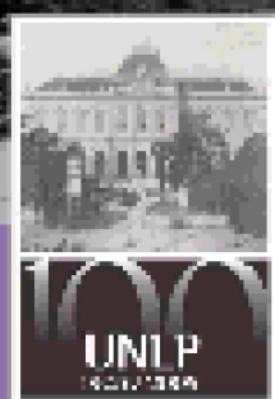


ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Volumen 29 nº 7 año 2005





Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

Autoridades

Decano

Dr. Edgardo Nosetto

Vicedecano

Bac. Reinaldo Fonrouge

Secretario Académico

Méd.Vet. Enrique Félix Costa

Secretario de Postgrado

Dra. Pilar Peral García

Secretario de Extensión Universitaria

Dr. Jorge Romero

Secretario de Ciencia y Técnica

Ing.Zoot. Fernando Noel Dulout

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

Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité Editorial

(Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi

Dr. Pablo E. Martino

Méd.Vet. Enrique Pennimpede

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 25 nº 1, 2005

Publicación de la

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

Clasificada nivel 1 (superior de excelencia) por

CAICYT-CONICET

Consultores:

L Basso (Argentina), HA Brusco (Argentina), F Capano (Uruguay), A Conigliaro (Argentina), L Estol (Argentina), J Idiart (Argentina), E Montero Gei (Costa Rica), RA Fernández (Argentina), J Lasta (Argentina), L Rodríguez Roque (Costa Rica), A Fernández Alosó (Brasil), H Tersolo (Argentina), J Zorzópulos (Argentina), E Gimeno (Argentina), C Schenk (Argentina), E Coppo (Argentina), 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 Ostroskywegman (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), A Guglielmone (Argentina), I von Landzewitsch (Argentina), N Leardini (Argentina), L León Vizcaino (España), C Larena (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).

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 1514259-0 Versión Electrónica
Registro Propiedad Intelectual 77383
Dirección postal: CC 296 (B1900AVW)
La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

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

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>)

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. Principios de siglo. Calle 60 y 118 sin asfalto.

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 modificarlos 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

BLOOD AND URINE PHYSIOLOGICAL VALUES IN CAPTIVE BULLFROG, *Rana catesbeiana* (ANURA: RANIDAE). Valores fisiológicos en sangre y orina de rana toro en cautiverio, *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae) JA Coppo, NB Mussart, SA Fioranelli, PA Zeinsteger

5-17

Comunicaciones breves

Short communications

APLICACIONES DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN EN EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO Transmission electron microscopy applications for microbiological diagnosis. SB Jurado, MA Petruccelli

18-24

DESGARRO BILATERAL DEL MUSCULO SERRATO VENTRAL EN UN GATO. Laceration of the muscle ventral serrato AM Dragonetti, FO Boccia, MM Luna, F Leone

25-28

NEOPLASIAS DEL FOLÍCULO PILOSO DEL CANINO: ESTUDIO RETROSPECTIVO (1981- 2003). Canine Hair Follicle Tumors: Retrospective Study (1981- 2003). AR Massone, MA Quiroga, ME Diessler, MA Machuca, AN del Amo, JR Idiart

29-32

Revisiones

Review

PROSTATITIS EN EL PERRO. Canine prostatitis. A Dragonetti, C Solis, A Giordano

33-39

MARCADORES GENÉTICOS PARA RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN ANIMALES DOMÉSTICOS. LOS LOCI DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) COMO GENES CANDIDATOS. Genetic Markers for Susceptibility and Resistance to Infectious Diseases in Farm Animals. Major Histocompatibility Complex (MHC). Loci as Candidate Genes. S Díaz, MV Ripoli, P. Peral-García, G Giovambattista

40-52

BLOOD AND URINE PHYSIOLOGICAL VALUES IN CAPTIVE BULLFROG, *Rana catesbeiana* (ANURA: RANIDAE)

JA Coppo, NB Mussart, SA Fioranelli, PA Zeinsteger

Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste.

ABSTRACT: Samples of healthy *Rana catesbeiana* (302 specimens, 9-21 months-old, 50% each sex) from the north-east of Argentina, were analyzed by spectrophotometry, electrophoresis, densitometry, refractometry and microscopy in order to obtain blood and urine reference values. Confidence intervals ($p < 0.05$) for PCV (28.6-31.6%), RBC (0.40-0.44 T/L), MCV (686-732 fL), hemoglobin (6.41-7.20 g/dL), MCH (151-164 pg), MCHC (22.6-24.0%), WBC (18.7-22.3 G/L), neutrophils (58.4-63.4%), lymphocytes (23.9-29.8%), monocytes (2.1-3.8%), eosinophils (4.6-7.0%), basophils (2.9-4.1%), fibrinogen (0.59-0.99 g/dL), total protein (4.19-4.49 g/dL), albumin (1.49-1.67 g/dL), globulins (2.64-2.97 g/dL), creatinine (4.09-5.56 mg/L), urea (76.1-92.4 mg/L), uric acid (11.5-15.4 mg/L), triglycerides (0.34-0.52 g/L), total cholesterol (0.56-0.67 g/L), HDL-C (0.03-0.05 g/L), LDL-C (0.34-0.44 g/L), alpha lipoprotein (6.01-8.67%), beta lipoprotein (91.3-93.9%), glucose (0.45-0.54 g/L), Na (116-121 meq/L), K (3.42-3.81 meq/L), Cl (100-116 meq/L), Ca (7.98-8.61 mg/dL), P (8.31-9.36 mg/dL), Mg (2.26-2.55 mg/dL), Fe (105-178 ug/dL), ALP (144-170 IU/L), ALT (10.0-14.8 IU/L), AST (42.8-53.4 IU/L), GGT (7.8-10.6 IU/L), LDH (99-135 IU/L), CHE (151-185 IU/L), CPK (365-500 IU/L), bleeding time (289-393s), coagulation time (452-696s), prothrombin time (76-128s), urinary density (1.0061-1.0089), and urinary pH (6.38-6.96), were obtained. Some intervals were similar to those obtained in amphibians, birds or mammals, but others were very different. Physiological variations attributable to age, sex, season, and handling and feeding system, were registered on certain parameters. The usefulness of the parameters studied to evaluate sanitary, metabolic and nutritional state on captive bullfrog should be emphasized.

Key words: *Rana catesbeiana*, blood values, coagulation tests, urine parameters

VALORES FISIOLÓGICOS EN SANGRE Y ORINA DE RANA TORO EN CAUTIVERIO, *Rana catesbeiana* (ANURA: RANIDAE)

RESUMEN: Con el propósito de obtener valores sanguíneos y urinarios de referencia, 302 muestras de ejemplares sanos de *Rana catesbeiana* del nordeste argentino (9-21 meses de edad, 50% de cada sexo), fueron analizadas por espectrofotometría, electroforesis, densitometría, refractometría y microscopía. Fueron obtenidos intervalos de confianza ($p < 0,05$) para hematocrito (28,6-31,6%), eritrocitos (0,40-0,44 T/L), VCM (686-732 fL), hemoglobina (6,41-7,20 g/dL), HCM (151-164 pg), CHCM (22,6-24,0%), leucocitos (18,7-22,3 G/L), neutrófilos (58,4-63,4%), linfocitos (23,9-29,8%), monocitos (2,1-3,8%), eosinófilos (4,6-7,0%), basófilos (2,9-4,1%), fibrinógeno (0,59-0,99 g/dL), proteínas totales (4,19-4,49 g/dL), albúmina (1,49-1,67 g/dL), globulinas (2,64-2,97 g/dL), creatinina (4,09-5,56 mg/L), urea (76,1-92,4 mg/L), ácido úrico (11,5-15,4 mg/L), triglicéridos (0,34-0,52 g/L), colesterol total (0,56-0,67 g/L), C-HDL (0,03-0,05 g/L), C-LDL (0,34-0,44 g/L), alfa lipoproteína (6,01-8,67%), beta lipoproteína (91,3-93,9%), glucosa (0,45-0,54 g/L), Na (116-121 meq/L), K (3,42-3,81 meq/L), Cl (100-116 meq/L), Ca (7,98-8,61 mg/dL), P (8,31-9,36 mg/dL), Mg (2,26-2,55 mg/dL), Fe (105-178 ug/dL), ALP (144-170 UI/L), ALT (10,0-14,8 UI/L), AST (42,8-53,4 UI/L), GGT (7,8-10,6 UI/L), LDH (99-135 UI/L), CHE (151-185 UI/L), CPK (365-500 UI/L), tiempo de sangría (289-393s), tiempo de coagulación (452-696s), tiempo de protrombina (76-128s), densidad urinaria (1,0061-1,0089) y pH urinario (6,38-6,96). Algunos intervalos fueron semejantes a los obtenidos en anfibios, aves o mamíferos, pero otros resultaron muy diferentes. Ciertos parámetros registraron variaciones fisiológicas atribuibles a edad, sexo, estación del año y sistema de manejo y alimentación. Se resalta la utilidad de los parámetros estudiados para evaluar estados sanitario, metabólico y nutricional de la rana toro en cautiverio.

Palabras claves: *Rana catesbeiana*, valores sanguíneos, pruebas coagulativas, parámetros urinarios

Fecha de recepción: 07/01/05

Fecha de aprobación: 16/05/05

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

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

INTRODUCTION

Rana catesbeiana Shaw 1802 (bullfrog) has its origin in North America. Specimens present in Argentina come from genetic lines imported from Brazil, and they are adapted to tropical climate (1). There are more than 200 bullfrog hatcheries in Argentina which produce meat marketed at a high price (2). The meat is edible and it is well-regarded because it has a scarce fat and cholesterol proportion (3). Bullfrog is characterized by its size; in captivity they can reach 300 g liveweight after 12 months. Since aging causes a decrease in the food conversion index, frogs which are to be sold later on are sacrificed when they are 6-7 months old, with approximately 170-180 g (4). *R. catesbeiana* is generally fed with balanced pellets which are similar to those elaborated for fish as its true nutritional requirements are still unknown (2).

The climate of northeastern Argentina is mainly warm and it favors hatcheries to respond the main market demand, that is, the continuity of production along the year (1). Indoor captivity is the system chosen to rear this animal as escapes would be dangerous to the ecosystem. *R. catesbeiana* is ecologically considered as an «undesirable guest», because when it settles in any lagoon, original aquatic fauna could rapidly become extinct due to its voracious appetite; cannibalism would not be unusual in this species (4). On the contrary, a natural diet based on autochthonous terrestrial anurous like *Bufo* sp. would be mainly compounded by coleopterons and hymenopterons (5).

Blood and urine composition would be influenced by peculiar physiological characteristics of the amphibian, such as metamorphosis, water and solutes skin exchange, capacity to support hemodilution and hemoconcentration, modification of urinary bladder water permeability, metabolic and enzymatic changes due to temperature, fast during winter lethargy, and others (6-9). Contrary to their close relatives (reptilians and birds) which are uricotelics, adult *R. catesbeiana* is ureotelic, although in tadpole stage it reveals an ammoniotelic pattern of nitrogen excretion (6). Frogs' blood is hyperosmotic in relation to the fresh water they live in, and urine is hyposmotic in relation to their blood (10). Corporal fluids pH varies according to body temperature, being acidified when temperature increases and *vice versa*; exchange of Na between cell and internal environment would also be altered by pH; changes of pH provokes numerous hematic and urinary modifications (10).

Except in the case of plasmatic electrolytes, texts of animal physiology reveal a manifest absence of hematic and urinary normal values from amphibians diagnostic parameters. Such parameters would be useful to evaluate health state in captive *R. catesbeiana*, which can suffer malnutrition, anemia, stress, transmissible diseases, intoxications, hemorrhagic dysfunctions, as well as inflammation and necrosis of liver, lungs, kidneys, spleen, muscles and other organs (4, 11).

The objective of this study was to obtain reference values and physiological variations from hematic and urinary diagnostic parameters in *R. catesbeiana*.

MATERIALS AND METHODS

Experimental subjects, feeding and handling

For a period of two years of studies, 302 healthy *R. catesbeiana* specimens were used. Two hundred and seventy of them were maintained on intensive systems, divided in 3 different frog farms in the north-east of Argentina. Samples from 90 frogs (9-21 months old, 50-350 g liveweight, 50% each sex), were taken in each breeding place. Thirty six per cent of the samples was taken during winter time, and 64% during the remaining seasons. No heating system during winter season was used in the hatcheries; all of them supplied food (45% protein balanced pellets, milled bovine lung, worms and fly larvas) at a ratio of 3-5% liveweight/day. The 32 remaining animals were reared on an extensive system (semi-captivity), in a closed lagoon where frogs selected exclusively "natural" food. They were adult 16-20 month-old animals from both sexes. Samples were taken during winter and all along the rest of seasons.

Sample Taking

Frogs were transported to the laboratory in thermal boxes which contained a NaCl 0.6% isotonic solution cooled with ice (2-3 °C); this procedure causes desensitization and lethargy, facilitating the animal manipulation (4). Liveweight was obtained in an electronic balance Scientech-SL, with a 0.01 g accuracy. Samples were taken in the morning (7-8 AM), after a 24 h fasting period. Blood was obtained by intracardiac puncture, carried out with syringe and needle. The sample was a venose and arterial blood mixture, since frogs, with their anatomical characteristic, possess a unique ventricle (6). Some of the blood was treated with anticoagulant (EDTA, 0.34 mol/L), another was mixed with a sodium citrate

solution (130 mmol/L) and the last one was centrifuged (700g, 10 min) to obtain serum. Urine was obtained by cystocentesis.

Laboratory procedures

Being amphibians erythrocytes nucleated cells, erythrogram parameters were obtained applying avian techniques (12). There was a previous blood hemolysis and centrifugation to eliminate erythrocyte nuclei, and hemoglobin was later evaluated by photolorimetry (Drabkin technique, using Wiener Lab reagents). Red blood cells (RBC) concentration was determined by means of Neubauer hemocytometer microscopic count using Biopur diluters, and the packed cell volume (PCV, hematocrit) was measured by capillary centrifugation (12,000 g, 5 min). White blood cells (WBC) concentration was obtained from stained smear count (Giemsa), considering corrections according to PCV value. Differential leukocyte count was carried out from stained smear (May Gründwald). Blood cells size was measured with an ocular micrometer. Erythrocyte indices such as mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and MCH concentration (MCHC), were obtained by conventional calculation.

Bleeding, coagulation and prothrombin time were evaluated respectively by Dukes, Lee-White and Quick methods (13). Fibrinogen was calculated by the difference between plasma and serum proteins (12), using an Erma-D refractometer. Urinalysis (density, pH, sediment, and chemical composition) was carried out by conventional laboratory techniques (10). Sodium and potassium were evaluated using Biopur reagents, in a Metrolab 305-D flame photometer. The separation of proteins (albumin and alpha, beta and gamma globulins, on cellulose acetate) and lipoproteins (alpha and beta, on agarose gel) was carried out by electrophoresis (13). Fractions were quantified in a Citocon CT-440 densitometer.

Serum biochemical parameters were measured in a Labora Mannheim 4010 UV-visible spectrophotometer, using Wiener, Boehringer and GT-Lab reagents, through regular laboratory methods: total protein (biuret), creatinine (alkaline picrate), urea (urease), uric acid (uricase), triglycerides (lipase peroxidase), total cholesterol (cholesterol oxidase), cholesterol linked to high density lipoprotein, HDL, and low density lipoprotein, LDL, (separation by precipitation), glucose (Trinder), chloride (mercuric tiocianate), calcium (cresolphtaleincomplexone), inorganic phos-

phorous (phosphomolybdate), magnesium (calmagite), iron (PBTS), and activities of alkaline phosphatase (ALP, phenylphosphate), alanine aminotransferase (ALT, oxoglutarate-NADH), aspartate aminotransferase (AST, aspartate-ketoglutarate), gammaglutamyl transferase (GGT, p-nitroanilide kinetic method), lactate dehydrogenase (LDH, dinitrophenylhydrazine), butyryl cholinesterase (CHE, kinetic with butyryl-thiocholine) and creatine phosphokinase (CPK, creatine-ATP) (13).

Statistical analysis

The normality of the distribution of dependent variables (quantitative continuous) was assessed using the Wilk-Shapiro test (WS). Parametric descriptive statistics included measures of central tendency (arithmetic mean, \bar{x}), dispersion (standard deviation, SD) and ranges. Fiduciary probability was assessed by confidence intervals ($CI \pm 95\%$). Correlation coefficients were obtained by the Pearson procedure. Analysis of variance (ANOVA) was calculated by one way linear model, and mean comparison was made by Tukey test. For all inferences a 5% significance was specified, below which the equality null hypothesis was rejected. Calculations were all made using the *Statistix* software, 1996 version.

RESULTS

Values obtained from hemogram, coagulation tests, and some urinalysis parameters (Table 1), as well as from serum chemical values (Table 2), showed an approximately normal distribution, which allowed the use of parametric statistics. Confidence intervals were adjusted around arithmetic means, but individual ranges were wide. Correlation between age and weight was significant ($r = 0.82$, $p = 0.02$). Physiological variations due to age, sex, season, and feeding and housing systems, were also registered (Table 3).

Chemical tests on urine revealed that 7.6% of the studied amphibians had protein vestiges (30 mg/dl) and 4% showed bilirubin traces, which coexisted with small quantities of ketones. In all cases glucose was negative. Hemoglobin vestiges were verified in 57.6% of the samples. Urobilinogen was found in 100% of the studied amphibian urinary samples, with concentrations of 0.2 mg/dl (92% of animals) and 1 mg/dl (8% of animals). Scarce quantities of erythrocytes (57.6% of cases), leukocytes (15.3%), germs (53.8%) and granular cylinders (8%), were verified in the urinary sediment. No crystals were found in these amphibians' urine.

Table 1. Values obtained in bullfrog blood and urine (n = 302).
 Tabla 1. Valores obtenidos en sangre y orina de rana toro (n = 302).

parameter	$\bar{x} \pm SD$	WS	CI±95%	range
PCV (%)	30.1 ± 5.4	0.936	28.6 - 31.6	25 - 39
RBC, concentration (T/L)	0.42 ± 0.07	0.952	0.40 - 0.44	0.31 - 0.59
RBC, length (um)	24.2 ± 1.9	0.942	23.7 - 24.8	20.5 - 27.7
RBC, breadth (um)	16.2 ± 1.3	0.939	15.8 - 16.6	13.2 - 19.5
MCV (fL)	709 ± 136	0.969	686 - 732	505 - 788
hemoglobin (g/dL)	6.80 ± 1.48	0.929	6.41 - 7.20	5.12 - 11.06
MCH (pg)	157 ± 22	0.966	151 - 164	121 - 197
MCHC (%)	23.3 ± 2.7	0.951	22.6 - 24.0	20.2 - 31.4
WBC (G/L)	20.5 ± 4.6	0.966	18.7 - 22.3	11.6 - 32.7
neutrophils, ratio (%)	60.9 ± 12.4	0.985	58.4 - 63.4	40.0 - 86.1
neutrophils, diameter (µm)	15.2 ± 2.1	0.945	14.6 - 15.7	11.3 - 20.5
lymphocytes, ratio (%)	26.8 ± 4.9	0.982	23.9 - 29.8	16.3 - 39.8
lymphocytes, diameter (µm)	13.6 ± 1.9	0.950	13.2 - 14.1	10.3 - 19.5
monocytes, ratio (%)	2.9 ± 1.1	0.942	2.1 - 3.8	1.0 - 5.0
monocytes, diameter (µm)	15.2 ± 2.1	0.949	14.7 - 15.8	10.2 - 20.5
eosinophils, ratio (%)	5.8 ± 1.6	0.935	4.6 - 7.0	2.0 - 11.9
eosinophils, diameter (µm)	16.2 ± 2.5	0.938	15.5 - 16.9	11.3 - 21.5
basophils, ratio (%)	3.5 ± 1.2	0.929	2.9 - 4.1	0 - 6.0
basophils, diameter (µm)	16.9 ± 2.8	0.931	16.1 - 17.7	11.3 - 21.5
bleeding time (s)	341 ± 67	0.956	289 - 393	240 - 490
coagulation time (s)	574 ± 98	0.973	452 - 696	360 - 788
prothrombin time (s)	102 ± 19	0.959	76 - 128	70 - 150
fibrinogen (g/dL)	0.79 ± 0.11	0.941	0.59 - 0.99	0.66 - 0.97
urinary density	1.0075± 0.0034	0.945	1.0061- 1.0089	1.0050- 1.0200
urinary pH	6.68 ± 0.71	0.939	6.38 - 6.96	5.00 - 8.50

\bar{x} : arithmetic mean, SD: standard deviation, WS: Wilk-Shapiro distributive normality test (chart coefficient: 0.947, $\alpha = 0.05$), CI±95%: 95% confidence interval, PCV: packed cell volume, RBC: red blood cells, T/L: Tera/liter, um: micrometer, MCV: mean corpuscular volume, fL: femtoliter, MCH: mean corpuscular hemoglobin, pg: picogram, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC: white blood cells, G/L: Giga/liter.

DISCUSSION

After food ingestion, changes in amphibian plasma composition would be registered (9). Other changes would also occur as consequence of circadian rhythm, caused by cortisol fluctuations (10). Both postprandial and circadian effects were excluded from the present study design due to previous fast and basal condition of samples, and also because blood extraction was carried out in uniform morning hours. Scarce regulation mechanisms and higher tolerance to hemodilution and hemoconcentration, would cause a great oscillation of blood values in frogs (6). This fact could explain the wide extent of ranges obtained in this trial. Correlation between age and weight was only moderately significant ($r = 0.82$, $p = 0.02$), probably because of the

growth delay which takes place during the winter (4).

Erythrogram

In the present study, PCV values (30.1±5.4%) were higher than those reported on *R. catesbeiana*: 22±5% (14), but they matched with the reference interval published to *Rana tigrina*: 19.5-31.8% (15). Terrestrial toads (*Bufo sp.*) would register PCV values ranging from 36 to 44% (10). The *R. catesbeiana* hematocrit would not be very different from the values found on fowls: 25-35% (10) and 22-35% (16), but it would be lower than those reported on domestic mammals: 32-45% (17) and 37-47% (10).

Erythrocyte concentration would be ex-

Table 2. Values obtained in bullfrog serum (n = 302).

