Dairy Cows and Heifers Fed Excess Iron. *J Dairy Sci.* 1998; 81:2693-2699

DE Rosa y col.

82.Olson PA, Brink DR, Hickok DT, Carlson MP, Schneider NR, Deutscher GH, Adams DC, Colburn DJ, Johnson AB.Effects of supplementation of organic and inorganic combinations of copper, cobalt, manganese, and zinc above nutrient requirement levels on postpartum two-year-old cows. *J Anim Sci.* 1999; 77(3):522-32.

83.Cousins RJ. Zinc. In: Ziegler, E.E., Filer Jr., L.J. (Eds.), *Present Knowledge in nutrition*, seventh ed. ILSI Press, Washington (USA), 1996; p. 293.

84.Socha M, Tomlinson DJ, Johnson AB, Schugel LM. Improved claws through improved micronutrient nutrition. 12th International Symposium on Lameness in Ruminants. 2002; P: 62-69.

85.Weaver AD, Toussaint-Raven E, Egerton JR, Greenough PR, Demertzis PN, Peterse DJ, Modrakowski A. Skara, Sweden; Veterinary Institute. 1978; p. 113.

86.Wedekind K J, Hortin AE, Baker DH. Methodology for assessing zinc bioavailability: Efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate and zinc oxide. *J. Anim. Sci.* 1992; 70:178-187.

87.Moore CL, Walker PM, Jones MA, Webb JM. Zinc methionine supplementation for dairy cows, *J. Dairy Sci.* 71. 1988; (Suppl. 1), p. 152.

88.Brazle FK. The effect of zinc methionine in a mineral mixture on gain and incidences of foot rot on steers grazing native grass pastures. *J. Anim. Sci.* 1993; 71(Suppl. 1):40 Abstr. Brazle F.K.

89.Siciliano-Jones JL, Socha MT, Tomlinson DJ, De-Frain JM. Effect of trace mineral source on lactation performance, claw integrity, and fertility of dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2008; 91(5):1985-95.

90.Nocek JE, Johnson AB, Socha MT. Digital characteristics in commercial dairy herds fed metal-specific amino acid complexes. *J Dairy Sci.* 2000; 83(7):1553-72.

91.Owens FN, Secrist DS, Hill W J, Gill D R. Acidosis in Cattle: A Review. *J. Anim. Sci.* 1998; 76:275-286

USO DE ANÁLOGOS DE GNRH EN EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN INDESEADA CANINA

Valiente C^{1*}, García Romero G^{2*}, Gobello C^{3*}

¹ Med. Vet., ² Alumna avanzada, ³ Dra., Med. Vet., DECAR

* Laboratorio de Fisiología Reproductiva

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

Resumen: Los análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que incluyen agonistas y antagonistas, se sintetizaron por la sustitución de aminoácidos en la molécula original con el fin de obtener mayor potencia, duración y efectividad. El objetivo de este artículo fue hacer una revisión de los efectos farmacológicos contraceptivos de este grupo de drogas en los caninos domésticos. La administración a largo plazo de agonistas funciona a través de la regulación negativa de los receptores hipofisarios de la GnRH inhibiendo la producción y liberación de gonadotropinas luego de un período de estimulación inicial. Uno de los avances más importantes para los agonistas fue el desarrollo de formulaciones de liberación lenta que lograron suprimir en forma reversible las funciones reproductivas en machos y hembras por periodos que exceden el año con una única aplicación. Contrariamente, los antagonistas se unen a los receptores de GnRH bloqueándolos y compitiendo con la GnRH endógena, de forma que inhiben inmediatamente el eje gonadal, sin producir estimulación inicial. Una desventaja para el caso de los antagonistas, es que aún no se han podido desarrollar formulaciones de depósito. Existe un lugar prometedor para los análogos de GnRH en el futuro de la reproducción canina. La efectividad, seguridad y reversibilidad de los análogos están reportadas, pero esta información es aún escasa. Queda trabajo por hacer para disponer de formulaciones potentes, seguras y de liberación prolongada que permitirán su indicación masiva en situaciones prácticas.

Palabras clave: Agonista de GnRH; Antagonista de GnRH; Perro; Contracepción

GNRH ANALOGS IN THE CONTROL OF THE UNDESIRABLE CANINE REPRODUCTION

Abstract: The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogs, which include agonists and antagonists, have been produced by amino acid substitutions of the native GnRH molecule to create greater potency and longer duration of effectiveness. The aim of this article was to review the pharmacological contraceptive effects of these groups of drugs in the domestic dog. Long-term administration of agonists functions through desensitization and down-regulation of GnRH pituitary receptors inhibiting gonadotropin production and release after an initial stimulation period. A significant advance in this aspect was obtained by the development of slow-release formulations that have shown to reversibly suppress reproductive function in male and female dogs for periods exceeding one year. Conversely, GnRH antagonists bind to gonadotrope GnRH receptors and compete successfully with endogenous GnRH for occupancy, thereby inhibiting the pituitary-gonadal axis immediately, without the undesirable initial stimulation. A major antagonists' disadvantage is the present lack of long term delivery systems. There is a promising place for both agonists and antagonist in future canine reproduction. Effectiveness, security and reversibility are reported, but this information is still not enough. Further work has still to be done to develop potent, safe and long-term release formulations which would permit their wide application in clinical settings.