Tabla 2. Valores obtenidos en suero de rana toro (n = 302).

parameter	$\bar{x} \pm SD$	WS	CI±95%	range
total protein (g/dL)	4.34 ± 0.66	0.987	4.19 - 4.49	3.05 - 5.65
albumin (g/dL)	1.58 ± 0.33	0.954	1.49 - 1.67	1.02 - 2.67
alpha-1 globulin (g/dL)	0.22 ± 0.05	0.939	0.20 - 0.24	0.11 - 0.46
alpha-2 globulin (g/dL)	0.51 ± 0.09	0.964	0.48 - 0.54	0.30 - 0.65
beta globulin (g/dL)	0.72 ± 0.16	0.983	0.68 - 0.77	0.31 - 1.14
gamma globulin (g/dL)	1.35 ± 0.28	0.953	1.28 - 1.42	1.03 - 1.99
albumin/globulin ratio	0.54 ± 0.12	0.981	0.50 - 0.58	0.25 - 0.79
creatinine (mg/L)	4.83 ± 1.22	0.961	4.09 - 5.56	1.07 - 12.3
urea (mg/L)	84.2 ± 17.5	0.935	76.1 - 92.4	30.1 - 180
uric acid (mg/L)	13.4 ± 2.89	0.964	11.5 - 15.4	1.3 - 30.2
triglycerides (g/L)	0.43 ± 0.10	0.938	0.34 - 0.52	0.02 - 1.26
total cholesterol (g/L)	0.62 ± 0.14	0.927	0.56 - 0.67	0.30 - 1.18
HDL-C (g/L)	0.04 ± 0.01	0.923	0.03 - 0.05	0.01 - 0.10
LDL-C (g/L)	0.39 ± 0.09	0.949	0.34 - 0.44	0.18 - 0.83
alpha lipoprotein (%)	7.34 ± 1.85	0.921	6.01 - 8.67	2.00 - 24.6
beta lipoprotein (%)	92.65 ± 4.62	0.930	91.3 - 93.9	75.4 - 98.0
glucose (g/L)	0.50 ± 0.12	0.982	0.45 - 0.54	0.10 - 0.98
Na (meq/L)	118.6 ± 11.2	0.943	116 - 121	99 - 144
K (meq/L)	3.62 ± 0.71	0.974	3.42 - 3.81	1.92 - 5.84
Cl (meq/L)	108.6 ± 6.3	0.921	100 - 116	103 - 116
Ca (mg/dL)	8.31 ± 1.42	0.973	7.98 - 8.61	6.0 - 11.2
P (mg/dL)	8.83 ± 1.80	0.985	8.31 - 9.36	4.1 - 13.7
Mg (mg/dL)	2.41 ± 0.49	0.972	2.26 - 2.55	1.33 - 4.09
Fe (ug/dL)	142.1 ± 29.6	0.969	105 - 178	96 - 184
ALP (IU/L)	157 ± 32	0.959	144 - 170	73 - 248
ALT (IU/L)	12.4 ± 2.6	0.941	10.0 - 14.8	7 - 20
AST (IU/L)	48.1 ± 9.3	0.947	42.8 - 53.4	23 - 80
GGT (IU/L)	9.2 ± 1.6	0.932	7.8 - 10.6	5 - 20
LDH (IU/L)	117 ± 22	0.940	99 - 135	50 - 260
CHE (IU/L)	168 ± 32	0.975	151 - 185	45 - 274
CPK (IU/L)	432 ± 85	0.937	365 - 500	156 - 919

\bar{x} : arithmetic mean, SD: standard deviation, WS: Wilk-Shapiro distributive normality test (chart coefficient: 0.947, α = 0.05), CI±95%: 95% confidence interval, HDL-C: cholesterol linked to high density lipoprotein, LDL-C: cholesterol linked to low density lipoprotein, IU/L: International Units by liter, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, GGT: gammaglutamyl transferase, LDH: lactate dehydrogenase, CHE: butyryl cholinesterase, CPK: creatine phosphokinase.

traordinarily variable in amphibians (6). RBC values found in these frogs (0.42 ± 0.07 T/L) were considerably lower than those reported on fowls: 2.5-3 T/L (10), 3 T/L (17), 2.2-5.1 T/L (12), and 2.5-3.5 T/L (16), as well as those published on domestic mammals: 6.7-9.3 T/L (10), 7-14 T/L (17), 6-13 T/L (12), and 5-18 T/L (16). Erythrocyte dimensions in this study (length x breadth = 24.2×16.2 μm) were approximately similar to those found on *R. catesbeiana*: 24×14 μm (18), but they were smaller than those reported on birds: 12×7 μm (16,17), and domestic mammals: 3.2 - 9.6 μm (12), 3.2 - 7 μm (16), and 3.9 - 7.2 μm (17). Our MCV (709 ± 136 fL) was higher than those published on fowls: 105-115 fL (10), 115-125 fL (17), and 90-140 fL (16), as well as those reported on domestic mammals: 45-65 fL (10),

19-69 fL (17), 19-70 fL (12), and 16-77 fL (16).

Hemoglobin concentration of the studied frogs (6.80 ± 1.48 g/dL) was higher than the one found on *R. catesbeiana*: 4.7 ± 0.9 g/dL (14), and *R. tigrina*: 3.87 - 6.22 g/dL (15). This respiratory pigment would be higher on toads: 10-13 g/dL (10), and birds: 8-12 g/dL (17), 7-13 g/dL (16), and 7.2 - 9.6 g/dL (10), as well as on domestic mammals: 12-16 g/dL (10), 11-14 g/dL (17), 11-15 g/dL (12), and 8-19 g/dL (16,19). Since a frog MCV would be higher compared to the one found on other species, the MCH index (157 ± 22 pg) was also higher than the values reported on birds: 29-33 pg (10), 25-27 pg (17), 33-47 pg (16), and mammals: 16-25 pg (10), 13-31 pg (17), 7-23 pg (12), and 5.2-24.5 pg (16). Our MCHC ($23.3 \pm 2.7\%$) was simi-

Table 3. Physiological variations of some studied parameters (x).

Tabla 3. Variaciones fisiológicas de algunos parámetros estudiados (x).

parameter	season		sex		age		handling	
	cold	warm	male	female	young	adult	captiv.	semic.
glucose (g/L)	0.39 ^a	0.61 ^b	0.51	0.48	0.66 ^a	0.41 ^b	0.53	0.56
urea (mg/L)	90.1 ^a	79.5 ^b	87.1	82.6	65.0 ^a	113 ^b	80.1 ^a	105 ^b
creatinine (mg/L)	4.87	4.79	5.06	4.64	3.12 ^a	7.71 ^b	5.25	5.66
uric acid (mg/L)	14.4	12.6	14.0	13.1	19.6 ^a	5.3 ^b	12.7	14.8
Na (meq/L)	117	120	116	121	129	111	128	130
K (meq/L)	3.2 ^a	4.1 ^b	3.6	3.7	2.7 ^a	4.2 ^b	3.8	3.9
Ca (mg/dL)	7.63 ^a	9.22 ^b	8.42	8.27	9.70 ^a	8.02 ^b	8.73	9.25
P (mg/dL)	7.83 ^a	9.65 ^b	8.69	8.94	10.9 ^a	5.83 ^b	10.4	9.75
Mg (mg/dL)	1.92 ^a	3.03 ^b	2.54	2.29	2.32	2.70	2.51	2.68
PCV (%)	27.2 ^a	32.9 ^b	30.0	30.3	26.4 ^a	37.2 ^b	33.8	34.5
RBC (T/L)	0.38 ^a	0.46 ^b	0.41	0.43	0.35 ^a	0.49 ^b	0.43 ^a	0.45 ^b
MCV (fL)	707	711	698	719	723	745	769	751
hemoglobin (g/dL)	5.92 ^a	7.48 ^b	6.78	6.82	5.90 ^a	7.73 ^b	7.32	7.50
MCH (pg)	154	159	155	160	174 ^a	148 ^b	159	162
MCHC (%)	22	23	23	24	23	22	23	22
WBC (G/L)	19.8 ^a	21.3 ^b	21.2	19.4	26.4 ^a	13.1 ^b	20.3	21.4
neutrophils (%)	60.2	61.5	62.8	60.7	53.7 ^a	73.4 ^b	62.4	58.7
lymphocytes (%)	24.7	29.1	25.0	27.2	40.0 ^a	20.5 ^b	29.1	28.0
monocytes (%)	2.8	3.1	3.1	2.7	4.2	2.1	2.3	3.5
eosinophils (%)	5.7	6.0	6.5	4.8	6.0	5.3	6.5	6.7
basophils (%)	3.1	3.8	2.6	4.6	3.6	2.9	3.8	3.6
ALP (IU/L)	171 ^a	144 ^b	168 ^a	146 ^b	196 ^a	102 ^b	151 ^a	135 ^b
ALT (IU/L)	14.2	11.4	11.3	12.5	12.1	9.3	12.0	10.4
AST (IU/L)	58.6 ^a	39.3 ^b	46.7	48.9	59.2	39.8	47.5 ^a	40.8 ^b
GGT (IU/L)	8.4	11.1	8.8	10.1	7.4	8.1	9.1	7.4
LDH (IU/L)	138 ^a	94 ^b	132	104	138	96	104	95
CHE (IU/L)	177 ^a	156 ^b	173	165	126 ^a	226 ^b	166	182
CPK (IU/L)	447	419	498	405	280 ^a	572 ^b	474	427
triglycerides (g/L)	0.25 ^a	0.59 ^b	0.40	0.45	0.62 ^a	0.24 ^b	0.51	0.57
tot. cholesterol (g/L)	0.59 ^a	0.66 ^b	0.65	0.60	0.76 ^a	0.54 ^b	0.65	0.71
HDL-C (g/L)	0.04	0.04	0.05	0.04	0.06	0.03	0.04	0.05
LDL-C (g/L)	0.37	0.42	0.41	0.36	0.54 ^a	0.32 ^b	0.45	0.46
alpha lipoprot. (%)	7.1	7.5	7.2	7.4	9.2 ^a	5.4 ^b	9.6	8.7
beta lipoprot. (%)	92.8	92.5	91.8	94.0	90.8 ^a	94.6 ^b	90.3	91.5
total protein (g/dL)	3.93 ^a	4.71 ^b	4.41	4.32	3.81 ^a	4.90 ^b	4.41 ^a	4.84 ^b
albumin (g/dL)	1.30 ^a	1.78 ^b	1.63	1.49	1.38 ^a	1.80 ^b	1.52 ^a	1.80 ^b
alpha-1 glob. (g/dL)	0.21	0.24	0.19	0.23	0.15	0.14	0.24	0.25
alpha-2 glob. (g/dL)	0.49	0.52	0.52	0.48	0.45	0.57	0.52	0.57
beta globulin (g/dL)	0.69	0.75	0.69	0.74	0.65 ^a	0.89 ^b	0.73	0.79
gamma glob. (g/dL)	1.32 ^a	1.75 ^b	1.39	1.33	1.17 ^a	1.52 ^b	1.40	1.43
albumin/glob. ratio	0.52	0.55	0.56	0.54	0.57	0.58	0.53	0.59

̄: arithmetic mean, captiv.: captivity, semic.: lagoon, PCV: packed cell volume, RBC: red blood cells, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC: white blood cells, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, GGT: gammaglutamyl transferase, LDH: lactate dehydrogenase, CHE: butyryl cholinesterase, CPK: creatine phosphokinase, tot.: total, lipoprot.: lipoprotein, glob.: globulin. In each line, different letters indicate significant differences (p < 0.05).

lar to those published on fowls: 21-23% (17) but lower than those found on domestic mammals: 32-37% (10), 27-39% (17), 31-35% (12), and 30-37% (16).

Nutritional anemias would be common in amphibian. *Coccidia*, as *Babesiosoma stableri*, would be located inside erythrocytes; *Lankesterella minima* would also parasite tad-

poles and adult frog RBC (11). Hematocrit would decrease in anemias, and it would increase in dehydration and postprandial stage (10). The latter would be due to spleen RBC release (9). Hematocrit and hemoglobin would diminish as a consequence of alimentary deficiencies and prolonged fast (15). Erythrocytes indicators in the nutritional state panel show a decrease owing to insufficient protein, vita-

mins B₁₂, E, niacin and folic acid intake (17). Appropriate erythropoiesis would require a continuous and balanced affluence of minerals such as Fe, Cu, Co and Se; nutritional lacks would also cause hematocrit and hemoglobin decrease (16).

Leukogram

The WBC concentration found on *R. catesbeiana* by others: 5.2±2.9 G/L (14) was lower than the one obtained in the present trial (20.5±4.6 G/L), presumably because of a depression caused by the anesthetic used in sample taking. The WBC average found on these frogs coincides with the reference intervals reported on birds: 13-22 G/L (10) and 18-30 G/L (17), but it is higher than those published on domestic mammals: 6-12 G/L (10), 5-20 G/L (17), and 7.6-16 G/L (12).

Neutrophils ratio (60.9±12.4%) was higher than those reported on avian heterophils: 23-28% (10) and 27% (17), as well as those reported on ruminant neutrophils: 33-39% (10), 25-30% (17), and 10-50% (12,16). However, this ratio was similar to those published on carnivorous and monogastric herbivores: 58-64% (10), 60-75% (12,17), and 60-77% (16).

The percentage of lymphocytes (26.8±4.9%) was lower than those obtained on birds: 58-65% (10) and 59% (17), but it was similar to those published on carnivorous: 25-37% (10), 20-25% (17), and 12-30% (12,16). On the other hand, our ratio was lower than those found on ruminant: 55-61% (10), 55-65% (17), 48-75% (12), and 50-70% (16).

The monocyte proportion found in bullfrog (2.9±1.1%) matched with the reference interval admitted for the majority of domestic mammals and birds: 2-8% (17), 1-10% (12), 0-10% (16), and 2-6% (10). The quantity of eosinophils (5.8±1.6% on *R. catesbeiana*), was also similar to the one reported on domestic mammals: 1-6% (10), 2-12% (17), 1-15% (12), and 0-20% (16), but it was higher than the one obtained on birds: 2% (17) and 2-3% (10). Frogs would have basophils (3.5±1.2%) in a slightly higher proportion than those reported on domestic mammals and birds, whose values are 0-1% and 1-2% respectively (10,17).

The mean diameter of neutrophils on the frogs of the present study (15.2 µm) was lower than the one reported on *R. catesbeiana*: 25 µm (18), but it was higher than those published for domestic mammals: 10-12 µm, and birds (heterophils): 9.6 µm (17). The bullfrog lym-

phocyte size (13.6 µm) was similar to those found on the same frog species by other authors, from 8 to 18 µm (18), but it was lower than those published on birds: 18.2 µm, and mammals: 19-25 µm (17). The bullfrog monocyte diameter (15.2 µm) was slightly bigger than those reported on hens: 12.5 µm, and mammals: 12-14 µm (17). On *R. catesbeiana* eosinophils, other authors (18) report a diameter (24 µm) that is higher than the value found in this study (16.2 µm). Eosinophils would measure 9.7 µm on birds and 10-14 µm on domestic mammals (17). Basophils diameter found in bullfrog (16.9 µm) would be slightly higher than those published for birds: 10.3 µm, and mammals: 7-15 µm (17).

Leukogram is useful to evaluate infection, inflammation, stress, neoplasias and other dysfunctions (10). Amphibian leukocytes may possess properties different to those of mammals, because temperature would greatly affect the cellular inflammatory response (20). In *R. catesbeiana* tadpoles, lymphocytes and monocytes, but not granulocytes, would participate in the inflammatory focus development (21).

Coagulogram

No previous values reported for hemostatic tests on *R. catesbeiana* were found. The obtained bleeding time (341 s = 5.7 min) was similar to those published on human beings and domestic mammals: 2-5 min (10,12,17). The whole blood clotting time (574 s = 9.6 min) was neither different to those reported on mammals: 4-15 min (12) and 1-11 min (17), as well as on human beings: 6-9 min (10), although it would be shorter on birds, from 0.5 to 2 min (17).

Bullfrog prothrombin time (102 s) was markedly longer than those admitted as normal in human beings: 11-15 s (10), carnivorous: 12-15 s (19) and 6-7 s (16), ruminants: 20-30 s (19), and mammals in general: 12 s (10) and 10-28 s (17). Concentration of fibrinogen found in this trial (0.79±0.11 g/dL) was close to normal values reported on cows: 0.60-0.70 g/dL (10,16,17), but it was slightly higher than those published on fowls: 0.1-0.4 g/dL (16) and monogastric mammals: 0.1-0.5 g/dL (19) and 0.22 to 0.39 g/dL (10).

The fundamental triad of hemostasis exploratory tests in human beings and domestic animals is constituted by bleeding, coagulation and prothrombin times, which evaluate platelet function, intrinsic pathway, and extrinsic pathway respectively (10,12). In coagu-

lative anomalies is also important to determine the plasma fibrinogen concentration, to discard eventual hypo-, dis-, and a-fibrinogenemias provoked by hemorrhagic diathesis, hepatopathies, and malnutrition (13,19). Amphibian thrombocytes would provide the necessary factors to form thromboplastin, which would transform fibrinogen into fibrin (7).

The knowledge of coagulogram values from *R. catesbeiana* could contribute to clarify coagulopathies caused by inadequate diet, intestinal malabsorption, intoxications or metabolic disturbances (stress, cholestasis, fatty liver, myelodystrophies). Hypovitaminosis K causes cutaneous hemorrhages as prothrombin time increases. Perhaps the most important bullfrog coagulopathy is the red-leg syndrome; it is a septicemia that causes skin and skeletal muscle hemorrhages, cutaneous ulcers, inflammation and necrosis of liver, spleen, and other celomic organs, emaciation, and death. Diverse intoxications and hepatopathies can lead to a deficit of fibrinogen and/or other clotting factors (4,11).

Urinalysis

Urinary density obtained on bullfrog (1.0075 ± 0.0034) was lower than those reported on mammals, from 1.015-1.045 (12) and 1.010-1.050 (19), as well as on birds, from 1.009 to 1.033 (12). The extremely low density obtained confirms that the urine of this frog is significantly hyposmotic. While the internal environment of mammals (endothermals) has an osmolarity equivalent to 0.8-0.9% saline solutions, in amphibians (ectothermals) it coincides with 0.6-0.7% saline solutions (10).

Water volumes equivalent to 30-50% of body weight can be stored in terrestrial amphibian urinary bladder, which is capable of absorbing water and salt against gradient, and cause urine hyposmolarity. Recent studies demonstrate that urinary vesical wall has the ability to regulate its water permeability. Protection against water loss is mainly based on the oliguria: urine will concentrate until it is isosmotic in relation to plasma. No amphibian can produce urine which could be hyperosmotic in relation to blood (22). Urine concentration mechanisms based on solutes resorption (until they are hypertonic to plasma), are characteristic of mammals, not amphibian (10).

Urinary pH registered in the present study was almost neuter (6.68 ± 0.71). It is acid (up to 5) on carnivores, and alkaline on herbivores, up to 8.4 (12,19). Urinary pH would be

from 5-8 on birds, diminishing up to 4.7 in aquatic species when they are submerged (12). Glucose tubular resorption would be total in this species, because its presence in urine was not verified in any of the cases; glucosuria is abnormal in all domestic animals (12,17). Urobilinogen found in the urine of the studied frogs would be normal, because it is the hemoglobin metabolism terminal product; it is habitually present in urine of both carnivorous and herbivores species (10).

On birds' urine, but not in those of mammals, it would be normal to discover vestiges of blood, bilirubin, protein and ketones (12), as it found in these frogs. Germs and cylinders presence is abnormal on mammals' urine, but the existence of epithelial (genital and urinary) cells is usual, as well as some leukocytes, such as those found in frogs. The presence of abundant phosphate, carbonate and urate crystals reported respectively in carnivores, herbivores and birds (12), contrasts with the absence of crystals in the urine of these frogs. Physicochemical characteristics verified on *R. catesbeiana* urine (low density, pH nearly neutral, absence of crystals) are in correspondence with those from species whose habitat facilitates the residues excretion without necessity of preserving great water quantities (10).

Proteinogram

Total protein frog values (4.34 ± 0.66 g/dL) were quite different to the habitual values on mammals: 6.5-7.5 g/dL (17), 5.8-7.8 g/dL (12), 5.2-8.9 g/dL (19), 6-8.5 g/dL (16), and 6-8 g/dL (10). On the other hand, they were similar to those reported on terrestrial amphibians as *Bufo sp.*: 3.6-6 g/dL (10) and birds: 2-5.5 g/dL (12), 4-5.5 g/dL (16), and 3.8-4.5 g/dL (10). In the present study, bullfrog plasma albumin (1.58 ± 0.33 g/dL) was similar to those published on toads: 1-1.9 g/dL, and birds: 1.6-2 g/dL (10), but it was lower than those reported on mammals: 3-3.9 g/dL (10), 2.8-3.2 g/dL (17), and 2.6-4 g/dL (12).

Alpha-1 globulin mean value (0.22 ± 0.05 g/dL in these frogs) was similar to those found on toads: 0.3-0.4 g/dL, fowls: 0.1-0.2 g/dL, and domestic mammals: 0.2-0.4 g/dL (10). On mammals, unified values for alpha-1 and alpha-2 globulins would be 0.9-1.3 g/dL (17) and 0.42-0.63 g/dL (12). On the studied frogs, the value of alpha-2 globulin (0.51 ± 0.09 g/dL) did not differ much from those published on toads: 0.4-0.5 g/dL, fowls: 0.3-0.4 g/dL, and mammals: 0.3-0.7 g/dL (10). Bullfrog beta globulin (0.72 ± 0.16 g/dL) was smaller than those re-

ported on toads: 0.9-1.3 g/dL (10) and mammals: 0.8-1.1 g/dL (19) and 0.9-1.8 g/dL (10), but it was higher than those found on fowls: 0.5-0.7 g/dL (10).

In the present study, frogs gamma globulin values (1.35 ± 0.28 g/dL) resulted similar to those found on toads: 1.2-1.8 g/dL, and fowls: 0.7-1.4 g/dL (10), but they were lower than those reported on mammals: 1.4-2.2 g/dL (17), and 0.9-2.7 g/dL (10). On these frogs, albumin / globulin ratio (0.54 ± 0.12) was similar to that published on toads: 0.3-0.5 (10) and ruminants: 0.42-0.76 (19), but it was lower than those reported on fowls: 0.8-1.1 and carnivorous: 1.4 (10), as well as those published on horses: 0.62-1.46 (19).

On mammals, all albumins and half of globulins that circulate in blood, are synthesized in the liver; on amphibians, this function would be carried out by the hepatopancreas (6). Plasma proteins intervene in acid-base balance, immunity, coagulation, colloid-osmotic pressure, and blood viscosity; they also transport hormones, vitamins, lipids, bilirubin, calcium, zinc, iron and copper (17,19). Albumins are excellent indicators of protein biosynthesis; they also operate as nutritional reserve of amino acids, which would be habitually exchanged between plasma and tissues, mainly in skeletal muscles (10). Proteinogram is of clinical interest because it facilitates the diagnosis towards alterations such as alimentary lacks, malabsorption, hepatopathies, inflammations, and renal, coagulative, and immunologic dysfunctions (10,12,13).

Non proteic nitrogen (NPN)

Creatinine is the muscular creatine phosphate metabolic residue. Its value on the studied amphibians (4.83 ± 1.22 mg/L) was similar to those found on toads: 3-6 mg/L (10), but it was lower than those published on birds: 5-15 mg/L (12), and mammals: 5-27 mg/L (19), 10-20 mg/L (12), and 9-19 mg/L (10).