Key words: Dog; GnRH agonist; GnRH antagonist; Contraception.

Fecha de recepción: 22/10/08

Fecha de aprobación: 20/11/08

Dirección para correspondencia: Med. Vet. Carla Valiente. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

INTRODUCCIÓN

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido producido por el hipotálamo que actúa sobre los receptores de GnRH en la hipófisis. La GnRH es liberada de manera pulsátil y posee una corta vida media de 2 a 5 minutos siendo rápidamente degradada por proteasas. La GnRH estimula en la hipófisis la producción y liberación de las gonadotropinas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) que, a su vez, van a actuar sobre las gónadas, regulando la producción de esteroides, la espermatogénesis, el desarrollo folicular y la ovulación (1, 2).

Los análogos de GnRH, agonistas y antagonistas, se desarrollaron por sustituciones de aminoácidos en la molécula original. Desde que se descubrió la composición química de la molécula de GnRH en 1971, se sintetizaron más de 3000 análogos (3, 4). La administración oral de estos análogos tiene muy baja biodisponibilidad (en el orden del 0.1%) ya que son susceptibles a la degradación por peptidasas en el tracto gastrointestinal, por lo que requieren administración parenteral (5, 6). Mas recientemente, se comenzó a trabajar en la síntesis de antagonistas no peptídicos que permiten su administración oral, no obstante, la alta especificidad de especie de estos compuestos ha retrasado su desarrollo farmacéutico (7).

El interés por los análogos sintéticos está centrado en desarrollar modificaciones químicas en la molécula de GnRH para crear otras de mayor potencia y vida media. Este objetivo se logró incrementando la afinidad por los receptores y disminuyendo la degradación o eliminación de los compuestos. Así se generaron potentes agonistas por sustitución de dos aminoácidos (posiciones 6 y 10) con potencias que superaron 200 veces la de la molécula original (4). Los cambios estructurales introducidos fueron menores para los agonistas y más pronunciados en los antagonistas, los cuales difieren bastante de la molécula original.

Uno de los primeros problemas prácticos en presentarse con el uso de agonistas y antagonistas fue la necesidad de frecuentes aplicaciones subcutáneas por periodos prolongados de tiempo a fin de mantener su efecto. Un avance importante, para el caso de los agonistas, en este aspecto fue el desarrollo de compuestos de liberación lenta, fácilmente administrables en forma intramuscular o de implantes subcutáneos, cada 3, 6 ó 12 meses dependiendo de la formulación (8). En este aspecto, los antagonistas se encuentran en desventaja ya que aún no se han podido desarrollar formulaciones de depósito.

Por su parte, las primeras generaciones de los antagonistas requerían también altas dosis para mantener una adecuada supresión de los receptores de GnRH (9) y su hidrofobicidad y so-

lubilidad eran limitadas induciendo la formación de nódulos en el sitio de inyección. Adicionalmente, producían cuadros alérgicos localizados y sistémicos con degranulación de mastocitos, liberación de histamina y otros mediadores, causando edema y reacciones anafilácticas (9, 10, 11). Todos estos problemas fueron superados en su mayor parte con la aparición de la tercera generación de antagonistas, como el teverelix, abarelix, cetrorelix, ganirelix y acyline entre otros; que demostraron ser bien tolerados en varias especies incluso el perro (12, 13). En humanos por ejemplo, solo se reportaron efectos leves y transitorios en el sitio de inyección, tales como eritema, prurito e hinchazón, de una duración no mayor de un par de horas (11, 14).

No se describieron cambios a nivel bioquímico ni hematológicos por efecto de los análogos en ninguna especie (4). En un reporte en humanos con el antagonista de tercera generación, acyline, administrado por un periodo prolongado se describió solamente una leve disminución del hematocrito asociado al hipogonadismo (12).

Considerando la capacidad de los análogos de GnRH de controlar segura y eficazmente la reproducción, el objetivo de este artículo fue hacer una revisión de los efectos farmacológicos contraceptivos de este grupo de drogas en la especie canina.

ACCIONES FARMACOLÓGICAS AGONISTAS

Los agonistas de la GnRH estimulan la producción y liberación de gonadotropinas por la hipófisis, con una potencia mayor aunque variable según los distintos compuestos. Paradójicamente, cuando los agonistas son administrados en forma prolongada producen una acción farmacológica "anti reproductiva o de esterilización química". Esto sucede por desensibilización de los receptores de GnRH, lo cual resulta en una regulación negativa (15).

Esta desensibilización se logra de dos maneras, por administración del agonista de GnRH en forma continua, o bien usando formulaciones de agonistas de liberación prolongada (9, 16). La desventaja de la inhibición del eje gonadal con agonistas es esa liberación inicial de gonadotropinas (efecto "flare up") antes de la desensibilización. Esta puede inducir celo y ovulación al inicio del tratamiento pudiendo retrasar la supresión gonadal por 7 a 14 días (17).

ANTAGONISTAS

Los antagonistas actúan por mecanismos diferentes al de los agonistas. Estas moléculas se unen a los receptores gonadotropos y compiten con las moléculas endógenas de GnRH por ocupar el receptor específico de membrana (9). De esta

manera no hay secreción inicial de gonadotropinas, y por ende, no se produce el indeseable efecto de estimulación inicial del eje (flare up; 11, 18). Por esta razón, la inhibición gonadal se obtiene más rápidamente con antagonistas que con agonistas (9). Después de la administración de antagonistas, la hipófisis sigue siendo sensible a la GnRH endógena o a la administración de agonistas (18, 19). El grado y duración del efecto inhibitorio es dosis dependiente (20).

Datos recientes sugirieron que los tratamientos prolongados con antagonistas de GnRH podrían conducir, también, a una regulación negativa de los receptores (4, 21). Finalmente, la reversibilidad total de los efectos se reportó extensamente para ambos análogos (6, 22, 23, 24, 25). No obstante, luego del cese del tratamiento, los antagonistas mostrarían una recuperación más rápida de la hipófisis y función gonadal que los agonistas (8).

APLICACIONES DE LOS ANÁLOGOS AGONISTAS

El desarrollo de formulaciones de liberación lenta de agonistas surgió de la imposibilidad clínica de realizar aplicaciones diarias o colocar bombas de liberación quirúrgicamente. La administración de agonistas de GnRH en sus formulaciones de liberación prolongada brinda una supresión reversible de las funciones reproductivas en machos y hembras por periodos que exceden el año (15, 23, 26, 27, 28, 29).

En un experimento inicial se trataron perras beagles en proestro con un implante subcutáneo a base de acetato de nafarelina, lográndose la supresión en forma reversible de los ciclos estrales por 18 meses (23). Cuando el mismo protocolo se administró a perras en anestro, se indujo un celo de una a dos semanas de duración después de comenzado el tratamiento, debido al efecto estimulante inicial del agonista (23).

Más recientemente se comenzó a trabajar con implantes de liberación prolongada a base de acetato de deslorelina (*Suprelorin*®, Peptech Animal Health, Sydney, Australia), colocados a través de una inyección subcutánea. Así, se probaron diferentes dosis de acetato de deslorelina implantando 52 perras en distintas etapas reproductivas (gestación, diestro y anestro). En todos los casos se prolongó el intervalo interestro con una duración que fue independiente de la etapa del ciclo estral en que fueron implantadas. Un dato interesante fue que la dosis más alta de deslorelina prolongó el intervalo interestro por más tiempo, superando en algunos casos los 27 meses. Las perras preñadas tuvieron un parto normal, y otras seis que recibieron servicio en el primer celo post implante quedaron preñadas (28).

En un intento por evitar el efecto estimu-

lante inicial que producen los agonistas en perras en anestro tratadas con deslorelina (6 mg sc), se obtuvieron resultados exitosos administrando acetato de megestrol (2.2 mg/kg/día) durante 21 ó 14 días habiendo implantado el agonista el día 7 ó 14 del tratamiento, respectivamente (17).

Con un protocolo de megestrol (2 mg/kg) de ocho días, usado con el mismo propósito, pero comenzando cuatro días antes de la implantación de la deslorelina, el estro post implante apareció en el 10 % de las 10 perras tratadas. Se realizó, también, un seguimiento de tres de las hembras con propósitos de cría, y se reveló que el primer ciclo estral espontáneo post tratamiento fue anovulatorio, demostrado por las concentraciones basales de progesterona (P_4). Subsecuentemente, las tres perras presentaron un ciclo ovulatorio normal luego de un corto intervalo interestro (< 4 meses; 29).