Urea, the final product of protein metabolism, had a plasma value of 84 mg/L (0.08 g/L) on the trial frogs. This concentration was lower than those reported on mammals: 0.10-0.30 g/L (19), 0.20-0.44 g/L (10), 0.28-0.34 g/L (17), and 0.35-0.45 g/L (12). Uric acid (10,17) is the excretion residue of nucleic acids (mammals), and proteins (birds). Its value on bullfrog (13.4 ± 2.89 mg/L) was similar to those found on toads: 9-16 mg/L (10) and domestic mammals: 0-20 mg/L (19), and 5-13 mg/L (10), but it was lower than those reported

on fowls: 49-67 mg/L (10) and other birds: 25-140 mg/L (12).

These results confirm that *R. catesbeiana* is an ureotelic rather than uricotelic amphibian. Contrary to their uricotelic relatives (reptiles and birds), mature amphibian, as well as mammals, would excrete NPN in the form of urea, although in tadpole stage they would excrete ammonia (7). Exceptionally, some frogs (*Phyllomedusa sauvagii* and *Chiromantis xerampelina*) would excrete NPN in urate form, and some toads (*Xenopus laevis*) would be ureotelic during their permanency on earth, but they would become ammoniotelic when they are in water (6).

In spite of their ureotelic pattern, amphibians would retain urea to regulate their osmotic pressure. Environment salinity increase would cause urea retention because it increases the urea hepatic synthesis and decreases the urea renal excretion. This fact could be proved in *Rana cancrivora* specimens exposed to fresh water versus sea water. They registered differences in plasma osmolarity (290 versus 830 mOsm/l), urea (40 versus 350 mMol/l), sodium (125 versus 250 mEq/l) and urine flow (100 versus 1%) respectively (6). This clearly indicates that frogs utilize urea to maintain their hyperosmolarity with the environment (22).

NPN earns importance in diagnosis of renal failure, metabolic alterations and nutritional disturbances (10,13). In hatcheries, several infections, intoxications, and parasitosis (*myxosporea*) affect frogs kidneys; in the same sense, certain metabolic illnesses cause renal obstruction with NPN retention (4).

Lipidogram

Triglycerides level on the frogs of the present trial (0.43 ± 0.10 g/L) was similar to those found on toads (0.31-0.73 g/L), and it was not so different from those reported on mammals: 0.26-0.95 g/L (10). On birds, triglyceridemia would be higher, reaching 2.2 g/L (17). Bullfrog total cholesterol (0.62 ± 0.14 g/L) was higher than the one found on pigs: 0.36-0.54 g/L (19), but it was lower than those published on toads: 0.91-1.83 g/L (10), herbivore mammals: 0.77-1.73 g/L (17), carnivorous: 1.35-2.70 g/L (19), and birds: 1-2 g/L (12), 1 g/L (17), and 0.90-1.30 g/L (10).

The HDL-C value found on these frogs (0.04 ± 0.01 g/L) was lower than those published (10) on human beings (0.4-0.6 g/L), horses (0.5-0.7 g/L) and dogs (0.8-1.2 g/L).

Frogs LDL-C concentration (0.39 ± 0.09 g/L) was not quite different from those reported on dogs (0.2-0.6 g/L) and horses (0.2-0.4 g/L), but it was lower than those published on human beings: 0.9-1.6 g/L (10). In this study, alpha lipoprotein proportion (7.34%) was markedly lower than those published on fowls (67-75%), dogs (84-90%), cows (87-90%) and human beings (32-44%), and beta lipoprotein ratio (92.65%) was significantly higher than those found on dogs (10-16%), ruminants (10-13%), fowls (16-22%, with 8-12% of pre-beta lipoprotein) and human beings (42-55%, with 8-16% of pre-beta lipoprotein) (10).

Lipoprotein metabolism would reveal similar characteristics among different animal species, but it would not be exactly the same in all of them. Canine, feline, equine, ruminant and some rodents would have «HDL pattern», characterized by plasma alpha lipoprotein predominance. When these animals are fed on fatty diets, cholesterol is linked by HDL rather than LDL, avoiding noxious effects due to protective action attributable to HDL. Human beings, pigs, rabbits, marmots, and several monkey species, would respond to the «LDL pattern», because when they consume fat, they increase their beta lipoprotein and they are exposed to a major atherogenic risk (10,23). Bearing in mind that C-LDL level was higher than C-HDL level, and that alpha lipoprotein ratio was lower than beta lipoprotein ratio, frogs would join in the «LDL pattern» rather than the «HDL pattern». Similarly, other researchers found ratios of LDL higher than HDL in *Rana catesbeiana* plasma, although they also found vestiges of low density lipoprotein (VLDL), which was not detected in the present study (24).

Lipidogram values may vary due to age, heredity, food type, and diverse illnesses, such as hepatic and renal failure, malabsorption, stress, hypothyroidism, and infections. Cholesterol would rise in the initial phase of starvation (due to high fat mobilization), but in case of prolonged fast its plasma concentration tends to decrease (10,12,13,19).

Glucose

Glucose concentration on the studied frogs (0.50 ± 0.12 g/L) was similar to the one reported on toads: 0.55-0.61 g/L (10) and ruminants: 0.45-0.70 g/L (12), but it was lower than those published on birds: 2.2-2.9 g/L (10), 1.3-2.6 g/L (17), and 1.9-4.5 g/L (12). Glucemia would also be higher in monogastric mammals: 0.83-0.91 g/L (10), 0.65-1.50 g/L (19), and 0.6-1.2 g/L (12).

In amphibians, glucemia would decrease during the stage previous to winter lethargy, with an increase of hepatic glycogen; hypoglucemia would cause hypothermia. Insulin would decrease glucemia and temperature in *R. catesbeiana*; on the contrary, high temperature would increase the O_2 consumption and it would cause hyperglucemia (25). Plasma glucose would be regulated through insulin, glucagon, adrenaline, cortisol, and thyroid hormones (6,7,22). Physiologically, glucemia might vary by effects of age and physical exercise; pathologically it would alter in malnutrition, stress, and endocrine and hepatic failures (10,12,19).

Ionogram

Sodium level in the studied frogs (118.6 ± 11.2 meq/L) was similar to the levels reported on *R. catesbeiana*: 108 ± 5 meq/L (14), and other frogs of fresh water: 109 meq/L (22) and 92-125 meq/L (7). Natremia would be slightly higher on toads: 128-139 meq/L (10), birds: 131-157 meq/L (12) and 130-146 meq/L (10), and domestic mammals: 132-156 meq/L (19), 110-155 meq/L (12), and 132-146 meq/L (10).

Plasma potassium concentration would be 2.4-6.7 meq/L (12,19) and 3.3-5.1 meq/L (10) on mammals; 2.5-4.5 meq/L (12) and 5.1-6.4 meq/L (10) on birds; 3.7-6.2 meq/L on toads (10), and 2.6 meq/L (22), 3 meq/L (7) and 2.7 ± 0.71 meq/L (14) on frogs. The kalemia reported on amphibians was approximately similar to that found in this trial on *R. catesbeiana* (3.62 ± 0.71 meq/L).

Chloride value in the studied frogs (108.6 ± 6.3 meq/L) was slightly higher than those reported on frogs: 70-98 meq/L (7) and 77 ± 6 meq/L (14), and toads: 85-96 meq/L (10). However, it was similar to the values published on mammals: 94-123 meq/L (19), 88-118 meq/L (12), and 93-112 meq/L (10).

There were no great differences registered between calcium concentration on studied frogs (8.31 ± 1.42 mg/dL) and plasma calcium levels reported on the same species: 8.05 ± 0.88 mg/dL (14), other frogs: 8.4 mg/dL (22), and 9.2 mg/dL (7), toads and fowls: 7.8-9.6 mg/dL and 9.3-10 mg/dL respectively (10), and mammals: 8-12 mg/dL (12), 6.2-13.6 mg/dL (19), and 8.4-11.5 mg/dL (10).

The value of inorganic phosphorous obtained in the present study (8.83 ± 1.8 mg/dL) was higher than the one reported (14) on *R. catesbeiana* (3.3 ± 0.7 mg/dL). Nevertheless, it

was similar to those obtained on toads and birds: 6.3-8.2 mg/dL and 6.2-8.7 mg/dL respectively (10). Amphibians phosphatemia would be higher to those published on mammals: 3-6 mg/dL (17), 3-8 mg/dL (12), 2.6-6.9 mg/dL (19), and 3-5.2 mg/dL (10).

In these frogs, plasma magnesium value (2.41 ± 0.49 mg/dL) was similar to those found on bullfrog: 2.05 ± 0.35 mg/dL (14), other fresh water frogs: 3.1 mg/dL (22), and 3.9 mg/dL (7), toads and birds: 2.3-4.2 mg/dL and 2-3 mg/dL respectively (10), as well as domestic mammals: 2.5-3 mg/dL (17), 1.8-3.7 mg/dL (19), 1.8-4 mg/dL (12), and 1-3 mg/dL (10). The iron level on the studied frogs (142.1 ± 29.6 µg/dL) coincided with the reference interval reported on toads: 83-145 µg/dL (10), and domestic mammals: 100-180 µg/dL (17), 57-222 µg/dL (19), 86-193 µg/dL (16), and 93-165 µg/dL (10).

In frogs, electrolytes and water enter the organism through skin and digestive tract, being eliminated by skin, urine and feces; amphibians skin could check the osmolarity of the surrounding liquid (22). Fresh water frogs are hyperosmotic in its environment, that is the reason why they tend to incorporate water by the skin and decrease their corporal saline concentration (6). In these animals, high internal osmolarity (210-290 mOsm/L) and low external osmolarity (50 mOsm/L), could cause overhydration (the entry of water by osmotic gradient) and loss of electrolytes (diffusion by concentration gradient). Homeostasis is achieved with abundant hypotonic urine and an increase in electrolytes tubular resorption and salt cutaneous absorption (7).

Diverse illnesses can alter electrolytic homeostasis when disturbing the feedback of internal environment regulatory hormones (aldosterone, parathormone, calcitonin, vasopressin, thyroid, natriuretic factor), thus causing metabolic disturbances (10,12,13,19). Mineral nutritional deficiencies are frequent in frog hatcheries, especially related to calcium lack, which provokes osseous malformations (4).

Enzymogram

On frogs of the present study, ALP mean activity (157 IU/L) was considerably lower than that reported on birds: 2100-3200 IU/L (10), but it was similar to those published on pigs and dogs: 118-395 and 20-156 IU/L respectively (19), as well as to those found on human beings and domestic mammals: 95-185 and 90-230 IU/L respectively (10). Nonetheless, frog ALT (12.4 IU/L) was alike those from

remaining compared species, such as human beings: 3-14 IU/L (10) and domestic mammals: 8-27 IU/L (17), 3-102 IU/L (19), and 6-13 IU/L (10).

AST activity (48.1 IU/L in studied frogs) was similar to that published on ruminants: 36-45 IU/L (10), although it was considerably lower than those reported on fowls: 270 IU/L (17) and 100-350 IU/L (12), and horses: 165 IU/L (17) and 152-225 IU/L (10). Human beings and canines would register lower AST activities: 4-19 IU/L and 8-15 IU/L respectively (10).

GGT enzymatic concentration on these frogs (9.2 IU/L) was not different from those reported on human beings: 9-36 IU/L (10) and domestic mammals: 1.2-13.4 IU/L (19) and 5-21 IU/L (10). Frog LDH (117 IU/L) was lower than those published on cows: 692-1445 IU/L (19), but it matched with the reference interval on birds: 75-650 IU/L (12), canines: 45-233 IU/L (19), domestic mammals and human beings: 72-153 and 62-148 IU/L respectively (10). In 11 anesthetized *R. catesbeiana* specimens, values of LDH lower than those obtained in this study (33 ± 20 IU/L), were reported (14). The effect of anesthesia or the employment of another technique for the enzymatic assay could be the cause of such difference.

Frog CHE activity (168 IU/L) was markedly lower than in human beings: 3400-6800 IU/L (10). Higher values of this enzyme were also reported on horses (2000-3100 IU/L), and pigs (400 IU/L), although on goats and cows (110 and 70 IU/L respectively) they were lower (19). At the same time, frog CPK (432 IU/L) was higher than those published on remaining compared species, such as birds: 100-200 IU/L, and domestic mammals: 2-28 IU/L (19) and 39-85 IU/L (10).

Chronic hepatic disorders result in increased plasma ALP in most animals. During normal bone growth in young animals, a large amount of ALP is in plasma; osteopathies also results in increased plasma ALP. Recently, GGT has been found to be liver specific and is used as an indicator of hepatobiliary disease. Increased plasma AST is associated with cell necrosis of the liver and skeletal or cardiac muscle, starvation and lack of vitamin E. ALT is well established as a marker of acute hepatic damage. Injury to skeletal and cardiac muscle results in considerable increase in plasma CPK. Brain also contains great amounts of the latter. LDH is released after cellular damage to the liver, lung, muscle,

heart and kidney tissue. CHE is originated in liver, pancreas, intestinal mucosa and brain; decrease in CHE has been reported in liver failure, muscular dystrophy, chronic renal disease and organophosphate insecticide intoxication (10,12,13,19).

Physiological variations registered in present study would be attributable to combined actions of ontogeny (growing) (10), climate (winter lethargy) (8), hormonal effects (16), and handling (housing and feeding) systems (9).

The obtained data could be useful to optimize the diagnosis of sanitary, metabolic and nutritional dysfunctions in *R. catesbeiana*. It could also cooperate with the search of real nutritional requirement of this amphibian in captivity. Such knowledge may lead to an improvement in frog meat production, thus a promising future. Frog meat world consumption ranges between 30,000 and 50,000 tn/year, with an existing market for skin (leather crafts), intestine (esthetic surgery thread), liver (foie gras elaboration), and fat for cosmetic use (1,3,4).

In conclusion, some hematic and urinary physiological values from *R. catesbeiana*, were similar to those reported on other frogs (PCV, Na, K, Ca, Mg), and toads (total protein, albumin, alpha-1, alpha-2 and beta globulins, uric acid, triglycerides, glucose, P, Fe). In spite of the close phylogenetic relationship between amphibians and birds, some parameters were quite different (RBC, hemoglobin, MCV, lymphocytes, creatinine, glucose, ALP, urinary density and sediment). Several frog blood values were similar to those found in human beings (ALT, GGT, bleeding and coagulation time), and both domestic monogastric (neutrophils, lymphocytes, LDL-C, Cl, LDH) and polygastric mammals (fibrinogen, AST).

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support of SGCYT-UNNE (PI 01/04) and Wiener Lab is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Roman LR. Ranicultura. Nueva tecnología de la cría de rana toro. Anales del VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina, p. 207, 1994.
2. Carnevia D. Ranicultura, estado actual de la explotación y comercialización de ranas para consumo. Anales de las VIII Jornadas Veterinarias de Corrientes, Argentina, p. 81, 1995.
3. Pavan M. Carne de rana toro. El batracio versus la merluza. Vet Arg 1996; 13: 741-742.
4. Lima SL, Agostinho CA. A Tecnologia de Criação de Rãs, Ed Universitaria, Vicosa (Brasil). 1992; p. 288.
5. Duré MI, Kehr AI. Explotación diferencial de los recursos tróficos en cuatro especies de bufonidos del nordeste argentino. Actas Cienc & Técn UNNE 1999; 6: 17-20.
6. Goldstein L. Comparative Physiology, Ed Saunders, Philadelphia (USA). 1982; p. 454.
7. Eckert R. Animal Physiology, Ed Freeman, New York (USA). 1992; p. 683.
8. Bicego KC, Branco LG. Seasonal changes in the cardiorespiratory responses to hypercarbia and temperature in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Comp Biochem Physiol. 1999; 124: 221-229.
9. Busk M, Jensen FB, Wang T. Effects of feeding on metabolism, gas transport, and acid-base balance in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Am J Physiol. 2000; 278: 185-195.
10. Coppo JA. Fisiología Comparada del Medio Interno, Ed Dunken, Buenos Aires (Argentina). 2001; p. 297.
11. Fraser CM. The Merck Veterinary Manual, Ed Merck Inc, Rahway (USA). 1986; p. 2092.
12. Coles EH. Veterinary Clinical Pathology, Ed Saunders, Philadelphia (USA). 1989; p. 486.
13. Pesce AJ, Kaplan LA. Methods in Clinical Chemistry, Ed Mosby, Saint Louis (USA). 1990; p. 1380.
14. Cathers T. Serum chemistry and hematology for anesthetized American bullfrogs. J Zoo & Wild Med. 1997; 28: 171-174.
15. Singh K. Hematology of the common Indian frog *Rana tigrina*. III. Hemoglobin and hematocrit. Anat Anz. 1978; 143: 161-166.
16. Jain NC. Essentials of Veterinary Hematology, Ed Lea & Febiger, Philadelphia (USA). 1993; p. 417.
17. Kolb E. Fisiología Veterinaria, Ed Acribia, Zaragoza (España). 1987; p. 1115.
18. Raimon E, Ronci N, Ozzan M, Faryluk R, Borgogno P, González D, Suárez W. Caracterización citológica y citométrica de elementos formes en sangre de *Rana catesbeiana*. Monografía, Biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas, UNAM, Posadas (Argentina). 1996; p. 10.
19. Kaneko JJ. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Ed Academic Press, San Diego (USA). 1989; p. 832.
20. Dias JL, Catao-Dias, JC. Influence of temperature on the inflammatory cell response induced experimentally with a foreign body in the tail of giant bullfrog tadpoles, *Rana catesbeiana*. Tesis, University of Sao Paulo (Brasil). 1989; p. 67.
21. Zablith AC, Catao JL, Sinhorini IL. Análise ultra-estrutural da resposta celular inflamatória em

- girinos de rá touro gigante (*Rana catesbeiana*). Anais de XXV Congresso Brasileiro de Veterinária, Gramado (Brasil), comunicação ASI 004-P, 1997.
22. Wilson JA. Principles of Animal Physiology, Ed McMillan, New York (USA). 1989; p. 984.
23. Bauer JE. Metabolismo comparado de lípidos y lipoproteínas. Pet's Cienc. 1997; 13: 362-376.
24. Suzuki N, Deguchi K, Ueta N, Nagano H, Shukuya R. Chemical characterization of the serum VLDL and HDL from bullfrog, *Rana catesbeiana*. J Biochem. 1976; 80: 1241-1246.
25. Rocha PL, Branco LG. Physiological significance of behavioral hypothermia in hypoglycemic frogs (*Rana catesbeiana*). Comp Biochem Physiol. 1998; 119: 957-961.

APLICACIONES DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN EN EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

SB Jurado, MA Petruccelli

Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata

Resumen: La microscopía electrónica de transmisión (MET) puede ser usada para el diagnóstico de enfermedades de origen microbiana, aunque su principal aplicación es en investigación. La MET provee detalles ultraestructurales, los cuales son útiles para la identificación de virus, bacterias, parásitos y hongos. El mayor aporte de la MET es en el diagnóstico rápido de enfermedades víricas. Mediante este instrumento, se pueden examinar diferentes tipos de muestras clínicas: sangre, heces, orina, biopsias, fluidos corporales, etc. En este trabajo se describen los métodos utilizados para la recolección, preparación y observación de las diferentes muestras y la aplicación de técnicas de inmunomicroscopía electrónica. Si bien la MET es un método muy útil en el diagnóstico rápido y la investigación de casos nuevos de origen infeccioso, la explotación completa de su potencial requiere de una aplicación temprana y coordinada con otros procedimientos de diagnóstico. En conclusión, la MET es una herramienta valiosa de diagnóstico microbiológico tanto en medicina humana como en veterinaria y su alcance se puede incrementar con la aplicación de métodos inmunológicos.

Palabras clave: MET- diagnóstico microbiológico- muestras clínicas.

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY APPLICATIONS FOR MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS

Abstract: Transmission electron microscopy (TEM) can be an important instrument in microbiology as well as in diagnosis and research. The TEM provides ultrastructural details which are useful for the parasitological, bacteriological and mycological agents identification, but it is particularly valuable in the rapid diagnosis in viral illness. It can be applied to many body samples: blood, fecal samples, urinal, fluids, etc. Details for sample collection, preparation and examination are given. TEM can be a useful method for rapid diagnosis and investigation of new and unusual cases of infectious origin. However, full exploitation of its potential requires early and coordinated application of TEM with other diagnostic procedures. In conclusion, TEM is a valuable tool in the microbiologic diagnosis as well as in human medicine and veterinary and it can be to enhance with the application of immunologic techniques.

Key Words: TEM- microbiological diagnosis- clinical samples.

Fecha de recepción: 14/06/04

Fecha de aprobación: 20/12/04

Dirección para correspondencia: Susana Jurado. Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata CC 296 (B1900AVW) La Plata. Argentina.
E-mail: sjurado@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La microscopía electrónica de transmisión (MET) es una herramienta de gran utilidad en microbiología, tanto para fines de diagnóstico como en la investigación de las relaciones entre los agentes patógenos y el huésped. La MET es particularmente valiosa en el diagnóstico rápido de enfermedades víricas y a menudo proporciona la respuesta mucho antes que los métodos de cultivo tradicionales.

La MET tiene menor importancia en el diagnóstico tisular de infecciones parasitarias, bacterianas y fúngicas, ya que estos microorganismos son suficientemente grandes como para ser detectados con microscopía óptica. Sin embargo, el aporte de la MET al diagnóstico microbiológico abarca también el de estos microorganismos, ya que sus características ultraestructurales son las que permiten, algunas veces, clasificarlos específicamente. En parasitología, un ejemplo de esto lo constituye la identificación de ciertos protozoarios. Algunas especies de *Tetratrichomonas* halladas en el tracto urogenital de toros (1), son morfológicamente similares a *Trichomonas foetus* y por lo tanto difíciles de distinguir en el microscopio de campo oscuro (2), confundiendo el diagnóstico y dando resultados falsos positivos. Mediante la MET se pudo diferenciar con éxito estas especies de protozoarios (1). Si bien la reacción en cadena de la polimerasa también es una prueba determinante en estos casos, a veces las contaminaciones cruzadas y el costo de los reactivos la hacen poco factible. Esto sugiere que la MET es una herramienta de diagnóstico apropiada en este campo y necesaria en muchos casos.

En bacteriología, también la MET resulta ser un instrumento valioso, fundamentalmente en lo que concierne a la determinación de los procesos por los cuales una bacteria entra a la célula y de su subsecuente destino intracelular (3). La caracterización estructural de las bacterias, además, puede combinarse con inmunocitoquímica (15). Esto se realiza sobre cortes ultrafinos marcando las bacterias con anticuerpos específicos y revelando la reacción antígeno-anticuerpo con proteína A conjugada con partículas de oro coloidal. De esta manera, mediante la MET el resultado es preciso, directo y cuantificable.

Sin lugar a dudas, fue en virología donde la MET hizo el mayor de sus aportes. Los virus pueden ser observados en el microscopio electrónico con alta resolución de detalles usando un método simple y rápido como la

tinción negativa con ácido fosfotúngstico (4). Esta técnica permite realizar una identificación morfológica rápida y un diagnóstico diferencial de los distintos virus contenidos en la muestra (5).