Dos estudios clínicos tuvieron como objetivo testear la eficacia de los tratamientos con agonistas de liberación prolongada para posponer la pubertad en perras (30,31). En uno de ellos, 18 perras prepúberes de seis camadas se implantaron aleatoriamente con deslorelina (9.4 mg sc) o con un placebo a la edad de cuatro ó siete meses. Ninguna de las cachorras más jóvenes, y todas las de mayor edad exhibieron celo post implantación una a dos semanas luego de la implantación (31). En el otro estudio veinte hembras beagle prepúberes de cuatro a cinco meses de edad, hermanas de camada, recibieron una implantación quirúrgica a base de azagly-nafarelina (18 mg sc, *Gonazon CR*, Intervet Pharma R&D, Beaucauze, Francia) o un placebo y se observaron durante un año. Las perras placebo alcanzaron la pubertad a los 11.9 meses, mientras que ninguna de las perras tratadas con el agonista manifestó celo u ovuló durante todo el tratamiento. No se presentaron efectos colaterales relacionados al peso corporal ni al crecimiento de los animales. Luego de la remoción quirúrgica del implante, las perras tratadas alcanzaron la pubertad de forma no sincronizada, observándose ésta entre los 18 y 22 meses de edad. En estas hembras se hicieron seguimientos de la P_4 sérica en relación con la ovulación demostrando que esta última y el cuerpo lúteo se comportaron normalmente (30).

En un estudio inicial realizado en perros machos, se administró un agonista de GnRH formulado en microesferas que proveía una liberación diaria de 100-200 mg de la droga. Esto causó un aumento temporario de la concentración de testosterona (T) plasmática por unos pocos días, seguido por una disminución de los valores durante aproximadamente 150 días. El tamaño de la próstata disminuyó en paralelo con los valores de T (32).

En otro ensayo en machos, años más tarde, se utilizó acetato de leuprolide (1 mg/kg) micro-

encapsulado en una única inyección subcutánea logrando una disminución del volumen de eyaculado. También se presentaron morfoanomalías espermáticas dentro de las ocho semanas de comenzado el tratamiento y el efecto persistió por seis semanas. Endocrinológicamente hubo un incremento inicial de los niveles plasmáticos de T y LH, seguidos por una declinación de éstos por debajo de los valores normales que persistió por siete semanas. Veinte semanas post tratamiento todos los perros retornaron a una normal espermatogénesis (27).

En un estudio más reciente, se implantaron 30 perros con diferentes dosis de acetato de deslorelina (3, 6 y 12 mg). Once de ellos se reimplantaron antes o después de terminado el periodo de supresión testicular. En todos los perros las concentraciones séricas de T declinaron a menos de 1 ng/ml en un promedio de 17 días, y permanecieron alrededor de esos niveles entre los tres meses y los 2.7 años. La duración del efecto supresor demostró ser dosis dependiente, habiendo a su vez variaciones entre los individuos. Se retornó a las condiciones iniciales de circunferencia escrotal, concentración de T, calidad seminal y fertilidad en todos los casos (28). El uso del mismo implante en cinco perros a dosis de 0.5-1 mg/kg reveló una disminución significativa de la concentración de T y el tamaño prostático por 32-48 semanas (33).

El mismo año, se aplicaron implantes conteniendo 6.6 mg de busarelina a seis perros machos, la concentración sérica de T y estradiol aumentó un 76.7 % por dos a cuatro días y luego descendió por debajo de niveles basales dentro de los 15 días de la implantación continuando en este nivel por 233 días. El tamaño testicular y prostático también se redujo en forma reversible, y no se pudo recolectar semen a partir de los 21 días después de la implantación (34).

Se obtuvieron resultados similares en cuatro perros mestizos tratados con implantes subcutáneos de deslorelina (6 mg). Las concentraciones plasmáticas de T y LH fueron indetectables después de 21 y 27 días, el volumen testicular cayó un 35 % con respecto a los valores pre tratamiento luego de 14 semanas, y no se pudieron recolectar eyaculados hasta seis semanas post tratamiento. Las concentraciones de T y LH se recuperaron 44 a 51 semanas postratamiento respectivamente, alcanzando el rango normal después de las 52 semanas. Las características del semen se recuperaron por completo 60 semanas después de la implantación, también la histología prostática y testicular (35).

El acetato de deslorelina se encuentra actualmente comercialmente disponible en Australia, Nueva Zelanda y Europa como un dispositivo de liberación lenta conteniendo 4,7 y 9,4 mg en una matriz biodegradable, con una eficacia de

seis y doce meses de duración, respectivamente. Sus aplicaciones se extienden a contracepción, hiperplasia prostática benigna y comportamiento anormal en el macho (36). Se demostró, también, que la colocación seriada de implantes en machos no causa efectos colaterales ni disminuye la eficacia de la medicación. Los perros se reimplantaron cuatro veces con acetato de deslorelina 4.7 mg consecutivas con intervalos de seis meses, retornando a la normal esteroideogénesis luego de terminado el tratamiento (31).

En un estudio realizado el año pasado, se distribuyeron 20 perros machos en 5 grupos, de los cuales cuatro recibieron un implante de 6 mg de deslorelina, mientras que el grupo control recibió un implante placebo. A los 15, 25, 40 y 100 días post implantación se les administró GnRH natural, y un día después, LH. Se observó que la administración de GnRH 15 días post implante provocó un aumento significativamente menor de LH y T comparado con el grupo control, y que, directamente no hubo respuesta de estas hormonas cuando la GnRH se aplicó el día 100 post implante. La administración de LH demostró un patrón hormonal similar. Se explica lo ocurrido por la desensibilización de los receptores no solo de los gonadotrofos hipofisarios sino también de las células de Leydig (37).

ANTAGONISTAS

Los datos concernientes al uso de los antagonistas de GnRH en caninos son muy limitados. El efecto de los antagonistas en estas especies fue descrito por primera vez hace dos décadas atrás, cuando se encontraron disponibles los primeros compuestos (15, 38). Así en uno de los primeros estudios, una inyección única (2 mg/kg) o inyecciones diarias (300 µg/kg) durante 7 a 14 días de un antagonista de segunda generación, el detirelix, suprimió la progresión del ciclo estral y ovulación en perras. El ciclo estral se pospuso por 23 +/- 1 días (15). El mismo protocolo farmacológico interrumpió la fase lútea media en hembras caninas preñadas y vacías. En las primeras, la preñez terminó por reabsorción o aborto (38).

Luego de un intervalo de 20 años, aparecieron algunos reportes en caninos describiendo el efecto de antagonistas de tercera generación, como el acyline (39, 40). El acyline es un antagonista recientemente desarrollado, que demostró, en otras especies, suprimir la concentración de gonadotrofinas durante dos semanas luego de una única aplicación (11, 12). El acyline además, es más potente y de mayor duración que otros antagonistas de tercera generación, como el Nal-Glu, Nal-Lys, cetrotrelis y teverelil (12, 41).

En una presentación preliminar, se reportó el efecto del acyline (110 µg/kg sc) en seis perras en proestro temprano (< de 3 días de comenzado el ciclo) con el propósito de interrumpirlo. El

resultado fue una significativa disminución del tamaño y turgencia vulvar dentro de las primeras 36 horas después de la aplicación. La descarga vaginal se redujo a cantidades mínimas y se tornó menos sanguinolenta en los primeros dos días post administración. Por su parte, la citología vaginal viró rápidamente de proestro a diestro en menos de una semana. Ninguna de las hembras presentó comportamiento de estro en ningún momento y tampoco ovuló, como lo demostró la concentración basal de P_4 12 días luego del tratamiento. El retorno al ciclo estral ocurrió $19,7 \pm 3,6$ días después de terminado el tratamiento. El primer ciclo postratamiento fue normal en todos los casos (39).

En otro reporte de los autores, se aplicaron dos dosis diferentes de acyline a 14 perras preñadas con el propósito de inducir el aborto. Con un diseño aleatorizado con grupo control se usó una dosis baja ($110 \mu\text{g}/\text{kg}$ sc) y otra alta ($330 \mu\text{g}/\text{kg}$ sc) entre los 25 y 35 días luego del primer servicio. Con excepción del grupo control, todas las perras abortaron en un promedio de $7 \pm 1,9$ y $6,4 \pm 1,3$ días pos tratamiento para la dosis baja y alta, respectivamente. La concentración sérica de P_4 declinó en los grupos que recibieron el acyline, independientemente de la dosis, no sucediendo lo mismo con el grupo control, donde se observaron niveles normales de P_4 durante todo el estudio. Ninguna de las perras presentó efectos colaterales asociados al tratamiento (13).

En estudios iniciales en perros machos, el antagonista de segunda generación detirelix (4 a $2 \text{ mg}/\text{kg}$), causó declinación de la T sérica en forma dosis y tiempo dependiente. Cuando se usó una dosis de $100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ se abolió totalmente la espermatogénesis (15). Desafortunadamente, en estos trabajos con antagonistas de las primeras generaciones, no se informaron detalles sobre efectos alérgicos en perros.

En un trabajo de los autores se probó el efecto de una única dosis ($330 \mu\text{g}/\text{kg}$ sc) del acyline sobre los parámetros testiculares caninos. Para este propósito, se trabajó con siete perros con un diseño aleatorizado y con grupo control. Los animales se estudiaron durante 8 semanas post aplicación. Se observó, en el grupo tratado con el antagonista, una disminución de la consistencia y el diámetro escrotal durante seis semanas post aplicación, y la libido y erección declinaron en las primeras cuatro semanas post tratamiento. También se vieron alterados el volumen seminal, el recuento y la motilidad espermática, todos ellos pasaron a tener valores significativamente bajos especialmente en la segunda semana post tratamiento. Estos últimos parámetros mostraron una creciente mejoría hacia el final del estudio, unas ocho semanas luego de la aplicación del acyline. El número de morfoanomalías se incrementó durante la cuarta

y sexta semana post aplicación. No se encontró tampoco ningún efecto colateral local ni sistémico atribuido al tratamiento (13).