Las técnicas de MET son de gran utilidad en el diagnóstico de las gastroenteritis víricas. El procesamiento de las muestras no es complejo ni laborioso y en pocos minutos se puede realizar una tinción negativa. La gran ventaja de la MET respecto de otras técnicas diagnósticas es que permite encontrar cualquier virus, sin que el proceso limite la identidad del agente detectado, como sucede con las técnicas inmunológicas o moleculares (6). Aunque los virus no pueden ser identificados únicamente por su apariencia ultraestructural, sí puede establecerse fácilmente el grupo al que pertenecen.

Se puede examinar un rango muy amplio de muestras clínicas: fluidos corporales, sangre, heces, orina, biopsias, agua, etc. Las inclusiones víricas o algunos virus en particular pueden ser identificados fácilmente en tejidos que ya estén fijados en formol e incluidos en parafina. Este material puede ser reprocesado e incluido en resinas y aun cuando la ultraestructura de la célula huésped esté virtualmente destruida, los virus pueden ser identificados (8).

El objetivo de este trabajo es difundir las aplicaciones de la MET en el diagnóstico microbiológico y los métodos para la recolección, preparación y examinación de los diferentes tipos de muestras.

MÉTODOS DE MET APLICADOS EN MICROBIOLOGÍA

Los estudios ultraestructurales de los microorganismos, tanto para diagnóstico como para investigación, se abordan utilizando dos de los métodos de procesamiento general para la MET:

a) la tinción negativa: para la identificación de virus y de diferentes constituyentes bacterianos (como pilis y flagelos).

b) el procesamiento para la obtención de cortes ultrafinos, (la localización intracelular de un agente vírico, como los detalles ultraestructurales de cualquier otro patógeno, puede aportar información relevante para su caracterización definitiva).

La tinción negativa es una técnica sencilla y económica y su uso se ha generalizado como técnica fundamental para contrastar muestras particuladas (7). El contraste se ob-

tiene embebiendo la partícula a observar en una sal de un metal pesado (ácido fosfotúngstico al 2%, acetato de uranilo al 4%), que perfila mínimos detalles ultraestructurales sobre un fondo oscuro; de ahí su denominación como técnica de "contraste negativo", o de tinción negativa. Siempre que se aplique esta técnica, es necesario trabajar con grillas cubiertas por un soporte o membrana plástica (formvar o colodión), para evitar que la muestra líquida se escurra entre los agujeros de la grilla. La tinción negativa se aplica al estudio de microorganismos (virus, bacterias, protozoarios), fragmentos celulares (membranas) y macromoléculas aisladas (proteínas) (8).

Para la obtención de cortes ultrafinos, las muestras previamente deben ser fijadas con glutaraldehído al 2% en "buffer" de fosfato, posfijadas en tetróxido de osmio al 1%, deshidratadas en escala creciente de alcoholes e incluidas en resinas sintéticas (Epon, Araldita, etc.). Los cortes ultrafinos obtenidos por ultramicrotomía son montados sobre grillas de 3 mm de diámetro, contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinados por MET.

Es importante mencionar que el laboratorio de MET recibe muestras potencialmente infecciosas, por lo tanto se deben tomar precauciones importantes para proteger al personal durante la manipulación de todas las muestras clínicas.

1) Procesamiento de muestras víricas:

Las muestras víricas que se derivan con mayor frecuencia para su análisis por MET son las que se presentan en fase líquida. Pueden tratarse de: a) muestras clínicas, b) sobrenadantes de cultivos celulares o c) virus purificados (cultivos celulares y suspensiones celulares).

Es importante destacar que el éxito del diagnóstico de un brote o caso nuevo comienza con la colecta de la muestra. Un muestreo insuficiente, inadecuado o impropio podría entorpecer o imposibilitar la identificación de un agente etiológico.

a) Muestras clínicas:

En fase líquida se presentan los siguientes tipos de muestras: orina, materia fecal, suero, plasma, lágrimas, líquido vesicular y líquido cefalorraquídeo. Para cada tipo de muestra existen variantes en el procesamiento para MET.

La colecta de fluidos de lesiones puede

envasarse en una aguja 26G colocada en una jeringa de tuberculina (9). Una vez puesto el capuchón de la aguja, la muestra puede ser transportada directamente al laboratorio de MET para realizar el diagnóstico rápido (Fig. 1 A). Alternativamente, la grilla que se usa en microscopía electrónica puede tocar en forma ligera el fluido vesicular, la base de la lesión o ambos; se deja secar al aire y se la transporta directamente para su examinación (Fig. 1 B). Se deberán obtener un mínimo de dos grillas por cada muestra de líquido vesicular. También pueden usarse los frotis de lesiones realizados sobre portaobjetos de vidrio, tanto para el examen en el microscopio electrónico como para el microscopio de inmunofluorescencia (Fig. 1 C). Los frotis de líquido vesicular, por ejemplo, deben ser resuspendidos y colocados sobre una grilla para poder ser observados con tinción negativa por MET. Los métodos de toque directo y frotis son útiles cuando las muestras deben ser transportadas a cierta distancia hasta llegar al servicio de MET. Las lágrimas se pueden recoger en forma similar.

La orina se clarifica por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. El "pellet" es descartado y el sobrenadante se centrifuga a 15.000 rpm durante una hora (8). El "pellet" obtenido se usa para tinción negativa.

El suero o plasma se ultracentrifuga y se procede a la tinción negativa del sedimento.

La materia fecal se resuspende en agua destilada estéril o "buffer" de fosfato para obtener una concentración de 10-20% y se centrifuga a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se descarta el sedimento y el sobrenadante se ultracentrifuga como se describió anteriormente, procediendo a la tinción negativa del sedimento. El procesamiento para ultramicrotomía (fijación, deshidratación, inclusión en resina y cortes) se puede realizar tanto en los sedimentos de los clarificados como en los sedimentos de los ultracentrifugados, sobre todo para virus cuyo análisis morfológico puede ser dificultoso por tinción negativa o cuando ésta puede dañar estructuras del virus.

b) Sobrenadantes de cultivos celulares:

Normalmente son dos los objetivos del análisis del sobrenadante de un cultivo celular. Por un lado, el estudio ultraestructural del virus cultivado y por otro lado, la búsqueda de un agente que no pudo ser detectado por los métodos virológicos habituales.

Se realiza una tinción negativa del so-

brenadante y, además, se procede a su clarificación y ultracentrifugación según se ha descrito anteriormente.

c) Virus purificados:

c1) Cultivos celulares en monocapa: las muestras se fijan *in situ* sobre su correspondiente soporte (plástico o vidrio). Se levantan las células y se centrifugan a 3000 rpm durante 5 minutos. Al "pellet" obtenido se lo lava en "buffer" de fosfato y se procede a la posfijación en tetróxido de osmio, seguido de la deshidratación, inclusión en resina y ultramicrotomía.

c2) Suspensiones celulares: se realiza la fijación en suspensión. Se fijan en glutaraldehído y se lavan en "buffer". Posteriormente, se centrifuga y el "pellet" obtenido es sometido a los pasos descritos en el apartado anterior.

2) Procesamiento de protozoos:

Las muestras clínicas que poseen protozoos no pueden ser sometidas al método de tinción negativa debido a que la cantidad de material electrondenso que penetra en el espécimen y sus componentes es muy grande. Por eso los protozoos de muestras clínicas o cultivados *in vitro* son considerados células en suspensión y procesados como virus, ajustando el protocolo para cada microorganismo en particular.

3) Procesamiento de bacterias y componentes bacterianos:

El método de tinción negativa es de particular valor para el estudio de determinadas estructuras bacterianas (como pilis y flagelos) que se encuentran en suspensión (10, 11, 12).

También es posible realizar la inclusión en resina y la ultramicrotomía de "pellets" de suspensiones bacterianas obtenidos por centrifugación y posteriormente sometidos a la doble fijación con glutaraldehído-tetróxido de osmio. De esta manera se puede analizar la ultraestructura de los diferentes constituyentes bacterianos.

Es necesario tener en cuenta que las bacterias crecidas en agar tienen diferente composición que las crecidas en suspensión. Algunas cepas de gonococos de *Neisseria gonorrhoeae* o *N. meningitidis*, poseen cápsulas cuando se hacen crecer en un agar especial, y las pierden en suspensión (3). La fijación y coloración con azul alcian 0,5 % y aldehído glutárico 3 % sobre la superficie del agar antes de la manipulación de los microorganismos son importantes variables para la demost-

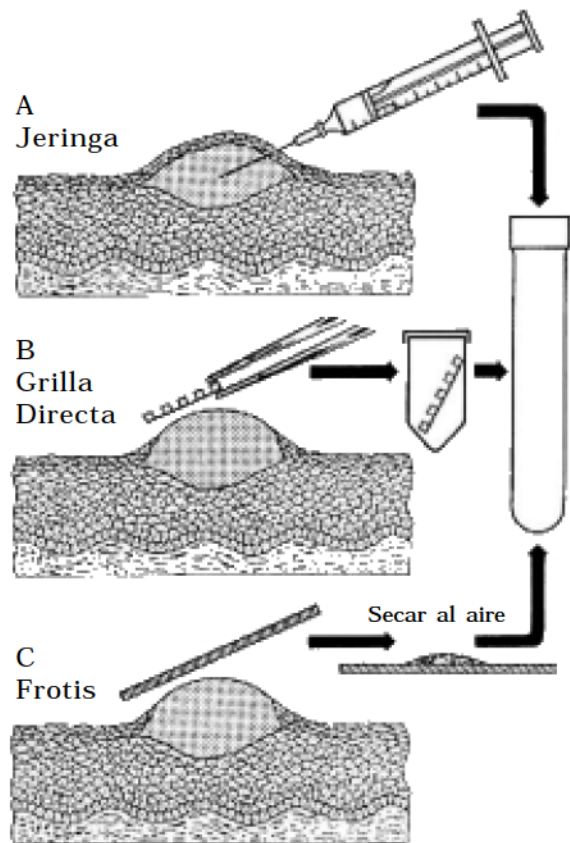


Figura 1. Tres métodos para la colecta de fluido vesicular y ampollas para el diagnóstico mediante MET.

A. El contenido de una vesícula es envasado en una aguja 26 G unida a una jeringa de tuberculina. B. Después de abrir la ampolla, se toca el fluido con una grilla y se deja secar al aire (microscopía electrónica directa). C. Se pone un portaobjetos de vidrio sobre una lesión sin cubierta y se prepara un frotis. Luego las muestras se colocan en contenedores rígidos para su transporte al laboratorio de microscopía electrónica (9).

Figure 1. Three methods for efficient collection of vesicular and blister fluids for diagnostic electron microscopy. A. The contents of a vesicle are collected into the barrel of a needle. B. After the blister is opened, a coated electron microscope grid is touched to the fluid and air-dried (direct electron microscopy). C. A glass microscope slide is touched directly to an unroofed lesion and a smear prepared. Samples are then placed in rigid containers for transport to the electron microscope laboratory (9).

tración morfológica de las cápsulas intactas. Esto es importante de lograr ya que el grosor de la cápsula diferencia a unas cepas de otras.

También es posible el estudio mediante MET de colonias bacterianas no homogéneas (micoplasmas y colonias-L) (4). Bonnová y Rýc (1976) desarrollaron un método que consiste

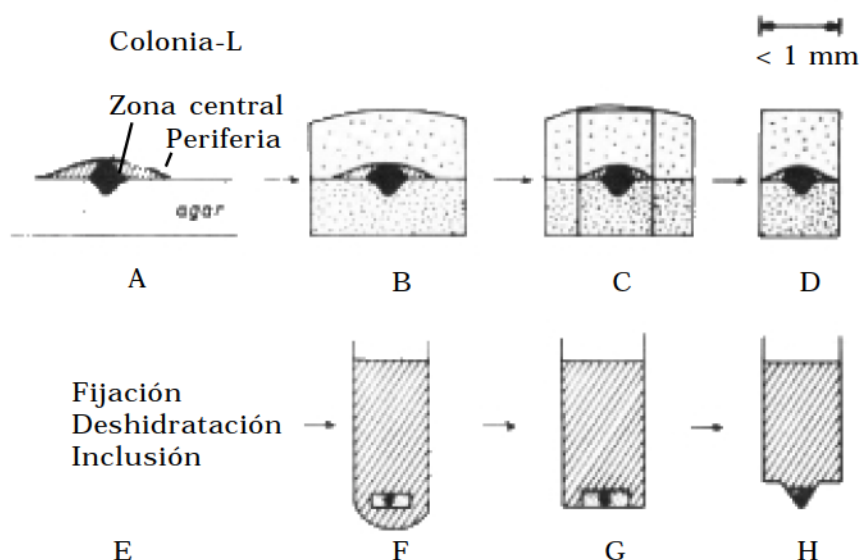


Figura 2. Diagrama esquemático de la inclusión y orientación de las colonias bacterianas (14).

Figure 2. Schematic diagram of embedding and orientation of bacterial colonies (14).

en cortar un trocito del agar que contiene la colonia (Fig. 2 A). A este trocito se lo cubre por completo con agar frío a una concentración más baja que la del medio de cultivo (Fig. 2 B). Se aplica un escalpelo caliente a los lados del trozo de agar a fin de unir ambas capas. Cada colonia bacteriana permanece intacta en el centro de cada bloque y no es dañada por el calor. Con una hoja de afeitar se recorta el bloque de agar conteniendo la colonia y posteriormente se somete a la fijación, deshidratación e inclusión en resinas (Fig. 2 E-H). Después de la polimerización el bloque es tallado, cortado y observado mediante MET (8).

Inmunomicroscopía electrónica:

Si bien la inmunomicroscopía electrónica (IME) puede ser usada para el diagnóstico de virus y bacterias (15), su principal aplicación es en investigación. En microbiología, la correcta localización de los antígenos, principalmente en estructuras de pequeño tamaño como los virus o componentes bacterianos como los pili, requiere un contraste alto y una buena resolución. La IME, utilizando antisueños o anticuerpos monoclonales, incrementa la sensibilidad de la MET (6) y es una técnica mundialmente utilizada para la detección de agentes patógenos.

Los métodos empleados en IME, ya sean de tipo experimental o diagnóstico, son: los métodos de pre-inclusión (o marcado previo al procesamiento de las muestras) y los métodos de pos-inclusión (o marcado posterior al procesamiento de las muestras).

Las técnicas pre-inclusión se utilizan básicamente para localizar antígenos externos. Son ideales para el estudio de la gemación viral desde la célula huésped (16); para bacterias en suspensión y para localizar antígenos de superficie en protozoos y hongos. Son una de las técnicas de IME más sensibles ya que los microorganismos son inmunomarcados antes de ser incluidos en resina y permite trabajar con muestras fijadas o sin fijar (en este último caso deberá trabajarse a 4 °C para evitar la degradación y, en consecuencia, la mala calidad ultraestructural). Para fijar se utiliza paraformaldehído, glutaraldehído y tetróxido de osmio. Luego, las muestras se incluyen en resina, se procesan para ultramicrotomía y, finalmente, se observan. Esta técnica preserva en óptimas condiciones la ultraestructura de las muestras y permite una buena localización de los antígenos de superficie.

Un problema en el uso de esta técnica es que la adición de anticuerpos a células en suspensión hace que éstas se aglutinen, interfiriendo en la inmunomarcación de los microorganismos más profundos. Este inconveniente puede resolverse usando diluciones de anticuerpos, lo cual no induce la aglutinación aunque reduce el valor de la inmunomarcación (17).

Las técnicas de pos-inclusión se basan en la obtención de secciones ultrafinas de la muestra y sobre éstas se realiza la inmunodetección de los antígenos a estudiar. Por lo tanto las muestras son primero fijadas, incluidas, cortadas y montadas sobre grillas antes de

hacer la inmunomarcación. Este método permite la localización de antígenos de superficie e intracelulares.

Las técnicas de inmunomarcación pos-inclusión aplicadas en microbiología permiten identificar y especificar el género y la especie de los agentes infecciosos presentes en las muestras biológicas, siempre que se disponga de los anticuerpos específicos. Con este método se estudiaron, por ejemplo, los procesos de aglutinación y maduración del virus de la inmunodeficiencia humana (16). Se lo utilizó para examinar la co-expresión de las proteínas adhesivas y polisacáridos de la cápsula de *E. coli* (18), como así también para localizar los principales inmunógenos en los estadios de taquizoito y bradizoito de *Toxoplasma gondii* en el encéfalo de pacientes inmunocomprometidos (19).

CONCLUSIONES

El uso de la MET como herramienta de diagnóstico microbiológico disminuyó en los comienzos de la década del '90, coincidentemente con la introducción de una amplia variedad de técnicas modernas de diagnóstico basadas en la biología molecular y la genética (20).

Comparado con otros métodos de diagnóstico, la MET los supera con respecto a la rapidez con que permite detectar e identificar tanto a los agentes infecciosos nuevos como a aquellos no considerados por el clínico. Sin embargo, una explotación completa de su potencial requiere de una aplicación temprana y coordinada de la MET con otros procedimientos de diagnóstico (9).

El diagnóstico mediante la MET no necesariamente es costoso o difícil de realizar si se ejecuta dentro de una red diagnóstica, trabajando en colaboración con otros laboratorios, como biología celular o patología (21).

La MET es un importante instrumento de diagnóstico de enfermedades virales debido a su rápido procesamiento. Uno de los principales beneficios es la identificación de virus gastrointestinales como adenovirus, calicivirus, astrovirus y coronavirus, así como de otros virus para los cuales no se tiene disponibilidad de pruebas diagnósticas comerciales o aquellos que no son cultivables (6, 22). Por esta razón, la detección de virus entéricos mediante la MET es esencial para realizar un diagnóstico epidemiológico correcto de las infecciones gastrointestinales no bacterianas (23).

La aplicación de técnicas rápidas, como

la tinción negativa, es fundamental para el establecimiento de la taxonomía vírica y en consecuencia, para el diagnóstico. Este se constituye en el método de elección para la identificación rápida de virus en muestras clínicas procedentes de infecciones emergentes de etiología desconocida (20). La MET es muy útil también en la detección rápida de infecciones virales colaterales en pacientes inmunocomprometidos (24).

Por todo lo expuesto, la utilidad de la MET en el diagnóstico de enfermedades víricas es indiscutible. Esto permitió el desarrollo de técnicas de procesamiento, adaptadas tanto al microorganismo en estudio como a las muestras clínicas del paciente afectado (25). Si bien la utilidad de la MET en otros campos de la microbiología es menos importante, existe una diversidad de infecciones cuyo diagnóstico requiere de la MET para la identificación del microorganismo implicado (1, 13, 26). También puede ser un método muy útil en el diagnóstico rápido y la investigación de casos nuevos e inusuales de origen infeccioso.

La MET, combinada con información clínica es, en muchos casos, suficiente para realizar un diagnóstico presuntivo o descartar infecciones más serias e iniciar un tratamiento sin esperar el resultado de otras pruebas (9).

En conclusión, la MET es un instrumento valioso de diagnóstico microbiológico tanto en medicina humana como en veterinaria y su alcance se puede mejorar con la aplicación de métodos inmunológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cobo ER, Campero CM, Mariante RM, Benchimol M. Ultrastructural study of a tetratrichomonad species isolated from prepuccial smegma of virgin bulls. *Vet Parasitol.* 2003; 117 (3): 195-211.
2. Taylor MA, Marshall RN, Stack M. Morphological differentiation of *Tritrichomonas foetus* from other protozoa of the bovine reproductive tract. *Br Vet J.* 1994; 150 (1): 73-80.
3. Griffiths G, Lucocq JM, Mayhew TM. Electron microscopy applications for quantitative cellular microbiology. *Cell Microbiol.* 2001; 3 (10): 659-668.
4. Brenner S, Horne, RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta.* 1959; 34: 103-110.
5. Gelderblom HR, Hazelton PR. Specimen collection for electron microscopy. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6 (4): 433-434.
6. Buesa Gómez J, López-Andújar P, Rodríguez Díaz, J. Diagnóstico de las infecciones víricas gastrointestinales. *Control de Calidad. SEIMC* [citado

- 2003]. Disponible desde: http://www.seimc.org/control/revi_viro/pdf/rotavir.pdf.
7. Carrascosa JL, Castón JR. Tinción negativa. En: Piqueras JR y Megías Megías L, editores. Manual de técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas. Universidad de Granada (España). 1998. p. 21-30.
8. Hayat MA. Basic techniques for transmission electron microscopy. Academic Press (London). 1986, p. 232-264.
9. Hazelton PR, Gelderblom HR. Electron microscopy for rapid diagnosis of infectious agents in emergent situations. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9 (3): 294-303.
10. Thornley MJ, Horne RW. Electron microscope observations on the structure of fimbriae, with particular reference to *Klebsiella* strains, by the use of the negative staining technique. *J Gen Microbiol.* 1962; 28: 51-56.
11. Duguid JP. Fimbriae and adhesive properties in *Klebsiella* strains. *J Gen Microbiol.* 1959; 21: 271-286.
12. Glauert AM, Erridgek D, Horne RW. The fine structure and mode of attachment of the sheathed flagellum of *Vibrio metchnikovii*. *J Cell Biol.* 1963; 18: 327-336.
13. Hendley JO, Powell KR, Salomonsky NL, Rodewald RR. Electron microscopy of the gonococcal capsule. *J Infect Dis.* 1981; 143 (6): 796-802.
14. Bonnová E, Rýc M. A method of orientation of embedded bacterial colonies prepared for ultrathin sections. *Folia Biol (Praha).* 1976; 22 (5): 366-367.
15. Beesley JE, Betts MP. Virus diagnosis: a novel use for the protein A-gold probe. *Med Lab Sci.* 1985; 42 (2): 161-165.
16. Katsumoto T, Asanaka M, Kageyama S, Kurimura T, Nakajima K, Noto A, Tanaka H, Sato R. Budding process and maturation of human immunodeficiency virus examined by means of pre- and post-embedding immunocolloidal gold electron microscopy. *J Electron Microsc.* 1990; 39 (1): 33-38.
17. Beesley JE. Electron microscopic immunocytochemistry in microbiology. En: Polak, JM y Priestleys, JV (Eds.). *Electron microscopic immunocytochemistry. Principles and Practice.* Oxford University Press. 1992. Chapter 10, p. 223-237.
18. Coyne MS, Arunakumari A, Pankratz HS, Tiedje JM. Localization of the cytochrome cd1 and copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *J Bacteriol.* 1990; 172 (5): 2558-2562.
19. Capron A, Cesbron-Delauw MF, Darcy F. New molecular approaches to the diagnosis and prevention of toxoplasmosis. *Bull Acad Natl Med.* 1990; 174 (3): 387-394.
20. Biel SS, Gelderblom HR. Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *J Clin Virol.* 1999; 13 (1-2): 105-19.
21. Biel SS, Madeley D. Diagnostic virology-the need for electron microscopy: a discussion paper. *J Clin Virol.* 2001; 22 (1): 1-9. Review.
22. Miller SE. Use of electron microscopy to diagnose viral illness. Review article. Disponible desde: <http://www.ktshrc.edu.sa/annals/1/1/96-172ra.html>.
23. Utagawa ET, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T. Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J Virol Methods.* 2002; 100 (1-2): 49-56.
24. Miller SE, Howell DN. Viral infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Electron Microsc Tech.* 1988; 8 (1): 41-78.
25. Cuevas L, Herrera MI. Métodos de aplicación en microbiología. En: Piqueras JR y Megías Megías L, editores. Manual de técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas. Universidad de Granada (España). 1998. p. 233-260.
26. Boldorini R, Tosoni A, Mazzucco G, Cernuschi M, Caramello P, Maran E, Costanzi G, Monga G. Intracellular protozoan infection in small intestinal biopsies of patients with AIDS. Light and electron microscopic evaluation. *Pathol Res Pract.* 1996; 192 (3): 249-259.