COMBINACIÓN DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS

En presentaciones presentes de los autores se combinaron un agonista y un antagonista en el intento de evitar el efecto estimulante de los agonistas en hembras en anestro. Para este fin se aplicó el antagonista en dos tiempos distintos luego de la implantación del agonista. Se utilizaron 15 perras en un diseño aleatorizado y con grupo control, en donde un grupo recibió sólo el implante de deslorelina (10 mg sc, DA) y los otros dos la combinación con acyline ($330 \mu\text{g}/\text{kg}$ sc) simultáneamente (DA&ACY) o a las 48 horas de aplicado el implante (DA&ACY+2). La respuesta estral post implante ocurrió en todas las perras excepto una (grupo DA&ACY+2), $5,0 \pm 1,2$, $10 \pm 1,0$ y $24,2 \pm 11,7$ días después del tratamiento para DA, DA&ACY y DA&ACY+2, respectivamente. Aunque la respuesta estimulante por parte del agonista no pudo evitarse, en los grupos tratados con acyline hubo una tendencia a una aparición más tardía de la misma (42).

DISCUSIÓN

El control exógeno de la reproducción en los caninos domésticos es de gran importancia tanto en la población de mestizos vagabundos como en aquellos de razas puras. La esterilización quirúrgica resulta cara y poco práctica para su utilización masiva en animales sin dueño e inadecuada para reproductores de criaderos, en donde se necesita un control temporal de la actividad sexual. Por su parte, el control temporal de la reproducción (contracepción) se lleva a cabo en la actualidad con hormonas esteroideas, que provocan innumerables efectos adversos en esta especie (43).

En los últimos 10 años se comenzó a trabajar en el desarrollo de análogos de la GnRH, los cuales están desprovistos de los efectos colaterales de los esteroides. La castración química, que estos compuestos provocan, tiene también aplicación en el tratamiento de enfermedades hormono dependientes.

Estudios realizados en perros machos confirmaron que la administración periódica y prolongada de agonistas de GnRH, resulta eficaz y segura (31). En la hembra aún falta investigar cómo se comporta el tratamiento seriado con agonistas y los periodos de recuperación necesarios. También en la perra es necesario mejorar la combinación de los protocolos farmacológicos para evitar el estro post implantación.

El efecto inhibitorio inmediato es una ventaja que poseen los antagonistas sobre los

C. Valiente y col.

agonistas. Empero, el uso de estos productos se ve actualmente limitado por la falta de sistemas de liberación prolongada. Por ende, la aplicación de los antagonistas está circunscripta al manejo de situaciones endocrinas en las que se requiere un efecto inhibitorio rápido aunque de corto plazo.

Dada la capacidad de los antagonistas de interrumpir rápidamente cualquier etapa del ciclo estral, ejemplos de su utilización práctica son la interrupción de la preñez y del proestro. Aunque la postergación del estro después del tratamiento con antagonistas ocurre durante un lapso breve, el retorno a la ciclicidad normal se produce en un tiempo predecible. Esto último puede hacer de los antagonistas una herramienta atractiva para la biotecnología reproductiva en la especie (15, 39).

Por último, esta revisión sugiere que hay un lugar prometedor para agonistas y antagonistas en el futuro de la reproducción canina. Queda aún trabajo por hacer en cuanto a la farmacocinética, endocrinología y clínica de estos compuestos para imponer su uso con el fin de mejorar el manejo del ciclo estral, enfermedades hormono dependientes y la contracepción en general antes de que ellos puedan ser ampliamente recomendados. Disponiendo de formulaciones de análogos potentes y seguros de liberación prolongada a un costo razonable, se podrá alcanzar, en un futuro, el dominio del control exógeno de la reproducción en una de las especies domésticas que más desafío nos impone en su manejo reproductivo.

AGRADECIMIENTOS

Esta revisión y parte de los estudios aquí reportados fueron financiados por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT; PICT 38376) y la Morris Animal Foundation, USA (D06CA-003). La Med. Vet. Carla Valiente es Becaria de Iniciación y Tesista (ANPCyT-UNLP).

BIBLIOGRAFÍA

- Hull ME, Kenigsberg DJ. Gonadotropin releasing hormone: function and clinical use. *Lab. Manag.* 1987; 25:51-8.
- Jiang GC, Stalewski J, Galyean R, Dykert J, Schteingart C, Broqua P, et al. GnRH antagonists: a new generation of long acting analogues incorporating para-ureido-phenylalanines at position 5 and 6. *J. Med. Chem.* 2001; 44:453-67.
- Karten MJ, Rivier JE. GnRH analog design, structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale perspective. *Endocr. Rev.* 1986; 7:44-66.
- Tarlatzis B, Bili H. Safety of agonists and antagonists. *Expert Opin. Drug. Saf.* 2004; 3 (1):39-46.
- Chrisp P, Goa KL. Nafarelin A review of its phar-

macodynamic and pharmacokinetic properties, and clinical potential in sex hormone-related conditions. *Drugs* 1990; 39:523-51.

- Padula AM. GnRH analogues-agonists and antagonists. *Anim. Reprod. Sci.* 2005; 88 (1-2):115-26.

- Armer RE, Smell KH. Non-peptidic GnRH receptor antagonists. *Curr Med Chem.* 2004; 11 (22):3017-28.

- Weckerman D, Harzmann R. Hormone therapy in prostate cancer: LHRH antagonists versus LHEH analogues. *Eur. Urol.* 2004; 46:279-84.

- Vickery BH. Comparisons of the potential utility of LHRH agonists and antagonists for fertility control. *J. Steroid. Biochem.* 1985; 23 (5B):779-91.

- Hoffmann B, Schuler G. Receptors blockers-general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:295-312.

- Herbst KL. Gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003; 3:1-7.

- Herbst KL, Coviello AD, Page S, Amory JK, Anawalt BD, Bremner WJ. A single dose of the potent gonadotropin-releasing hormone antagonist acyline suppresses gonadotropins and testosterone for 2 weeks in healthy young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89 (12):5959-65.

- Valiente C, Corrada Y, de la Sota P, Galassi Gerez P, Gobello C. Effect of the GnRH antagonist, acyline, on canine testicular parameters. *Theriogenology* 2007; 68:687-92.

- Howles CM. The place of GnRH antagonist in Reproductive medicine. In: <http://www.reprobiomedicineonline.com>. *Reprod Biomed Online.* 2002; 50 (4 Suppl. 3):64-71.

- Vickery BH, Mc Rae GI, Goodpasture JC, Sanders LM. Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 39:175-87.

- Nestor JJ. Development of agonistic LHRH analogs. In: Vickery BH, Nestor JJ, Hafez ESE (Eds.), *LHRH and its analogues: contraceptive and therapeutics applications*. MTP Press, Lancaster, 1984. p. 3-10.

- Wright PJ, Verstegen JP, Onclin, K, et al. The suppression by progestin of oestrus responses of the bitch to the GnRH analogue deslorelin. *J. Reprod. Fertil.* 2001; 57:263-8.

- Heber D, Dobson R, Swerdloff RS, Channabasaviah K, Stewart JM. Pituitary receptor site blockade by a gonadotropin-releasing antagonist in vivo: mechanism of action. *Science* 1982; 216:420-1.

- Gordon K. Consequences cliniques de l'administration d'un antagoniste de la GnRH au cours du cycle menstruel. *J. Gynecol. Obstet. Biol.* 2004; 33:3S7-3S10.

- Fraser HM. LHRH analogues: their clinical physiology and delivery systems. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* 1988; 2:639-58.