DESGARRO BILATERAL DEL MUSCULO SERRATO VENTRAL EN UN GATO

AM Dragonetti¹, FO Boccia^{1, 2}, MM Luna³, F Leone³

¹Cátedra de Clínica de Pequeños Animales. ²Patología Quirúrgica y Podología

³Servicio de Cirugía

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

Resumen: La presentación es informar al profesional veterinario sobre el desgarro bilateral del músculo serrato ventral, una afección de escasa incidencia en la clínica de pequeños animales, a través de la descripción detallada de un caso clínico y su resolución quirúrgica exitosa.

Palabras clave: gato, músculo serrato ventral, escápula, desgarro, luxación.

LACERATION OF THE MUSCLE VENTRAL SERRATO

Abstract: The presentation of the work has as objective to inform the veterinary professional on an affection of scarce incidence in the clinic of the small animals, like is the bilateral laceration of the muscle ventral serrato, describing a clinical case in detail, its successful surgical resolution and carrying out an upgrade of this illness.

Key words: cat, muscle ventral serrato, scapula, laceration, luxation.

Fecha de recepción: 23/11/04

Fecha de aprobación: 01/04/05

Dirección para correspondencia: Ana María Dragonetti, Cátedra Clínica de Pequeños Animales. C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: ante@argentina.com

INTRODUCCIÓN

Dentro de las estadísticas bibliográficas de la ruptura, desgarró, luxación o avulsión de los músculos, la del serrato ventral es de presentación infrecuente. La aparición bilateral de esta lesión en un gato siamés conforma un caso clínico interesante para su descripción, como así también, realizar consideraciones sobre esta enfermedad

ASPECTOS ANATÓMICOS

El músculo serrato ventral está constituido por dos porciones, la cervical y la torácica, es muy vigoroso, tiene forma de abanico, cubriendo la mitad caudal de la pared lateral torácica e insertado en la cara medial proximal de la escápula (1).

El músculo serrato ventral cervical se origina en las apófisis transversas de las cinco últimas vértebras cervicales, mientras el músculo serrato ventral torácico nace hacia la mitad de la longitud de las primeras siete u ocho costillas. Los haces musculares convergen para insertarse en las fascias serratas de la escápula.

La porción cervical y torácica forman una lámina continua del músculo.

Es el soporte muscular más importante de la escápula y del miembro anterior (2) y tiene, además, la función de descender la escápula (3).

CASO CLÍNICO

Ingresó al consultorio externo un gato Siamés, macho, de 9 años de edad, cuyo propietario manifestó que dos días atrás tuvo una pelea con un perro y que como consecuencia de la cual el animal, al caminar, mostraba una manera poco convencional de mover los miembros delanteros. En el examen físico se pudo observar que sus funciones vitales: temperatura, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca y pulso eran normales.

En el examen del aparato locomotor durante el andar, mostró asimetría en sus miembros anteriores con excesiva elevación de las escápulas y una tendencia a descender la parte anterior del cuerpo. En estación y principalmente en posición de sentado, se apreció la elevación de ambas escápulas (Fig. 1). A la palpación en la zona interescapular se apreció una tumefacción de consistencia firme con moderado dolor. Colocado el animal en decúbito lateral, se tomó con la mano a la altura del codo el miembro anterior que está hacia arri-

ba y se realizó un movimiento de rotación en dirección cráneo-caudal, teniendo cuidado de no mover la articulación escápulo-humeral. Al realizar esta maniobra, la escápula correspondiente se elevó exageradamente del lado posterior de la misma, desviándose hacia fuera, manifestando una separación de la escápula de la pared torácica, con evidentes lesiones de las estructuras musculares (avulsión escapular) (Fig. 2). Se ejecutó la misma maniobra semiológica con el otro miembro, apreciándose el mismo problema.

Se realizó un estudio radiológico de la zona para detectar la posibilidad de una fractura.

Siendo negativo el resultado y teniendo en consideración el examen clínico, se diagnosticó desgarró bilateral del músculo serrato ventral.

Se derivó entonces al animal al Servicio de Cirugía para llevar a cabo la correspondiente intervención quirúrgica.

Procedimiento quirúrgico

Se colocó al animal en decúbito lateral, rasurando ambas regiones escapulares para preparar el área quirúrgica asépticamente.

El abordaje se realizó con una incisión en la piel a nivel del ángulo caudal de ambas escápulas con el fin de reparar los tejidos blandos desgarrados (fascia torácica, músculos serrato ventral, romboides y dorsal ancho) (4), para lo cual se utilizó nylon monofilamento 2/0 (*). Se procedió a reubicar y fijar las escápulas en su ubicación normal, para lo cual se palpó el ángulo caudal de la escápula elevándose una pequeña porción del músculo teres mayor (5). Se efectuó una perforación utilizando un clavo Steiman de 2 mm con mango de Jacobs, a 0,5 cm del borde escapular (fosa infraespinosa) y luego se pasa un lazo de nylon 80 por debajo del periostio tomando la sexta costilla y colocando el clamps de acero inoxidable en lateral como reemplazo del nudo tradicional. Es importante tener en cuenta no producir neumotórax al realizar este procedimiento (2). El tejido subcutáneo, se sutura de manera habitual con material absorbible (Poligalactina 910) 3/0 (**), mientras que la piel de ambas escápulas, se suturó con un patrón discontinuo de puntos simple con nylon monofilamento 3/0 (*) (2) (5).

(*) Ethilon-Jhonsons & Jhonsons

(**) Vicryl-Jhonsons & Jhonsons



Fig. 1. Elevación de ambas escápulas
Fig. 1. Elevation of both scapulas



Fig. 2. Avulsión escapular
Fig. 2. Scapula extraction



Fig. 3. Posición normal de las escápulas a los 30 días de operado.
Fig. 3. Scapula's normal position: 30 days after surgery.

La finalidad de este procedimiento quirúrgico es estabilizar la sinsarcosis logrando que ambas escápulas desciendan a su posición normal retomando su funcionalidad.

Se le administró como antibióticoterapia profiláctica amoxicilina intramuscular (IM), 20 mg/kg, antes de la intervención quirúrgica.

Cuidados postoperatorios

Amoxicilina vía oral (VO), 250 mg cada 8 horas, durante 7 días. La analgesia postquirúrgica se realizó con ketaprofeno 1 mg/kg/diarios, durante 3 días. Como coaptación externa no se utilizó el vendaje de Velpeau, como es de uso corriente en las lesiones unilaterales. Se colocó al animal en jaula por tres días, para continuar luego con una actividad reducida, evitando los saltos, durante 15 días.

El control se efectuó a la semana, retirando la sutura de piel, y se observó una leve claudicación en el miembro derecho, que disminuye en los días posteriores. A los 30 días apoyó sin dificultad ambos miembros anteriores, sin observarse la elevación de las escápulas. (Fig. 3). La recuperación completa requirió 60 días.

DISCUSIÓN

En principio se harán algunas consideraciones necesarias para justificar los diferentes nombres de esta enfermedad.

La denominación bibliográfica más común es desgarro del músculo serrato ventral (5, 6), ya que esta lesión provocaría el desplazamiento dorsal de la escápula; sin embargo, rara vez aparece como único músculo lesionado ya que iría acompañado por la ruptura parcial o total de otros músculos que contribuyen al sostén de la escápula

Otra denominación que se suele presentar es la de luxación escapular (7) la cual tiene algunos reparos ya que el término luxación se define como "desplazamiento de las superficies articulares de uno o más huesos con pérdida permanente de sus relaciones normales". Aunque se menciona también con ese nombre al desplazamiento de una parte cualquiera del organismo (8), precisamente la escápula no tiene una verdadera conexión articular con el tórax, manteniéndose unida por músculos y ligamentos, tipo de unión conocido como sinsarcosis.

Dislocación escapular (2) es otra forma posible de mencionar esta lesión ya que dislocación significa "acción y efecto de sacar un

elemento (anatómico) de su lugar" (8). Se utiliza como sinónimo de luxación.

Avulsión escapular (9) es para algunos un término adecuado cuyo significado es "arrancamiento de parte de una estructura" (8).

El desgarro del músculo serrato ventral se produce como consecuencia de un traumatismo relacionado con un salto o caída de altura (10) o heridas por mordeduras (7). Además del desgarro de ese músculo, también pueden producirse la avulsión o ruptura de los músculos romboideo y trapecio. Frecuentemente los músculos se desgarran en las inserciones en el ángulo craneal y borde caudal de la escápula permitiendo el desplazamiento de ésta hacia dorsal cuando apoya el miembro afectado.

Esta afección afecta tanto a caninos como felinos, siendo más frecuente en estos últimos. En su gran mayoría es unilateral. De acuerdo a algunos autores (6, 9), los galgos predominan sobre otras razas.

Los signos más destacados son el desplazamiento ostensible de la escápula hacia arriba cuando el animal camina y apoya el miembro dañado. Cuando el animal se sienta se puede apreciar una exagerada posición dorsal de la escápula. Los animales con esta lesión parecieran no sentir dolor, aun en los inicios de la enfermedad que es de presentación súbita. Si la extremidad distal del miembro es aducida, la parte proximal de la escápula se desplaza lateralmente. También se puede observar una tumefacción de los tejidos blandos durante varios días (4, 7).

El diagnóstico se basa en el desplazamiento dorsal de la escápula durante la sustentación, el cual puede reproducirse por palpación-presión o bien al realizar con la mano una rotación del miembro afectado, se produce la separación de la escápula de la pared torácica. Podría haber confusión en el diagnóstico definitivo si subsistiera una fractura. Esto se aclara mediante estudios radiográficos, además de descartar fracturas de costillas, contusiones, neumotórax o neumomediastino (11). En ocasiones, se puede lesionar el plexo braquial, trayendo como consecuencia signos neurológicos (12). Por todo esto es necesario que el clínico realice una exploración ortopédica detallada.

Los animales se adaptan bien al andar anormal aunque es conveniente realizar un

tratamiento que puede ser conservador si el diagnóstico es precoz, especialmente en los gatos, el mismo consiste en reducir la luxación e inmovilizar el hombro con una férula, durante 3 ó 4 meses o bien el cabestrillo de Velpeau, el cual se retira a los 10-15 días, para luego volver a armarlo y así procediendo de la misma forma durante 2 meses (2, 11). Sin embargo, en los perros y en casos de cronicidad en los gatos, se debe realizar una reducción abierta y suturar los músculos convenientemente.

En general, el pronóstico es bueno, los animales vuelven a caminar normalmente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Evans H, de Lahunta A. Diseción del perro de Miller. Ed. Interamericana. (México); 1972. p. 27.
2. Parker RB. Scapula. In Slatter, D.M. Textbook of Small Animal Surgery. Ed. W B. Saunders Company. Philadelphia (USA); 1995. p.1709-1710.
3. Adams DR. Anatomía canina. Ed. Acribia Zaragoza (España); 1988. p.155.
4. Leighton R L. Luxación de la escápula. En Bojrab M J. Medicina y cirugía en pequeñas especies. Ed. Continental S.A. (México); 1980. p. 517-519.
5. Leighton RL. Compendio de cirugía en animales pequeños. Ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires (Argentina); 1983. p. 204.
6. Blomberg MS. Tendon, muscle, and ligament injuries and surgery. En Olmstead ML. Small Animal Orthopedics. Ed. Mosby. St. Louis (USA); 1995. p. 492-493.
7. Piermattei DL, Flo GL. Ortopedia y reparación de fracturas de pequeñas especies. 2º ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid (España); 1999. p. 234-235.
8. Dorland. Diccionario de ciencias médicas. 5ª ed. Ed. "El Ateneo". Buenos Aires (Argentina); 1976.
9. Milton JL, Montgomery RD. Diagnóstico de renquera de la extremidad delantera. En Ford R B. Signos clínicos y diagnóstico en pequeños animales. Ed. Interamericana. Buenos Aires (Argentina); 1992. p. 317-318.
10. Lewis DD, Parker RB, Bloomberg MS. Ortopedia en pequeños animales. Ed. Grass. (España); 1999. p. 18.
11. Lewis RL. Small animal orthopedics. Ed. Mosby. St. Louis (USA); 1994. p.154.
12. Welch Fossum T. Cirugía en pequeños animales. Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina); 1999. p. 989-991.

NEOPLASIAS DEL FOLÍCULO PILOSO DEL CANINO: ESTUDIO RETROSPECTIVO (1981- 2003)

AR Massone¹, MA Quiroga¹, ME Diessler¹, MA Machuca¹,
AN del Amo², JR Idiart¹

¹Cátedra de Patología Especial. ²Cátedra de Clínica de Pequeños Animales.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: *Se realizó el estudio histopatológico retrospectivo de 134 neoplasias del folículo piloso y de células basales, ingresadas al servicio de diagnóstico del Instituto de Patología "Dr. Bernardo Epstein" de la Facultad de Ciencias Veterinarias (U.N.L.P.) entre enero de 1981 y diciembre de 2003. Del total de las neoplasias de piel correspondientes al periodo en estudio (1403 casos) los tumores del folículo piloso representaron el 8,2%. Dentro de ellos el tricoblastoma resultó la neoplasia folicular más frecuente (38,81%), seguida por el tricoepitelioma (27,61%), el acantoma infundibular queratinizante (17,90%), el pilomatricoma (13,43%), el tricolemoma (1,5%) y el pilomatricoma maligno (0,75%). La edad promedio de presentación fue de 7,6 años y la relación macho/hembra fue 1/1,53 siendo la localización anatómica más frecuente la cabeza, el cuello y el tronco.*

Palabras clave: canino, neoplasias, folículo piloso

CANINE HAIR FOLLICLE TUMORS: RETROSPECTIVE STUDY (1981- 2003)

ABSTRACT: A survey was carried out on the canine hair follicle tumors recorded in the registration files of the Institute of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, La Plata National University, Argentina, over a 23-year period from 1981 to 2003. A total of 134 tumors were studied accounting for 8.2% of the whole recorded canine cutaneous tumors. The most frequent was trichoblastoma (38.81%) followed by trichoepithelioma (27.61%), infundibular keratinizing acanthoma (17.90%), pilomatricoma (13.43%), tricholemmoma (1.5%) and malignant pilomatricoma (0.75%). Most of the tumors were located on the head, neck and trunk. The male-to-female ratio was 1:1.53. The main age at diagnosis was 7.6 years.

Key words: canine, hair follicle tumors

Fecha de recepción: 16/02/05

Fecha de aprobación: 25/06/05

Dirección para correspondencia: A.R. Massone, Cátedra de Patología Especial. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

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

INTRODUCCIÓN

Los tumores que se originan en el folículo piloso representan aproximadamente el 5% de las neoplasias de la piel de los caninos. La mayoría son benignos y se desarrollan en perros de más de 5 años, excepto el acantoma infundibular queratinizante, que se presenta en animales jóvenes. Las neoplasias benignas son de muy buen pronóstico luego de la escisión quirúrgica. Los machos son más frecuentemente afectados.

Los acantomas infundibulares queratinizantes (antes llamados epitelomas intracutáneos cornificantes o queratoacantomas) se caracterizan por la proliferación de células epiteliales basales con diferenciación a epitelio estratificado (1, 2, 3). Constituyen el 2-3% de las neoplasias de la piel. Generalmente se presentan en perros de 5 años o más jóvenes (3, 4).

Los tricoblastomas son neoplasias comunes (1, 3, 4), derivadas del epitelio tricoblástico (germen piloso primitivo), que se presentan en animales de más de 5 años. La prevalencia es aquella informada anteriormente para los tumores de células basales (3 al 12 % de las neoplasias de la piel). Los tumores de células basales involucran a un grupo de neoplasias comunes en perros y gatos cuyo origen serían células basales de origen epidérmico o de los anexos. En el perro, en la actualidad, se considera que la mayoría de estas neoplasias son benignas y no se continúan con la capa de células basales de la epidermis y, en general, exhiben diferenciación hacia estructuras foliculares, por lo que se las ha reclasificado como tricoblastomas. Se describen cuatro subtipos por su aspecto histológico (listón, trabecular, de células granulosas y de células fusiformes) (1). Generalmente son únicas y aparecen en la cabeza (especialmente en la base de las orejas) y en el cuello (3, 4).

Los tricoepiteliomas son neoplasias del folículo piloso con diferenciación de los tres segmentos del mismo (región inferior, istmo e infundibulum) y constituyen del 1 al 3 % de las neoplasias de la piel. La mayoría ocurre en perros de más de 5 años y se presentan como masas dérmicas o subcutáneas, redondas u ovals, bien circunscriptas, de 1 a 15 cm de diámetro. La piel que los recubre puede estar atrófica y alopecica. Las áreas más frecuentemente afectadas son el dorso, el lomo, la parrilla costal y los miembros (3, 4). Pueden ser múltiples.

Los pilomatricomas son neoplasias poco comunes, con exclusiva diferenciación matricial. Se presentan en animales de más de 5 años (2, 3, 4). No existe predilección por sexo. Usualmente son solitarios y pueden alcanzar los 10 cm de diámetro. La piel que los recubre es alopecica, algunas veces ulcerada y la superficie de corte puede presentar aspecto arenoso debido al depósito de minerales. Pueden ser quísticos y algunos hiperpigmentados. Generalmente se originan en el tronco (1, 2, 3). Existe una variedad maligna de este tumor.

Los tricolemomas son tumores de rara presentación (1, 3, 5, 6) que se originan en los queratinocitos de la vaina radicular externa de los folículos pilosos (1, 4, 3). Han sido descritos en perros de entre 5 y 13 años. Generalmente se desarrollan en la cabeza y en el cuello (3, 4).

Los objetivos de este estudio fueron determinar la frecuencia de las neoplasias del folículo piloso en nuestro medio y aportar información sobre su localización anatómica y edad y sexo de los caninos afectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó el estudio histopatológico retrospectivo de 134 tumores cutáneos diagnosticados previamente como neoplasias del folículo piloso y de células basales. Las muestras, fijadas en formol neutro al 10%, embebidas en parafina y coloreadas con hematoxilina y eosina, correspondieron a material archivado en el servicio de diagnóstico del Instituto de Patología "Dr. Bernardo Epstein" de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de La Plata), ingresado entre enero de 1981 y diciembre de 2003. Todos los casos fueron nuevamente estudiados por más de un patólogo. Se aplicó la clasificación histológica de los tumores propuesta por la Organización Mundial de la Salud (1). Los tumores fueron agrupados según su localización anatómica registrándose, para cada caso, edad y sexo. También se registró la raza en 97 animales.

Se resumieron y tabularon los datos consignados y se compararon con los registrados por otros autores.

RESULTADOS

De los 134 tumores estudiados, 52 (38,81%) correspondieron a tricoblastomas, de los cuales 35 se subclasificaron como "subtipo listón". La edad promedio de los anima-

les afectados fue de 11,1 años para el subtipo listón y 8,3 años para el subtipo trabecular. La presentación varió según el sexo, encontrándose una relación macho/hembra de 1/1,21 y 1/1,75 para cada subtipo, respectivamente. En la mayoría de los casos, los tumores se localizaron en la cabeza y el cuello (56,5 %). Los animales más comúnmente afectados fueron mestizos (26), seguidos en frecuencia por ovejeros alemanes (15), collies (3) y caniches (1). Veinticuatro neoformaciones se diagnosticaron como acantomas infundibulares queratinizantes (17,90%). La edad promedio de presentación fue de 7,4 años y la relación macho/hembra de 1/0,93, siendo la ubicación más frecuente el cuello y el tronco (66,6%). La raza ovejero alemán fue frecuentemente afectada (17). Treinta y siete casos (27,61%) se clasificaron como tricoepiteliomas. La edad promedio fue de 7,4 años con una relación macho/hembra 1/1,63, localizándose la mayoría en el tronco (46,4%). El

ovejero alemán fue más frecuentemente afectado (20). Otras neoplasias diagnosticadas fueron: el pilomatricoma (13,43%), el tricolemoma (1,50 %) y el pilomatricoma maligno (0,75 %). La distribución por sexo y la edad promedio de los caninos afectados se consiguan en la tabla 1.

DISCUSION

Del total de neoplasias cutáneas, Walder (3) y Scott (2) describen que las neoplasias foliculares representan un 5%. Las más halladas por los diferentes autores fueron tricoblastoma (3 a 12 %), tricoepitelioma (1 a 3 %) y pilomatricoma (3%) (1, 2, 3, 7). En nuestro estudio, los tumores del folículo piloso representaron el 8,2% (134 tumores) del total de las neoplasias de piel ingresadas al servicio durante el periodo en estudio (1403 casos). El tricoblastoma también resultó la neoplasia folicular más frecuente (3,7%), seguida por el tricoepitelioma (2,6%) y el acanto-

Tabla 1: Frecuencia relativa de las neoplasias del folículo piloso y edad promedio y relación macho/hembra de 134 caninos con neoplasias del folículo piloso.

Table 1. Relative frequency of hair follicle tumors, and mean age and male/female ratio in 134 dogs.

NEOPLASIA	n (%)	Edad (media y rango en años)	Relación macho/hembra
Tricoblastoma	52 (38,81)		
(subtipo listón)	35 (26,12)	X = 11,1 (1-16)	1: 1,21
(subtipo trabecular)	7 (12,69)	X= 8,3 (3-10)	1: 1,75
Tricoepitelioma	37 (27,61)	X= 7,4 (2-12)	1: 1,63
Acantoma queratinizante infundibular	24 (17,90)	X= 7,4 (2-17)	1: 2,42
Pilomatricoma	18 (13,43)	X= 5,5 (1-10)	1: 1,92
Tricolemoma	2 (1,50)	X= 3,5 (3-4)	1:1
Pilomatricoma maligno	1 (0,75)	10	Macho
Total	134	X= 7,6 (1-17)	1: 1,53 (53 m: 81 h)

ma infundibular queratinizante (1,7%). El pilomatricoma se presentó en un porcentaje menor que lo consignado por otros autores, constituyendo el 1,3% de las neoplasias cutáneas. Todas las neoplasias foliculares benignas fueron considerablemente más frecuentes en hembras, a diferencia de lo consignado en los trabajos de referencia (4, 6). Sólo el pilomatricoma maligno se presentó exclusivamente en machos.

La relación entre neoplasias foliculares benignas y malignas fue elevada (133/1) en coincidencia con lo expresado por otros autores (1, 2, 3, 4).