- Murase M, Uemura T, Gao M, Inada M, Funabashi

- T, Hirahara, F. GnRH antagonist-induced down-regulation of the mRNA expression of pituitary receptors: comparisons with GnRH agonist effects. *Endocr. J.* 2005; 52 (1):131-7.
22. Bokser L, Srkalovic G, Szepeshazi K, Schally A. Recovery of pituitary-gonadal function in male and female rats after prolonged administration of a potent antagonist of luteinizing hormone releasing hormone (SB-75). *Neuroendocrinology* 1991; 54:136-45.
23. Mc Rae GI, Roberts BB, Worden AC, Vickery BH. Long term reversible suppression of estrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J. Reprod. Fertil.* 1985; 74:389-97.
24. D'Souza SS, Selmin F, Murty SB, Linkie D, Rivier J, Concannon PW, et al. Assessment of fertility in male rats after extended chemical castration with a GnRH antagonist. *AAPS Pharm. Sci.* 2004; 6 (1):E10.
25. Gonzalez-Bulnesa A, Lopez-Sebastiana A, Garcia-Garcia RM, Veiga-Lopez A, Souza CJH, McNeilly AS. Effect of the GnRH antagonists treatment on the gonadotrophin secretion, follicular development and inhibin secretion in goats. *Theriogenology* 2005; 63:83-91.
26. Lacoste D, Dube D, Trudel C, Belanger A, Belanger A, Labrie F. Normal gonadal functions and fertility after 23 months of treatment to prepubertal male and female dogs with the GnRH agonist [D-Trp6, des-Gly-NH2 10] GnRH ethylamide. *J. Androl.* 1989a; 10:456-65.
27. Inaba T, Umerhara T, Mori J, Torii R, Tamada H, Sawada T. Reversible suppression of pituitary testicular function by a sustained release formulation of GnRH agonist (leuprolide acetate) in dogs. *Theriogenology* 1996; 46:671-7.
28. Trigg TE, Wright PJ, Armour AF, Williamson PE, Junaidi A, Martin GB, et al. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible, long term suppression of reproductive function of male and female domestic dogs. *J. Reprod. Fertil.* 2001; 57:255-61.
29. Corrada Y, Hermo G, Johnson CA, Trigg TE, Gobello C. Short-term progestin treatments prevent estrous induction by a GnRH agonist implant in anestrous bitches. *Theriogenology* 2005; 65:366-73.
30. Rubion S, Desmoulins PO, Riviere-Godet E, Kinziger M, Salavert F, Rutten F, et al. Treatment with a subcutaneous GnRH agonist containing controlled release device reversibly prevents puberty in bitches. *Theriogenology* 2006; 66 (6-7):1651-4.
31. Trigg TE, Doyle AG, Walsh JD, Swangchan-Uthai T. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology* 2006; 66 (6-7):1507-12
32. Lacoste D, Labrie F, Dube D, Belanger A, Tice T, Gilley RM, et al. Reversible inhibition of testicular androgen secretion by 3-, 5- and 6-month controlled release microsphere formulation of the LH-RH agonist [D-Trp6, des-Gly-NH2 10] LH-RH ethylamide in the dog. *J. Steroid. Biochem.* 1989b; 33 (5):1007-10.
33. Ponglowhapan S, Lohachit C, Swangchanuthai T, Trigg TE. The effect the GnRH agonist deslorelin on prostatic volume in dogs. *Proceedings of the Annual Meeting Eur Vet Soc Small Anim Reprod.* 2002, Liege. p. 150 (abstract).
34. Riesenbeck A, Klein R, Hoffmann B. Down regulation, a new and reversible approach to eliminate testicular function in the dog. *Der Praktische Tierarzt.* 2002; 83:512-20.
35. Junaidi A, Williamson PE, Cummins JM, Martin GB, Blackberry MA, Trigg TE. Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reprod. Fertil. Dev.* 2003; 15:317-22.
36. Herbert CA, Trigg TE. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Anim. Reprod. Sci.* 2005; 88 (1-2):141-53.
37. Junaidi A, Williamson PE, Martin GB, Stanton PG, Blackberry MA, Cummins JM, et al. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007; 19:891-8.
38. Vickery BH, Nestor JJ. LHRH analogues, development and mechanism of action. *Sem. Reprod. Endocrinol.* 1987; 5:353-70.
39. Gobello C, Hermo G, Rodriguez R, Tortora M, Corrada T. Use of the GnRH antagonist, acyline, on estrous cycle interruption in the bitch: a preliminary report. *Theriogenology* 2005; 64 (3):13 (abstract).
40. Valiente C, Corrada Y, de la Sota PE, Blanco P, Arias D, Gobello C. Comparison of two doses of the GnRH antagonist, acyline, for pregnancy termination in bitches. *Proceedings of the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction (ICAR); 2008b, Vienna, Austria.* p. 276-277 (abstract)
41. Herbst KL, Anawalt BD, Amory JK, Bremner WJ. Acyline: the first study in humans of a potent, new gonadotropin-releasing hormone antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87:3215-20.
42. Valiente C, Hermo G, Zugak K, Garcia P, Corrada Y, Gobello C. A combination of a GnRH agonist and an antagonist at two different time points in anestrous bitches. *16th International Congress on Animal Reproduction 2008a, Budapest, Hungary.* *Reproduction in Domestic Animals* 43 (3):127 (abstract)
43. Romagnoli S, Concannon PW. Clinical use of progestins in bitches and queens: a review. In: Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C (Eds.), *Recent Advances in Small Animal Reproduction, International Veterinary Information Service, Ithaca, NY,* <http://www.ivis.org> 2003.

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). Puede obtener el original en Inglés en: <http://www.icmje.org/index.html>. Una traducción de estos requerimientos pueden ser recuperada en INTERNET en la dirección electrónica:

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

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 archivo electrónico (MS-Word 2000®) que pueden enviarse vía mail; 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 reproducción, deberán además enviarse fotografías o gráficos en formato TIF, CRD o JPG.

No son aceptables aquellos gráficos, esquemas, fotografía, tabla de excel o similares "incrustados" en el archivo de texto (word).

El costo de cada artículo será de \$ 50 (o 50 U\$S si el lugar de trabajo del primer principal proviene del exterior) hasta 5 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 sobresalientes y las conclusiones que se hayan obtenido. No superará tanto en español como en inglés las 200 palabras.

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, gráficos 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
<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html>