La edad promedio de los caninos afectados por las distintas neoplasias fue similar a la consignada en la bibliografía consultada, con excepción de los animales que presentaron acantoma infundibular queratinizante. En ellos, se registró una edad promedio de 7,4 años, frente a los 5 años consignados en la literatura (3, 4).

La localización de los tumores resultó similar a lo consignado en la bibliografía, siendo el tronco (n=35), el cuello (n=21) y la cabeza (n=20) los sitios más comunes (3, 4).

Si bien no pueden extraerse conclusiones sobre la distribución por raza, debido a que en 37 animales la misma no había sido consignada y que 35 eran mestizos, los datos disponibles muestran una tendencia a una mayor presentación de tricoblastoma y tricoepitelioma en el ovejero alemán. Esto concuerda con las observaciones de Vail y Withrow y de Kaldrymidou y col., quienes sugieren una predisposición genética en esta raza (4, 7).

La prevalencia de este tipo de neoplasias así como su localización, las edades promedio de presentación y las razas de los animales afectados pueden orientar al clínico en el pronóstico y en el tratamiento a instaurar.

BIBLIOGRAFIA

1. Goldschmidt MH, Dunstan RW, Stannard AA, von Tscharner C, Walder EJ, Yager JA. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. 2nd ed. Vol 3. AFIP-ARP and WHO. Washington, DC. 1998. p. 15-25.
2. Scott DW, Miller WH, Griffin CG. Muller & Kirk, Dermatología en Pequeños Animales. 6^a ed. en español. Ed. Intermédica. Buenos Aires, 2002. p. 1309-1319.
3. Walder EJ, Gross TL. Neoplastic disease of the skin. En: Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ. Veterinary Dermatopathology. A macroscopic and micro-

scopic evaluation of canine and feline skin disease. Mosby Year Book, St Louis, 1992. p. 351-373.

4. Vail DM, Withrow SJ: Tumors of the skin and subcutaneous tissues. En: Withrow SJ, Macewen EG. Small Animal Clinical Oncology. 3th ed, W.B. Saunders, Philadelphia, 2001. p. 248.

5. Deters RW, Goldschmidt MH. Hair follicle tumors resembling tricholemmomas in six dogs. Vet Pathol 1983; 20 (1): 123-5.

6. Walsh KM, Corapi WV. Tricholemmomas in three dogs. J Comp Pathol. 1986; 96 (1): 115-117.

7. Kaldrymidou H, Leontides L, Koutinas AF, Sardomichelakis MN, Karayannopoulou M. Prevalence, distribution and factors associated with the presence and the potential for malignancy of cutaneous neoplasms in 174 dogs admitted to a clinic in Northern Greece. J Vet Med. 2002; A (49): 87-91.

PROSTATITIS EN EL PERRO

A Dragonetti, C Solis, A Giordano

RESUMEN: *Las prostatitis en los caninos pueden ser agudas o crónicas. Las formas agudas pueden cursar con complicaciones generales graves, y comprenden las prostatitis supurativas bacterianas y los abscesos. En cuanto a las formas crónicas muchas veces pueden pasar desapercibidas, llevando a la aparición de cuadros agudos o dejando secuelas graves de infertilidad en perros reproductores. El objetivo del presente artículo es hacer una revisión actualizada de la fisiopatología, los signos clínicos, los métodos diagnósticos y las posibilidades terapéuticas de las prostatitis del perro.*

PALABRAS CLAVES: Prostatitis-perro

CANINE PROSTATITIS

ABSTRACT: *Canine prostatitis may be an acute or chronic disease. The acute types normally have general and severe complications, they can also be suppurative, or have abscesses. The chronic presentations may not have clinical signs, become acute or provoke infertility problems in the dog. The objective for this article was to briefly review the physiopathology, clinical signs, diagnosis methods and therapeutic possibilities of dog prostatitis.*

KEY WORDS: Prostatitis-dog

Fecha de recepción: 06/06/04

Fecha de aprobación: 26/05/05

Dirección para correspondencia: Ana Dragonetti, Cátedra de Clínica de Pequeños Animales. C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: ante@argentina.com

INTRODUCCIÓN

La próstata es la única glándula sexual accesoria presente en el macho canino (1, 2). Es relativamente grande de color amarillento, con una estructura densa bilobulada y con un tabique mediano sobre la superficie dorsal (3).

Se localiza con mayor predominio en el espacio retroperitoneal, dentro de la cavidad pélvica, en el área del cuello y uretra vesical caudal a la vejiga. Sólo el lado craneodorsal está cubierto con peritoneo. La próstata circunda la uretra proximal en el cuello de la vejiga y sus conductos penetran la uretra a lo largo de toda su circunferencia., con el paso del tiempo la glándula puede mostrar una localización abdominal (4). Histológicamente, está compuesta por acinos glandulares sostenidos por un estroma de tejido conectivo y músculo liso encerrados por una cápsula fibromuscular gruesa (4).

Normalmente la próstata tiene una serie de mecanismos de defensa en contra de infección; el factor antibacteriano prostático es un compuesto de Zinc, la bicapa lipídica del epitelio prostático, el lavado uretral mecánico durante la micción, la peristalsis uretral y las características de superficie de la mucosa uretral que atrapa bacterias (5).

La función de la próstata es producir un líquido que sirve de transporte y medio de sostén para los espermatozoides durante la eyaculación (6). La enfermedad prostática generalmente esta asociada a un síndrome prostático, independientemente del tipo lesión que la genere. Para un correcto tratamiento es necesario dilucidar que tipo de lesión esta produciendo el síndrome (7, 8). El objetivo del presente artículo es hacer una revisión actualizada de la fisiopatología, los signos clínicos, los métodos diagnósticos y las posibilidades terapéuticas de las prostatitis del perro.

FISIOPATOLOGÍA

Las prostatitis son lesiones inflamatorias de origen infeccioso del tejido prostático. Pueden ser agudas (incluyendo el absceso prostático) o crónicas. Microscópicamente, las lesiones supurativas se caracterizan por una infiltración de polinucleares, linfocitos e histiocitos localizados en la luz de los acinos y en el estroma (9). La vía de infección generalmente es uretral por ascenso de las bacterias, aunque también la vía hematogena, las infecciones de la vejiga urinaria o del semen, son probables (10).

Los factores que predisponen a la infec-

ción incluyen: enfermedad uretral (urolitiasis, trauma, neoplasias), infecciones del tracto urinario, alteraciones en el flujo de orina, inmunodepresión, y los quistes, neoplasias, metaplasia escamosa o hiperplasia de la glándula (5). Dentro de estas alteraciones la hiperplasia prostática benigna es la causa predisponente mas frecuente.

La hiperplasia prostática benigna ocurre en el 80% de los perros de mas de 10 años de edad, pero solo un pequeño número de pacientes presenta síntomas en relación al aumento de volumen que esta provoca (9, 11, 12). Esta entidad se caracteriza por un desarrollo anormal del tejido glandular y una irregularidad en el tamaño y forma de los acinos prostáticos. Se acompaña, a veces, de alteraciones quísticas mas o menos importantes.

Los organismos que comúnmente se involucran en la infección prostática son los mismos que causan las infecciones del tracto urinario. Las bacterias *Escherichia coli* son las que se aislan con mayor frecuencia, pero también pueden encontrarse otros organismos Gram positivos y negativos como *Staphylococcus sp*, *Proteus sp*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Brucella canis* y *Streptococcus sp*. La infección por bacterias anaerobias, hongos o micoplasmas es rara, pero se han encontrado casos en que la prostatitis crónica granulomatosa se presenta también en la blastomycosis y la criptococosis (12)

Se desconoce la incidencia de las infecciones agudas, y las crónicas pueden ser secuelas de una infección aguda, o pueden desarrollarse insidiosamente sin que haya enfermedad aguda previa. Se cree que la abscesación resulta de una infección crónica del tejido prostático, conduciendo a la acumulación de bolsas de material purulento de tamaño variable, o como resultado de infección de quistes prostáticos intra o extraparenquimatosos (13, 14).

PROSTATITIS AGUDAS: PROSTATITIS SUPURATIVA BACTERIANA AGUDA Y ABSCESO

Hallazgos clínicos

En la prostatitis aguda, suelen observarse signos de afectación sistémica, como anorexia, letargia y fiebre (14). Puede haber vómitos, dolor abdominal caudal (el perro camina rígidamente) constante o intermitente que impide la eyaculación. A la palpación prostática la simetría y contorno glandular es nor-

mal o algo agrandada. Hay hematuria que se debe al reflujo de sangre de la uretra prostática hacia la vejiga, asociada también a cistitis bacteriana concurrente (8).

Puede haber descarga uretral tal como sangre, pus, líquido prostático, o una combinación de ellos. A consecuencia de la prostatomegalia, frecuentemente hay tenesmo fecal y puede ocurrir estreñimiento secundario al dolor asociado con la defecación (5). En casos de abscedación prostática, si el absceso o los abscesos aumentan mucho de tamaño, puede haber tenesmo y disuria. Si el absceso invade la uretra puede llevar a obstrucción uretral parcial con una vejiga distendida crónicamente, con disfunción del detrusor e incontinencia urinaria paradójica (por rebalsamiento). Si el absceso se rompe, se produce una peritonitis localizada o generalizada con letargia, fiebre, dolor y a veces vómito (14).

Otro síntoma general visto en la prostatitis supurativa o en la abscedación prostática es la evidencia de hepatopatía, (ictericia, aumento de las enzimas hepáticas) y la disfunción hepática la cual puede estar causada por la endotoxemia resultante de la infección prostática con la *E. coli* (9).

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo se basa en la historia, el examen físico, hematología, urianálisis y cultivo de orina (11). En el hemograma, suele existir una leucocitosis neutrofílica con o sin desviación a la izquierda. Los resultados del examen de orina pueden mostrar hematuria, piuria y bacteriuria, aunque en ocasiones son normales (11).

En casos de abscedación, la química sérica es anormal: pueden estar aumentadas las concentraciones de bilirrubina, fosfatasa alcalina, prueba de retención de bromosulfoftaleína o los ácidos biliares.

El líquido prostático no suele evaluarse en perros con prostatitis aguda porque la eyaculación es muy dolorosa y porque se dificulta la interpretación de las muestras del masaje prostático cuando hay presencia de infección del tracto urinario (14).

Si existen alteraciones radiológicas, incluyen aumento de tamaño, mineralización y márgenes no delimitados. En ocasiones se observa reflujo del material de contraste hacia el estroma de la próstata y alteraciones en el diámetro de la uretra cuando se utiliza uretrografía de contraste positivo, pero éstas son

características inespecíficas de enfermedad prostática (15).

La ultrasonografía constituye la prueba de detección más segura e informativa de la próstata. La ecogenicidad del parénquima prostático está de normal a disminuida, con presencia de algunas áreas hipoeoicas irregulares localizadas que pueden estar acompañadas de cavidades llenas de líquido (abscesos o quistes) (15).

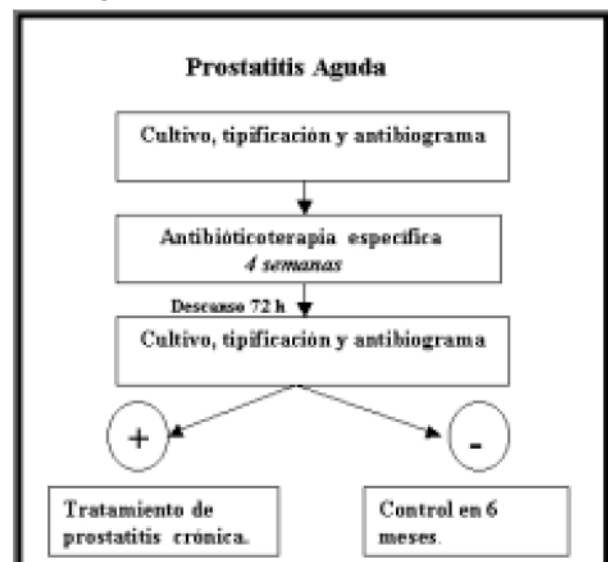
Tratamiento

La elección del antibiótico se determina en base a los resultados del cultivo, tipificación y antibiograma del lavado uretral, de la orina o preferiblemente de la tercera fracción del eyaculado. Si la toma de estas muestras resulta dificultosa por la agudeza del proceso se puede iniciar la antibióticoterapia en forma empírica. El trimetropin sulfonamida, la eritromicina y las fluorquinolonas (enrofloxacinas), son las drogas que se utilizan con mayor frecuencia. No conviene usar penicilinas, cefalosporinas, oxitetraciclinas y aminoglucósidos porque no penetran fácilmente el líquido prostático (15).

La vía de administración del antibiótico depende de la gravedad de la enfermedad sistémica. Si los signos clínicos son severos, se inicia usando la vía endovenosa, continuando con la vía oral hasta completar 4 semanas (Figura 1). Acompañando la antibióticoterapia con tratamientos de apoyo hasta que el perro se encuentre estable y tenga capacidad de comer y beber (5). Debido a que las infecciones

Figura 1. Algoritmo de los pasos diagnósticos y tratamiento de la prostatitis aguda.

Figure 1: Flow chart of diagnosis approach and treatment of acute prostatitis



agudas pueden volverse crónicas, debe hacerse una nueva evaluación, con el cultivo correspondiente 3 días después de finalizada la antibióticoterapia (2)

En caso que la infección persista la se realiza una nueva antibióticoterapia específica por otras 4 semanas y se vuelve a controlar al enfermo 1 semana más tarde, mediante el cultivo. Cuando el cultivo es entonces negativo, se interrumpen los antibióticos y se repite el cultivo a los 6 meses para asegurar la resolución de la infección. Si ésta reincide, el perro debe recibir terapia de prostatitis crónica (15). En todos los casos se debe diagnosticar y tratar en forma conjunta los posibles factores predisponentes (8)

Cuando existen abscesos prostáticos, además de la antibióticoterapia y estabilización del paciente, se considera la exploración quirúrgica con drenaje y omentalización (15). La castración es un tratamiento adjunto mas eficaz y permanente para la prostatitis bacteriana ya que provoca atrofia prostática y previene futuros episodios (13).

PROSTATITIS BACTERIANA CRÓNICA

Hallazgos clínicos

Puede aparecer como secuela del tratamiento ineficaz para la prostatitis aguda o ser un dato inesperado en perros sin antecedentes de enfermedad prostática. Por lo general, la prostatitis crónica no se relaciona con signos de enfermedad sistémica a menos que haya abscesos. Los indicadores más frecuente son las infecciones recurrentes de vías urinarias en un macho intacto, por lo demás el macho se observa sano (15). El perro puede ser traído a consulta por episodios recurrentes de cistitis, por un flujo uretral constante o intermitente o por hematuria, algunos perros están letárgicos y es importante tener en cuenta la enfermedad en perros que se traen a la consulta por infertilidad (15).

Por lo general, la próstata no es dolorosa a la palpación. Los resultados son variables y dependen, en gran parte de la cantidad de hiperplasia concurrente que existe. Puede ser normal o revelar una glándula asimétrica, firme e irregular. Si se palpan áreas blandas fluctuantes es por la presencia de quistes intraprostáticos o abscesos (15).

La infertilidad, puede ser una secuela tardía de las prostatitis debida a variados mecanismos como: hipertermia presente en la infección, destrucción mediada por inmunidad

de las células espermatogénicas, y muerte espermática, secundaria a la exposición a toxinas bacterianas (15).

DIAGNÓSTICO

El cultivo de orina es positivo en más del 50% de los perros con prostatitis crónica (16). No hay signos radiológicos específicos que sugieran una prostatitis bacteriana crónica, puede haber mineralización prostática pero no es un dato específico (15). Mediante el ultrasonido, se observa un parénquima prostático difuso, multifocal o focal, hiperecoico, y eventualmente cavidades hipoeoicas a anecoicas llenas de líquido (15). La punción guiada con aguja fina mediante ecografía permite obtener material para citología y cultivo. Debe evitarse el uso de aspiración con aguja cuando hay presencia de abscesos prostáticos ya que se puede diseminar bacterias (13).

El análisis de líquido prostático puede realizarse a partir de una muestra obtenida por eyaculación o masaje prostático con catéter urinario, o con cepillo uretral (15). Cuando se utiliza el masaje prostático como procedimiento diagnóstico de la prostatitis bacteriana, primeramente debe controlarse la infección del tracto urinario (2).

Para recoger el eyaculado, el perro debe orinar, y posteriormente se lo lleva a un lugar tranquilo. Debe limpiarse el área con gasas secas, y se hace la recolección del eyaculado con o sin presencia de una perra en celo, en dependencia de la respuesta del macho (4). Las fracciones pre y pos espermática del eyaculado son de origen prostático. Debido a que la fracción preespermática es poca y difícil de separar de la fracción rica en espermatozoides, se prefiere recolectar la fracción posespermática o tercera fracción. Los resultados de la valoración de la segunda fracción del eyaculado, son bastante variables y dependen en parte de la duración y gravedad de la infección y la presencia o ausencia de orquiepididimitis bacteriana y orquitis mediada por mecanismos inmunitarios (15).

Parte del material obtenido por cualquiera de los métodos se utiliza para hacer un estudio citológico y la otra parte, para un cultivo cuantitativo. En perros normales se encuentra un número de bacterias menor de 10⁵ por mililitro y por lo común microorganismos Gram positivos (11) En casos de prostatitis bacteriana el fluido prostático usualmente es purulento, séptico y hemorrágico, encontrándose gran cantidad de organismos Gram positivos y negativos con un importante número de leu-

cocitos (2,17). Los datos característicos del semen de perros con infertilidad inducida por prostatitis bacteriana crónica incluyen neutrófilos, macrófagos, bacterias fagocitadas, aumento en las cifras de espermatozoides con defectos morfológicos primarios y secundarios y menor número de espermatozoides por eyaculado. La azoospermia es también posible en casos graves (15).

TRATAMIENTO

El médico debe asumir que la barrera hematoprostática se encuentra intacta en perros con prostatitis bacteriana crónica y elegir un antibiótico que no solo sea eficaz contra el microorganismo cultivado sino también capaz de penetrar dicha barrera y tener acceso al líquido prostático (11,18). La barrera hematoprostática se basa, en parte, en las diferencias de pH entre la sangre (pH 7.4) y el líquido prostático (pH 6.4); en las características del epitelio acinar prostático; y en las particularidades de unión de proteína plasmática de los antibióticos (5).

La mayor parte de los perros con infección prostática tienen líquido prostático ácido, por lo tanto, en condiciones ideales, los antibióticos que son eficaces para traspasar la barrera hematoprostática deben ser básicos con valores de pKa elevados. Ejemplos de estos antibióticos son: trimetropin sulfonamida, eritromicina y clindamicina. En los casos de líquido prostático ácido, los antibióticos básicos con valores de pKa elevados se ionizan

en mayor grado en el líquido prostático que en el plasma y quedan atrapados en él. Además los antibióticos eficaces deben tener alta liposolubilidad como el cloranfenicol, la trimetropin sulfonamida, las quinolonas y la carbenicilina y poca unión a proteínas en el plasma como la norfloxacina (12).

Por lo general si el microorganismo causante es gram positivo, se utiliza trimetropin sulfonamida, cloranfenicol, clindamicina o eritromicina. Si el patógeno causante es Gram negativo, se recomienda trimetropin sulfonamida, cloranfenicol o enrofloxacin (Tabla 1) (18, 12).

El tratamiento de la prostatitis se prolonga, por seis semanas. A las 72 horas de culminado se pueden extraer nuevas muestras para cultivo. Si este es negativo se repite el cultivo en 7 días y luego cada 6 meses. Si fuera positivo se debe comenzar un antibiótico terapia específica por 20 semanas, y controlar igual que la primera vez (Figura 2).

Si la infección recurre en esos momentos, es necesario iniciar de nuevo el ciclo completo (5). Si no es posible eliminar la infección, deben administrarse antibióticos de manera continua por el resto de la vida, a un 25% de la dosis habitual para evitar infección de las vías urinarias teniendo en cuenta los efectos adversos de los antibióticos; por ejemplo, la queratoconjuntivitis seca por tratamiento con trimetropin sulfonamida (18).

Tabla 1. Dosis de antibióticos recomendadas en el tratamiento de las infecciones prostáticas agudas y crónicas (9).

Table1: Antibiotic dosages recommended for the treatment of acute and chronic prostatitis.

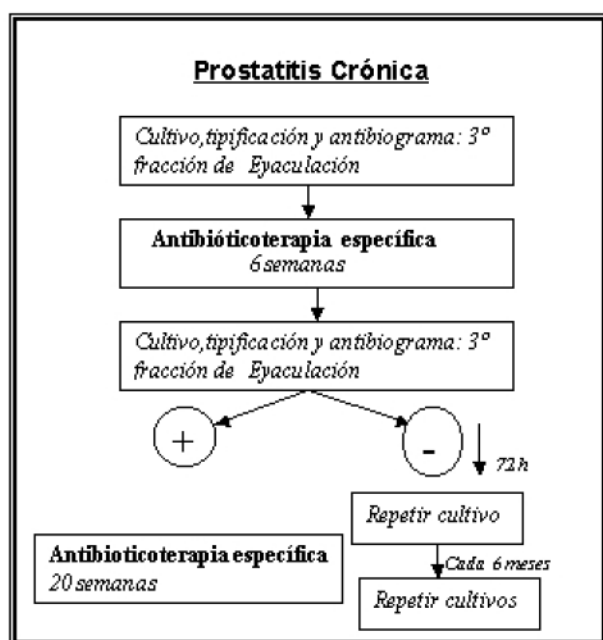
DROGA	DOSIS (mg/kg)	RUTA	INTERVALO (h)	EFFECTOS SECUNDARIOS
Gentamicina	2	IM, SC	8	Nefrotoxicidad
Amoxicilina	10-20	PO	12	-----
Cefalosporinas (1 ^o generación)	5-30	PO	6-8	-----
Enrofloxacin	2,5-5,0	PO	12	No es tóxica en esa dosis
Trimetropin sulfonamida	15-30	PO, SC	12	Queratoconjuntivitis seca cuando el tratamiento es prolongado.

En un estudio recientemente realizado en humanos se observó que la inyección intraprostática de 12 mg de ofloxacina tuvo buena distribución en el fluido y tejido prostático, lo cual en un futuro puede sustituir la medicación a largo plazo de prostatitis crónica (6).

Debido a que hiperplasia prostática benigna es uno de los factores que predisponen a las prostatitis bacterianas es importante realizar la esterilización, cuya consecuencia es la reducción de un 70% del tamaño prostático, siendo evidente la involución y la disminución de la secreción prostática de 7 a 16 días después de la castración (2). Las terapias con acetato de megestrol (0,11 mg/kg oral, una vez al día) o finasteride (5 mg oral, una vez al día) pueden disminuir temporalmente el tamaño prostático y ayudar en el manejo de la hiperplasia, pero siempre tiene que usarse junto con los antibióticos (12).

Figura 2. Algoritmo de los pasos diagnósticos y tratamiento de la prostatitis crónica.

Figure 2 :Flow chart of the diagnosis steps and treatment of chronic prostatitis.



CONCLUSIONES

Las prostatitis pueden comprometer seriamente la vida del animal en el caso de las agudas, o pueden causar infertilidad en reproductores en el caso de las crónicas. Las medidas tanto diagnósticas como terapéuticas deben ser enérgicas y para evitar tanto, complicaciones generales agudas graves, como también desarrollo de problemas crónicos que

lleven a la infertilidad. La palpación rectal durante los exámenes médicos debe ser rutinaria ya que permite la detección temprana de enfermedades prostáticas que predisponen a las prostatitis, evitando de esta manera las complicaciones generales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aprea A, Del amo A. Prostatitis bacteriana canina. Metodología diagnóstica y planificación terapéutica. Clínica & Producción Veterinaria Buenos Aires 1998; p 3-80
2. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PN. Disorders of the canine prostate. Canine and Feline Theriogenology. Saunders, Philadelphia, 2001 337-355.
3. White RA, Williams JM. Prostatic parenchymal omentalization: a new technique for management of abscesses and retention cysts. Vet Surg. 1991 20: 351-355.
4. Gobello C; Corrada Y. Non infectious disorders of canine prostatic diseases: A medical approach. Comp Cont Ed 24 . 2001 (2): 99 - 107
5. Johnston GR, Feeney DA, Rivers W, Walter PA. Diagnostic imaging of the male canine reproductive organs. Methods and limitations. Vet Clin North Am.: Small Anim Pract. 1991. 21: 533-589
6. Barsanti J, Finco DR. Medical management of canine prostatic hyperplasia. En: Kirk RW (ed), Current Veterinary Therapy XII. WB Saunders, Philadelphia, 1995 PA. 1033-1034,
7. Finn ST, Wrigley RH. Ultrasonography and ultrasound biopsy of the canine prostate. In: Kirk RW (ed) Current Veterinary Therapy X. WB Saunders, Philadelphia, 1989 p.1227-1239.
8. Johnston SD. Prostatic disorders in the dog. Anim Reprod Sci 2000; 60-61.
9. Nelson R, Couto G. Quimioterapia antimicrobiana práctica. Medicina Interna de Animales. Pequeños Interamericana Buenos Aires 2º ed. 2000; p1338-1347
10. Newell SM. Doppler ultrasound of the prostate in normal dogs with chronic lymphocytic-lymphoplasmocytic prostatitis. Vet Radiol Ultrasound 1998 (4):332-6
11. Ling GV. Comparison of two sample collection methods for quantitative bacteriologic culture of canine prostatic fluid. J Am Vet Med Assoc 1990 (9): 1479-8
12. Barsanti,J. Enfermedades de la próstata . En Clínica de Pequeños Animales. Morgan R.V; Bright RM; Swartont MS .4ta edición.Elsevier España SA-Madrid Año 2004 pp. 570-580.
13. Ellenport, CR. Aparato Urogenital de los Carnívoros. En Anatomía de los animales domésticos Sisson Grossman. Getty R. 5ta edición Salvat Editores SA 1982. Barcelona.pp.1728-1741.
14. Klaunsner JS, Johnston SD, Bell FW. Canine prostatic disorders. En: Bonagura JD, Kirk RW (eds), Current Veterinary Therapy XII : W.B.

Saunders. Philadelphia 1995; 1103-1110.

15. Welch, T. Prostatic abscesses. Small Animal Surgery. 2º ed. Ed Mosby. Philadelphia 2002; 672-680.

16. Verstegen, J Onclin K. Fisiología, métodos de investigación y patologías de la próstata de los carnívoros. En: Proceeding 2das Jornadas Internacionales de Veterinaria en Pequeños y Grandes Animales. Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires. Argentina. 2001. 221-248.

17. Lappin MR. Diseases of the prostate. In: Proceeding of WASAVA Continuing Education, Argentina. 2000 72-78,

18. Feldman E, Nelson R. Prostatitis. Endocrinología y Reproducción en perros y gatos. 2da ed, Interamericana. Buenos Aires, 2000; p.772-779.

MARCADORES GENÉTICOS PARA RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN ANIMALES DOMÉSTICOS. LOS LOCI DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) COMO GENES CANDIDATOS

S Díaz, MV Ripoli, P. Peral-García, G Giovambattista

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

Resumen: Las enfermedades infecciosas en animales domésticos aún permanecen como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, con las consecuentes pérdidas productivas, siendo uno de los principales problemas sanitarios en los países en desarrollo. El resultado de la infección puede estar influenciado por factores ambientales, variables propias del patógeno y factores del hospedador. En consecuencia se han realizado numerosas investigaciones dirigidas a establecer las relaciones entre la probabilidad de adquirir o desarrollar la enfermedad y la constitución genética de los individuos. Los loci del Complejo Principal de Histocompatibilidad son considerados genes candidatos dado el rol que desempeñan en la respuesta inmune. En este trabajo de revisión se describen las principales estrategias implementadas para detectar el componente genético de la susceptibilidad/resistencia y se detallan las consideraciones generales para la elección del método adecuado. Además, se describen y discuten los principales resultados obtenidos en las diferentes especies de animales domésticos: equinos (sarcoïditis, hipersensibilidad dérmica a insectos), bovinos (leucosis, mastitis, dermatofilosis), caninos (leishmaniasis) y aves de corral (enfermedad de Marek). Finalmente, se hace una breve mención de estudios de asociación realizados con otros genes candidatos que no pertenecen al MHC y se discute la situación actual y las perspectivas futuras de esta área del conocimiento

Palabras claves: MHC, susceptibilidad/resistencia a enfermedades, animales domésticos, marcadores genéticos.

GENETIC MARKERS FOR SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE TO INFECTIOUS DISEASES IN FARM ANIMALS. MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX (MHC) LOCI AS CANDIDATE GENES

Abstract: Infectious diseases in farm animals are the main cause of morbidity and mortality and because of the consequent productive losses is considered one of the major sanitary problems in developing countries. The outcome of infection can be divided into environment, pathogen and host factors. Several investigations have intended to relate the probability of acquire or develop a disease and the genetic constitution of the individuals. Major Histocompatibility Complex loci are proposed as candidate genes due to their role on the immune system. In this review the principal strategies to detect the genetic component of susceptibility/resistance are described and the general norms to select the accurate method are detailed. Moreover, the main results obtained in different farm animals: equine (sarcoïds, insect dermal hypersensitivity), bovine (leukosis, mastitis, dermatophilosis), canine (leishmaniasis) and poultry (Marek's disease) are presented. Finally, a brief description of association studies with other candidate non-MHC genes is mentioned, and the present status and future perspectives are discussed.

Keywords: MHC, susceptibility/resistance to diseases, domestic animals, molecular markers

Fecha de recepción: 13/04/05

Fecha de aprobación: 17/06/05

Dirección para correspondencia: G. Giovambattista. Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, B1900AVW. Argentina.

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

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las enfermedades se relacionan de una forma u otra con los genes. La información codificada por ellos es tan crítica que el cambio en un sólo nucleótido (mutación puntual) del ADN (Ácido Desoxirribonucleico) puede ser suficiente para desencadenar enfermedades hereditarias, hacer a los individuos más o menos vulnerables a padecerlas crónicamente, o ser susceptibles a contraer enfermedades infecciosas.

La probabilidad de contraer enfermedades infecciosas en el mundo desarrollado ha disminuido en los últimos 50 años. Sin embargo, la infección aún permanece como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, con la consecuente pérdida productiva. En los países en desarrollo, las enfermedades infecciosas continúan siendo uno de los principales problemas sanitarios. Aunque la mayoría de las infecciones son autolimitantes y confieren morbilidad no significativa en el hospedador, otras pocas tienen una tasa de mortalidad cercana al 100%. En estas últimas, la variación en el resultado de la infección depende en gran medida de las diferencias en la constitución genética de los individuos.

Existen varios factores que pueden influenciar el resultado de la infección y que por conveniencia, se clasifican en variables ambientales, variables propias del patógeno y factores del hospedador. Los factores ambientales pueden incluir, entre otros, la nutrición, las toxinas ambientales y la edad de exposición al patógeno. Por otra parte, aquellas variables derivadas del patógeno generalmente implican factores de virulencia que, por ejemplo, pueden incrementar o atenuar la habilidad de colonización del organismo o aumentar la virulencia a través de la expresión de una toxina. Finalmente, los factores atribuidos al hospedador, a los cuales nos vamos a referir en detalle, implican principalmente la dotación genética del organismo.

En consecuencia, el objetivo del presente trabajo consiste en describir y analizar algunos aspectos de la susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas desde un punto de vista principalmente genético. Por otra parte, se mencionará la metodología estadística y los diseños muestrales comúnmente utilizados para detectar este tipo de asociaciones. Por último, se describirán estudios de asociaciones entre susceptibilidad/resistencia y los genes del MHC en las principales especies de animales domésticos previamente reportados.

Los vertebrados tienen entre 30 y 35 mil genes. Como se mencionó anteriormente, un único cambio o mutación en las bases de ADN que conforman esos genes puede causar una enfermedad o provocar predisposición a padecerla. Las mutaciones que generan variaciones genéticas, alterando el riesgo de ocurrencia de una enfermedad infecciosa, se conocen como genes de susceptibilidad. Los genes de susceptibilidad/resistencia se ponen de manifiesto porque algunas de sus variantes: (i) causan o predisponen el desarrollo de una enfermedad (alelo de susceptibilidad), (ii) presentan mayor incidencia en individuos emparentados, (iii) influyen la edad de ocurrencia y/o la progresión o (iv) ayudan a proteger contra la enfermedad (alelo protector).

La manera en que los cambios o variaciones de los genes pueden determinar que un organismo sea susceptible a desarrollar una enfermedad, o por el contrario, sea resistente a ella, ha sido objeto de numerosos estudios en diversas especies de organismos, principalmente en humanos, animales de laboratorios y animales domésticos (1-18).

Estos estudios han demostrado que las variaciones genéticas que afectan la susceptibilidad/resistencia pueden ocurrir tanto en regiones codificantes como no codificantes. Entre las primeras se encuentran, por ejemplo, los cambios en las regiones de reconocimiento de los antígenos (ARS), que pueden modificar la afinidad antígeno-anticuerpo. Entre las mutaciones en regiones no codificantes pueden mencionarse: (i) las regiones involucradas en el corte y empalme de intrón y exón (*splicing*), las que pueden modificar la funcionalidad de la proteína madura, y (ii) las regiones promotoras implicadas en el control de la transcripción de los genes y que por lo tanto, pueden variar los niveles de expresión.

Con este fin se han utilizado diferentes estrategias para identificar al gen responsable o al conjunto de genes asociados con la resistencia/susceptibilidad a una determinada enfermedad infecciosa.

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE SUSCEPTIBILIDAD/RESISTENCIA A ENFERMEDADES INFECCIOSAS

En términos generales, la identificación de genes de susceptibilidad o resistencia a enfermedades infecciosas consiste en la búsqueda de cambios en el ADN o la detección de regiones cromosómicas asociadas. Comúnmente, para identificar las variaciones en el ADN se utilizan Marcadores Genéticos (MG),

representados por genes, fragmentos de genes o secuencias no codificantes, que tienen variantes alternativas o alelos, con frecuencia apreciables en las distintas poblaciones (polimorfismo). Los MG poseen herencia mendeliana simple, y su detección es sencilla y reproducible.

Se han implementado diversas estrategias para detectar susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas. Para la elección del método de estudio se deben tener en cuenta diversas consideraciones generales, a saber:

- Selección de genes que han sido confirmados, propuestos, o que podrían ser considerados como genes candidatos para susceptibilidad/resistencia a enfermedades. Se definen como genes candidatos a aquellos loci que por su función biológica pueden estar involucrados en la determinación de un carácter, por la función de la proteína que codifican o por comparación con genes asociados a enfermedades similares en otras especies.

- Si el MG y un gen involucrado con la susceptibilidad/resistencia se encuentran ligados, ambos tenderán a heredarse juntos. Por lo tanto, la utilidad de un MG consiste en mapear genes o regiones cromosómicas implicadas en el carácter mediante análisis de ligamiento.

- Los grupos sanos y enfermos deben estar definidos por medio de fenotipos claros y robustos, de manera tal de poder diferenciarlos claramente. Para que las diferencias entre sanos y enfermos no se deban a diferencias genéticas inherentes a las poblaciones de origen, la selección de los grupos control y enfermo debe realizarse dentro del mismo origen étnico.

En las diferentes razas o familias no siempre se presentan las mismas asociaciones entre marcador y carácter. Por ejemplo, si tenemos en cuenta que el ligamiento entre el carácter y el marcador genético es incompleto, podrían existir en la población diferentes haplotipos marcador/carácter. De este modo, un alelo del marcador podría estar ligado al alelo de susceptibilidad en algunos animales, mientras que en otros estaría ligado a la variante de resistencia. Por lo tanto, los efectos estimados del carácter sobre el rasgo cuantitativo se verán sesgados por efecto de la recombinación.

En términos generales, el estudio de asociación a enfermedades consiste en la identificación de un gen candidato polimórfico y en la comparación de las frecuencias alélicas del

gen entre el grupo afectado y el grupo control.

Estrategias de identificación de genes de susceptibilidad/resistencia a enfermedades

Según el tipo de marcador utilizado existen dos estrategias principales para la identificación de genes involucrados en la determinación de un carácter, tal como es la susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas: (i) rastreo del genoma y (ii) estudio de genes candidatos.

El rastreo del genoma consiste en el mapeo (localización) e identificación de regiones del genoma que estarían asociadas con susceptibilidad/resistencia a una determinada enfermedad infecciosa. Esta estrategia se utiliza para determinar si existen similitudes entre individuos afectados. El rastreo se realiza usualmente con marcadores de tipo microsatélites (secuencias repetitivas en tándem) distribuidos a lo largo de todo un cromosoma o de todo el genoma (19, 20). Luego se realiza el análisis de ligamiento, con el fin de determinar que marcador segrega conjuntamente con el carácter en estudio. Posteriormente, se identifican los genes que presentaron asociación significativa con el carácter dentro de las regiones mapeadas. Esto puede realizarse analizando los genes previamente mapeados en dichas regiones cromosómicas, o mediante estudios de mapeo posicional. El último paso involucra la determinación de cuál de estos genes o mutaciones son causantes de la susceptibilidad/resistencia a la enfermedad infecciosa en estudio.

La segunda estrategia consiste en la selección y estudio de genes candidatos. Estos estudios parten del supuesto de que por su función biológica el gen candidato estaría involucrado en la susceptibilidad/resistencia a una determinada enfermedad infecciosa. La estrategia consiste en asociar los genotipos del gen candidato con el carácter estudiado. De igual modo que en la estrategia de rastreo, el objetivo final consiste en identificar en el gen candidato la mutación causal de la susceptibilidad/resistencia, y de esta forma confirmar al locus como responsable de la asociación.

Una vez determinados los genotipos o haplotipos del gen analizado, el estudio puede conducirse según el caso hacia: (1) el análisis de segregación compleja, el cual simula la segregación de la enfermedad en familias multicásos y compara la probabilidad de diferentes formas de heredar la enfermedad; (2) la

comparación del número observado de alelos compartidos con el número esperado por herencia mendeliana simple, en pares de hermanos enteros; (3) análisis de ligamiento, el cual incorpora los efectos de recombinación en las generaciones anteriores para determinar la localización génica.

Si bien los métodos mencionados son de gran utilidad en la identificación de alelos de susceptibilidad a enfermedades, no son aplicables a todas las enfermedades infecciosas por razones logísticas. Si un gen candidato es identificado a través de estudios de alelos compartidos, análisis de ligamiento o de segregación, la evaluación final requerirá estudios de asociación con la enfermedad cuidadosamente diseñados, a fin de validar la asociación encontrada entre el gen estudiado y la enfermedad en cuestión.

Tanto una estrategia como la otra pueden utilizar diferentes diseños muestrales, tales como: (1) diseño de medio-hermanos (*Paternal half sibs*) o diseño de nietos (*Granddaughter Designs*), (2) líneas endocriadas (modelos murinos), (3) estudios de familias portadoras y (4) análisis poblacionales.

El cruzamiento de medio-hermanos paternos se basa en el estudio de la descendencia de machos heterocigotas para un locus determinado. Teniendo en cuenta el alelo que reciben del padre, las hijas pueden ser clasificadas en dos grupos de medio hermanas paternas (21, 23). Debido a que los alelos correspondientes a un locus marcan las regiones cromosómicas homólogas a las que se encuentran ligados, pueden ser usados en este sentido como MG. Si el marcador se encuentra estrechamente ligado al carácter en estudio, al recibir un alelo determinado del padre las crías heredan simultáneamente una de las dos posibles regiones cromosómicas homólogas que incluyen el carácter. De esta manera, los dos grupos de medias hermanas paternas deberían diferenciarse para el carácter. Por lo dicho anteriormente, sólo serán informativos aquellos machos que sean heterocigotas para ambos loci.

El método denominado "Diseño de Nietas" se basa en la caracterización de los hijos de machos heterocigotas para un determinado marcador. Los hijos se dividen en dos grupos de acuerdo al alelo que hayan recibido del macho. Posteriormente, los son hijos evaluados a partir de la producción de sus respectivas hijas (por ejemplo, mediante los valores de cría).

En el diseño que emplea líneas endocriadas para identificar genes de susceptibilidad a enfermedades se tipifican cepas endocriadas de roedores después de haber estado expuestas a una infección con el fin de obtener fenotipos extremos. Se determina si el fenotipo en particular es dominante o recesivo en los cruzamientos F1 en los cuales todos los individuos son heterocigotas, habiendo heredado un cromosoma de cada una de las cepas parentales endocriadas. Por lo tanto, el fenotipo de la enfermedad debería ser homogéneo. Posteriormente se realizan cruzamientos entre hermanos, o retrocruzamientos con uno de los parentales con el fin de producir cepas con genotipos y fenotipos variables como resultado de la recombinación cromosómica.

Cuando se utiliza el diseño de familias portadoras se considera que en determinadas regiones cromosómicas pueden existir numerosos genes estrechamente ligados, los cuales se transmiten juntos como haplotipos (Figura 1). Como se observa en el esquema, los individuos tienen dos haplotipos (denotados por letras mayúsculas), uno en cada cromosoma homólogo, entonces, un hijo recibe un haplotipo de cada parental y existe una probabilidad del 25% de que dos crías de los mismos parentales hereden el mismo haplotipo. En circunstancias extremadamente raras un padre puede transmitir un haplotipo recombinante a la descendencia. Estas características hacen posible la detección de genes de susceptibilidad/resistencia al analizar los alelos o haplotipos compartidos en los individuos enfermos (haplotipos sombreados).

Numerosos trabajos realizados para mapear marcadores en especies domésticas, han sido realizados dentro de poblaciones de una misma raza, es decir, por Cruzamientos de Poblaciones Segregantes. Sin embargo, cuando poblaciones pertenecientes a diferentes razas difieren para cierto carácter, y por lo tanto para los marcadores, la cruce entre ambos grupos puede resultar de gran utilidad en el mapeo de dichos marcadores (Figura 2).

Beckmann y Soller (24) demostraron que es posible estudiar el ligamiento marcador-carácter siguiendo la cosegregación del marcador y del carácter dentro de cada familia. Para marcadores multialélicos, esta clase de análisis tiene el mismo poder de resolución que la cruce entre líneas puras. A modo de ejemplo pueden citarse el cruzamiento de N'Dama y Zebu para mapear QTLs asociados con resistencia/susceptibilidad a la tripanosomiasis (25, 27).

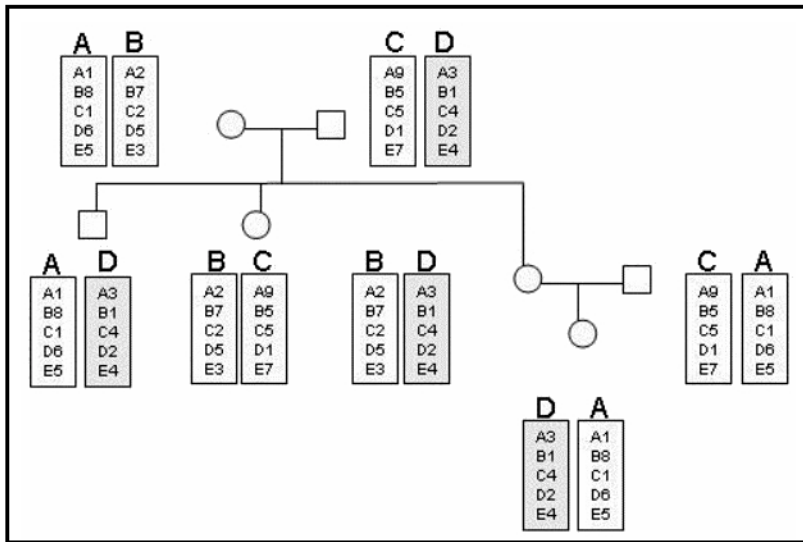


Figura 1. Ejemplo de diseño de familias portadoras para detección de genes de susceptibilidad/resistencia.
 Figure 1. Example of the carrier families design for the detection of resistance/susceptibility genes

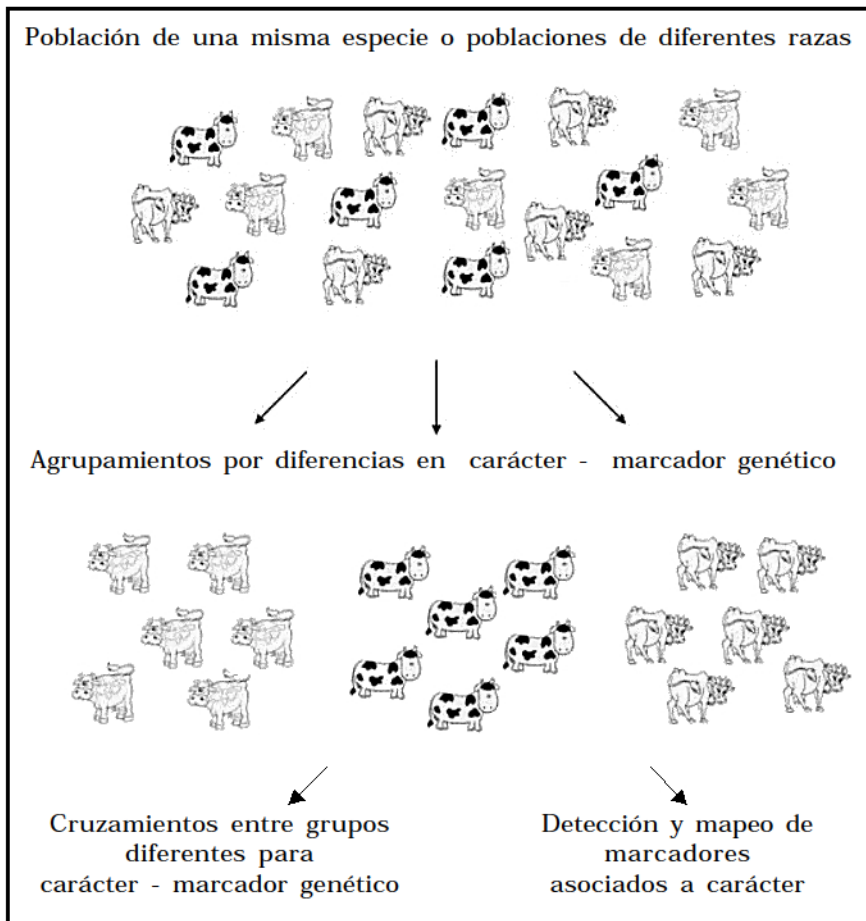


Figura 2. Ejemplo del diseño muestral de Cruzamientos de Poblaciones Segregantes o de Tipificación Selectiva para detección de genes de susceptibilidad/resistencia.
 Figure 2. Example of the segregating populations design or the selective typing for the detection of resistance/susceptibility genes.

Dentro del análisis a nivel de poblaciones se puede aplicar el método de Tipificación Selectiva (*Selective Genotyping*). Este método se basa en realizar cruzamientos en poblaciones que difieren para cierto carácter y por lo tanto para los marcadores genéticos. Se seleccionan aquellos animales que se encuentran en los extremos de la distribución para el carácter de interés, y posteriormente se tipifican los marcadores genéticos (Figura 2). Por lo tanto, la cruce entre diferentes grupos puede resultar útil en el mapeo de los marcadores relacionados a susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas, dado que una diferencia significativa entre las frecuencias génicas de las colas de la distribución (susceptibilidad/resistencia) en la F2 o en la población base puede servir como test para el ligamiento marcador-carácter.

Esta metodología se fundamenta en el hecho de que la selección sobre un carácter podría cambiar las frecuencias génicas en la población segregante. Una diferencia significativa entre las frecuencias génicas de las colas de la distribución (susceptibilidad/resistencia) en la F2 o en la población base puede servir como test para el ligamiento marcador-carácter (28, 29).

Dentro de una raza el mapeo puede realizarse también por el método «Idéntico por Descendencia (*IBD Identical-by-Descent*)». La importancia de esta estrategia radica en que permite mapear, tanto en animales domésticos como en el hombre, los genes causantes de enfermedades genéticas utilizando un número limitado de descendientes afectados que comparten un antecesor común. De esta manera, detectando el segmento cromosómico que comparten los individuos afectados, no es necesario realizar los clásicos cruzamientos utilizados en los análisis de ligamientos, reduciendo el tiempo y costo que requiere aquella estrategia.

Un ejemplo de la utilidad de esta metodología para el mapeo de enfermedades genéticas es la investigación realizada por Charlier y col. (30). Con el fin de localizar el gen causante del pie de mula en la raza bovina Holstein Friesian examinaron el pedigrí de 12 individuos afectados. Utilizando 213 microsatélites, los autores observaron que todos los individuos analizados compartían un mismo segmento del cromosoma 15, el cual provenía de un ancestro común.

En las tablas I y II se detallan los principales métodos empleados y programas de com-

putación disponibles para el análisis de desequilibrio de ligamiento.

LOS GENES DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) COMO CANDIDATOS PARA ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES INFECCIOSAS

La resistencia genética es un rasgo multigénico, es decir, determinado por muchos genes, entre los cuales se encuentran los que codifican las moléculas que forman parte del sistema inmune.

La diversidad de las proteínas codificadas en el MHC se debe al polimorfismo de los genes que se encuentran en este complejo. Esta diversidad genética sería la responsable de la variación genotípica en la resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas. Los loci del MHC desempeñan un rol central en la respuesta inmune, por lo que constituyen genes candidatos para el estudio de asociación entre marcadores genéticos y resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

Este complejo consiste en un bloque de ligamiento formado por más de 100 genes involucrados en su mayoría, en la respuesta inmunitaria. Entre ellos podemos nombrar los genes presentadores de antígeno (Clase I y II), los procesadores de antígeno, los del sistema del Complemento (Clase III) y genes relacionados como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF). La variabilidad genética en esta región se ve determinada por un alto número de alelos, presencia de varias copias de cada gen, número variable de genes en los distintos haplotipos y variaciones alélicas en la región de control de la expresión (promotor). En numerosos estudios se ha demostrado que las variaciones en la respuesta inmune dependen tanto de las mutaciones en las regiones promotoras de genes de histocompatibilidad, las cuales modifican los niveles de transcripción, como del polimorfismo en la región de unión al antígeno (*Antigen Recognition Site, ARS*) de las glicoproteínas de Clase I y II, que determinan su afinidad con los antígenos. También, los genes de citoquinas se consideran importantes genes candidatos para investigar susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas, ya que en las especies estudiadas se han identificado polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) asociados a la susceptibilidad/resistencia. Estos altos niveles de polimorfismo han permitido el desarrollo de MG asociados a enfermedades infecciosas para ser utili-

Tabla I. Breve descripción de algunos de los métodos utilizados comúnmente para la estimación de desequilibrio de ligamiento (LD).

Table I. Short description of some of the usual methods employed to estimate linkage disequilibrium (LD).

Método	Características
<i>Transmission Disequilibrium Test</i> (TDT)	Medida más comúnmente usada, no es afectada por estratificación poblacional, usa genotipos parentales heterocigotas.
<i>Haplotype Relative Risk</i> (HRR) "Riesgo relativo"	Estima frecuencias alélicas transmitidas por los genotipos parentales homocigotas y heterocigotas; es útil para muestras de ADN agrupadas. Es sensible a estratificación poblacional.
<i>Multilocus composite likelihood approaches</i>	Utiliza múltiples marcadores incrementando el poder de detección de desequilibrio de ligamiento.
<i>Haplotype segment sharing method</i>	Considera la covarianza entre loci marcadores; sensible a heterogeneidad alélica.

Tabla II. Software disponible para análisis de desequilibrio de ligamiento (LD).

Table II. Available software for linkage disequilibrium (LD) analysis.

Programa	Descripción	Página Web	Referencia
ALLASS	Estimación de LD compuesto para datos multilocus usando la ecuación de Malécot.	http://cedar.genetics.soton.ac.uk/7pub7PROGRAM/ALLAS	(43)
ARLEQUIN	Paquete de análisis genético poblacional que incluye estimación de haplotipos por el algoritmo EM y análisis de LD para pares de loci; estima significancia por método permutación.	http://anthro.unige.ch/arlequin/	(44) (45)
DISEQ	Estimación de desequilibrio multilocus.	ftp://linkage.cpmc.columbia.edu/software/diseq	(46)
DMAP	Estimación de likelihood compuesta para múltiples datos.	http://lib.stat.cmu.edu/-bdevlin/	(47)
ETDT	Usa regresión logística para TDT para marcadores multialélicos	http://www.gene.ucl.ac.uk/dcurtis/software.hym1	(48)
FINEMAP	Estima árboles filogenéticos para enfermedades multilocus y haplotipos normales para inferir localización del gen de la enfermedad.	http://www.stat.cmu.edu/cmu-stats/	(49)
GASSOC	Realiza varios test de asociación, incluyendo TDT para múltiples marcadores.	http://www.mayo.edu/statgen	(50)
GDA	Análisis genético poblacional. Incluye estimación de LD para pares de loci, test de significancia por método de permutación.	http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/	(51)
QTDT	Realiza test de asociación y TDT para rasgos cuantitativos usando método de componentes de varianza.	http://eee.well.ox.ac.uk/ashtma/QTDT	(52)
TDT/S-TDT	TDT y sib-TDT.	http://spielman07.med.upenn.edu/TDT.htm	(53) (54)
TRIMHAP	Análisis de haplotipos compartidos para estimación de localización de genes de enfermedades.	http://www.vipbg.vcu.edu/trimhap	(55)

zados en su control sanitario y erradicación. La mayoría de los estudios de asociaciones con los polimorfismos de los genes de Clase I, Clase II y citoquinas se realizaron en enfermedades humanas y en algunos animales domésticos (1, 18).

EJEMPLOS DE ASOCIACIÓN DE GENES CANDIDATOS DEL MHC CON SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDADES

Numerosos autores han llevado a cabo estudios de asociación entre genes del MHC y resistencia/susceptibilidad a diversas enfermedades infecciosas, principalmente aquellas responsables de importantes pérdidas económicas. Entre los ejemplos más relevantes podemos citar los siguientes trabajos:

Equinos

Una de las asociaciones más fuertes identificadas en equinos (1, 2) en estudios del MHC equino (ELA, *equine leukocyte antigen*) y la susceptibilidad/resistencia corresponde a la patogénesis del tumor de piel común o sarcoiditis. Estos tumores son de ocurrencia común en caballos y son causados por un virus relacionado al virus del papiloma bovino (BPV).

Las investigaciones realizadas desde la década de 1980 involucraron el análisis de los genes del ELA de Clase I y Clase II en varias razas de caballos. Los resultados determinaron, por una parte, altas frecuencias de alelos ELA-A3 (Clase I) y ELA W13 (Clase II) en caballos afectados con tumores, en comparación a los controles sanos. Por otra parte, entre las diferentes razas analizadas se evidenció distinta incidencia de tumores debido, probablemente, a la distribución diferencial de los alelos entre razas. Sin embargo, la susceptibilidad no se debería solamente a la presencia de los alelos ELA-A3 y ELA W13, sino a una combinación de genes (haplotipo) que acompaña a estos alelos y aún de otros genes ligados al MHC. Dado que estas investigaciones se realizaron mediante determinaciones serológicas, es muy probable que un estudio molecular por genes candidatos revele una asociación aún más estrecha entre determinados alelos y la susceptibilidad a sarcoiditis.

Otros ejemplos son las relaciones entre algunos haplotipos del ELA y la hipersensibilidad dérmica a insectos, la influencia de diferencias antigénicas en la fertilidad, la relación de fenotipos de transferrinas y ELA con el grado de deterioro endometrial en yeguas gestan-

tes (31, 33). Investigaciones de posibles asociaciones entre antígenos de Clase I del MHC y niveles de IgE específicos demostraron una asociación significativa entre ELA-A8 y títulos indetectables de IgE contra las cepas de *Aspergillus fumigatus* rAsp f 7 y rAsp f 8. También, se demostraron asociaciones significativas entre ELA-A1 y altos niveles específicos de IgE, entre ELA-A14 y bajos niveles de IgE, y entre ELA-Be27 y bajos niveles de IgE de *Aspergillus*-específico (12). En un estudio más reciente se demostró, además, la asociación entre tipos de transferrina y la muerte de los potros causada por la infección por *Rhodococcus equi* (15).

Bovinos

La leucosis bovina es una enfermedad de importancia económica y de distribución mundial producida por el virus de la leucosis bovina. El desarrollo de esta enfermedad se encuentra bajo control genético, íntimamente ligado al polimorfismo del MHC bovino, y presenta tres estadios: (1) Producción de anticuerpos contra antígenos virales (seroconversión); (2) Aumento significativo y persistente del número de linfocitos B (linfocitosis persistente); (3) Linfosarcoma.

En 1986, Lewin y Bernoco (3) estudiaron la asociación entre el BoLA (*bovine lymphocyte antigen*) Clase I y la progresión de la enfermedad en un rodeo Shorton californiano (n=117). La tipificación del BoLA Clase I se realizó mediante serología. El estudio se realizó a nivel rodeo y a nivel familia. A nivel rodeo se detectaron 60 vacas seropositivas, y entre ellas, aquellas con el haplotipo BoLA-w8 presentaron aumento de la susceptibilidad y mayor frecuencia de linfocitosis persistente. Los animales con el haplotipo BoLA-DA7 y BoLA-DA6.2 presentaron una menor frecuencia de linfocitosis persistente.

A nivel familia se estudió la segregación alélica en una familia de medio hermanas paternas y se observó que las vacas que heredaron el haplotipo DA 12.3 eran susceptibles a la linfocitosis persistente, mientras que las vacas con el haplotipo DA7 exhibían resistencia a linfocitosis persistente.

En 1996, Zanotti y colaboradores (5) analizaron la influencia del polimorfismo del MHC sobre la progresión subclínica del virus de la leucosis bovina en 2 rodeos italianos de vacas Holstein (n=41). Estos autores estudiaron el BoLA-A por serología, el BoLA-DQ por RFLP y el BoLA-DR por PRC-RFLP. A partir de estos análisis comprobaron que el haplotipo

DQA*12-DQB*12-DRB2*3A-DRB3.2*8 se encontraba asociado a susceptibilidad a la leucosis, mientras que el haplotipo DQA*3A-DQB*3A-DRB2*2A-DRB3.2*11 se asoció con resistencia a la enfermedad.

Por otra parte, el análisis de la secuencia nucleotídica del segundo exón de los alelos DRB3 reveló que los alelos asociados con resistencia presentaban en las posiciones 70 y 71 del dominio b1 del ABS (*Antigen Binding Site*) ácido glutámico y arginina, respectivamente.

Este estudio dejó en evidencia el papel principal del BoLA-DRB3 en la progresión subclínica de la infección con el virus de la leucosis bovina, que estaría dado a nivel de la presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T helper.

La enfermedad conocida como Mastitis Bovina es producida principalmente por *Staphylococcus aureus*. Es una de las enfermedades más frecuentes en el ganado bovino lechero y la que ocasiona las mayores pérdidas económicas.

En 1997, Kelm y col (8) estudiaron la relación entre medidas genéticas de mastitis (número de células somáticas, SCS) y parámetros inmunológicos (marcadores moleculares BoLA-DRB3.2) en vacas Holstein de Estados Unidos (n=137). El BoLA-DRB3.2 se analizó por PCR-RFLP (con las enzimas de restricción RsaI, HaeIII y BstYI). El SCS se utilizó como parámetro ya que existe una alta correlación entre la ocurrencia de mastitis y SCS. Los autores encontraron que el alelo DRB3.2*16 se asociaba con SCS elevado, mientras que el DRB3.2*24 se asociaba con SCS bajo. Por otro lado, Dietz y colaboradores (10) también encontraron asociación entre el alelo DRB3.2*16 y SCS alto. Ambos estudios evidenciaron la utilidad de los alelos del BoLA-DRB3 como marcadores de la resistencia/susceptibilidad a mastitis.

Sharif y col. (11) también analizaron la asociación entre los alelos del BoLA-DRB3 y el SCS como medida de mastitis en un rodeo canadiense de vacas Holstein (n=835). Ellos detectaron asociación entre el alelo DRB3.2*16 con bajos SCS, y entre el alelo DRB3.2*23 con casos de mastitis severos.

La discrepancia observada entre los trabajos de Kelm y Dietz, con el de Sharif podría deberse al diseño experimental, a la variable dependiente utilizada (SCS), a la pre-

sencia de distintos patógenos, al background genético, factores ambientales, etc.

Park y colaboradores (17) realizaron uno de los últimos estudios acerca de la posible asociación entre resistencia/susceptibilidad a mastitis producida por *S. aureus* y genes del MHC. Los autores reportaron una estrecha asociación entre el haplotipo de Clase IIa DH24A y susceptibilidad a mastitis, mientras que los haplotipos DH16A y DH08A se encontraron asociados con resistencia a la enfermedad.

La Dermatofilia Bovina es una enfermedad de la piel causada por el patógeno *Dermatophilus congolensis* asociada con la garrapata *Amblyomma variegatum*. Produce importantes pérdidas en la producción y presenta una tasa de mortalidad del 15%.

Maillard y col. (14) analizaron varios loci del MHC bovino para identificar marcadores moleculares asociados con resistencia/susceptibilidad a dermatofilia. Los autores estudiaron dos grupos extremos de animales Brahman zebú de la isla de Martinica no relacionados y en las mismas condiciones ambientales: 61 animales que nunca enfermaron y 62 animales con signos clínicos severos. Los haplotipos DRB3.2*9 y DQB*1804 se encontraron significativamente asociados con alta susceptibilidad a la enfermedad. Esta asociación se validó en otras poblaciones de ganado de la misma raza y en otras razas de otras partes del mundo. A partir de estos resultados se realizó en la isla de Martinica un programa de selección asistida durante el cual se eliminaron los individuos que tenían el haplotipo asociado a susceptibilidad. De esta manera se logró reducir la prevalencia de la enfermedad del 76%, en 1996 a menos del 2%, en el 2001.

En otro tipo de estudio, Acosta-Rodríguez y coautores (18) analizaron la posible participación de los genes del MHC en la infestación con garrapatas *Boophilus microplus* mediante el estudio de microsatélites de Clase II. Las pérdidas causadas por esta garrapata han sido estimadas en cien millones de dólares por año en Australia, y en un billón de dólares por año en América Central y Sudamérica. Los autores reportaron la existencia de asociación entre cuatro microsatélites del BoLA Clase II y susceptibilidad a la infestación con garrapatas *Boophilus microplus*. Este estudio evidenció la participación, al menos parcialmente, de varios alelos de Clase II del BoLA en la susceptibilidad a la infestación con garrapatas.

Ovinos

La parasitosis en el ganado ovino es una de las principales causas de pérdidas económicas. En 1996, Outteridge y colaboradores (6) estudiaron la posible asociación entre los polimorfismos del MHC ovino (OLA, Ovine Leukocyte Antigen) y las variaciones en la resistencia a parásitos intestinales, principalmente nematodos. Para llevar a cabo este estudio los autores se basaron en el hecho que los genes del DRB se encuentran en la región de Clase II del MHC, y en la existencia de una relación inversa entre el nivel de anticuerpos y el número de huevos de parásitos en las heces de este modo la resistencia/susceptibilidad a los parásitos podría ser determinada por el polimorfismo del DRB.

El estudio se realizó en tres familias de ovejas Merino (n=130) de Australia. Los autores tipificaron un microsatélite intrónico estrechamente ligado al exón 2 del DRB ovino mediante PCR y midieron los niveles de anticuerpos contra los parásitos y el número de huevos en la materia fecal. Si bien se encontró asociación entre altos niveles de anticuerpos, bajo número de huevos en materia fecal y polimorfismo del DRB, los autores resaltan la necesidad de realizar estudios adicionales para confirmar las asociaciones observadas.

Caninos

La leishmaniasis es una enfermedad que afecta a perros, humanos y otros animales causada por el parásito intracelular *Leishmania infantum*. El perro doméstico es el principal reservorio para la infección humana.

Quinnell y colaboradores (16) analizaron la asociación entre los genes del DLA (*Dog Leukocyte Antigen*) Clase II del perro DLA-DRB1, -DQA1 y -DQB1 y el curso de la enfermedad en perros expuestos a infección natural con *Leishmania infantum* en Brasil. El estudio incluyó 99 perros de la ciudad de Belém (zona no endémica) que fueron llevados a Marajó (zona endémica), y 27 perros nacidos en Marajó.

La tipificación de los genes DLA-DRB1, -DQA1 y -DQB1 se efectuó por secuenciación directa. La detección del parásito se realizó por PCR a partir de biopsias de médula ósea y se midieron los niveles de IgG. Finalmente, los autores encontraron una asociación significativa entre la presencia del alelo DRB1*01502 y la susceptibilidad a leishmaniasis en perros, pero no se detectaron asociaciones con DQA1 y DQB1.

Aves

La enfermedad de Marek en pollos es causada por un herpes virus. Puede manifestarse en una forma nerviosa (ataca los nervios, especialmente el nervio ciático) o visceral (tumores en hígado, ovario, riñón, bazo y corazón) y produce importantes pérdidas económicas.

En 1997, Kaufman y Salomonsen (9) encontraron una asociación significativa entre el haplotipo B21 de Clase I del MHC del pollo y la resistencia a la enfermedad, mientras que el haplotipo más susceptible fue el B19.

Estado actual de las investigaciones en susceptibilidad/resistencia genética a enfermedades infecciosas en la Argentina

Si bien en la Argentina, esta área del conocimiento no está muy desarrollada, existen actualmente líneas de investigaciones tendientes a caracterizar los genes del MHC de diferentes especies domésticas y a determinar asociaciones entre dichos loci y susceptibilidad/resistencia a enfermedades infecciosas. Así por ejemplo, en el Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGIBA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, en estudios anteriores se analizó la variabilidad genética de genes del MHC en razas bovinas, equinas y caninas y actualmente se están llevando a cabo investigaciones de las posibles asociaciones entre genes candidatos del MHC y enfermedades tales como demodicosis juvenil generalizada canina y arteritis viral equina (AVE) (36-40). Por otra parte, en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Buenos Aires se están estudiando los genes de MHC de aves de corral (41, 42).

ASOCIACIÓN CON GENES QUE NO PERTENECEN AL MHC

En la respuesta inmune intervienen los productos de numerosos genes, muchos de los cuales no pertenecen al MHC. En los últimos años, varios loci involucrados en la respuesta inmune han sido estudiados con el objeto de determinar su asociación con susceptibilidad/resistencia a determinadas enfermedades infecciosas. A modo de ejemplo, pueden mencionarse el gen que codifica para la proteína 1 de macrófagos asociada a resistencia natural o *Nramp1* (7, 13), los genes para inmunoglobulinas y genes del receptor de células T (3).

PERSPECTIVAS FUTURAS

Si bien los antibióticos son efectivos en el control de varias enfermedades, su uso a lo largo del tiempo puede desarrollar resistencia a la droga por parte de los patógenos. Además, el uso masivo de antibióticos es cada vez menos aceptado por los consumidores, quienes exigen productos libres de residuos.

Otras enfermedades pueden ser controladas a través de la utilización de vacunas. Sin embargo, las vacunas atenuadas, tradicionalmente empleadas, a veces proveen una protección incompleta y en el caso de las vacunas pobremente inactivadas pueden causar la enfermedad que tendrían que prevenir (Roslin Institute, Annual Report 2000-2001, <http://www.roslin.ac.uk/>).

La selección de animales resistentes a enfermedades es posible, pero tradicionalmente los criadores se han concentrado en mejorar los caracteres de producción, por lo que la información acerca de la variación genética en resistencia a enfermedades es limitada.

En los últimos años el crecimiento de la biotecnología está permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias para el control de enfermedades. En este contexto, ya se están utilizando rutinariamente los marcadores moleculares para la selección de animales resistentes a enfermedades. Por otra parte, a través de la tecnología recombinante, se están desarrollando nuevas vacunas basadas en la estructura de las moléculas de reconocimiento y presentadoras de antígenos y en la información obtenida a partir de los estudios de asociación en las diferentes especies estudiadas. Sin embargo, aún es necesario obtener una mejor comprensión de la genética y de la función del sistema inmune del huésped y de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte del patógeno, para que la biología molecular tenga un mayor impacto en el control de las enfermedades animales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lazary S, Gerber H, Glatt PA, Straub R. Equine leucocyte antigens in sarcoid-affected horses. *Equine Vet J* 1985; 17 (4): 283-286.
2. Meredith D, Elser AH, Wolf B, Soma LR, Donawick WJ, Lazary S. Equine leukocyte antigens: relationships with sarcoid tumors and laminitis in two pure breeds. *Immunogenetics* 1986; 23 (4): 221-225.
3. Lewin HA, Bernoco D. Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection. *Anim Genet* 1986; 17 (3): 197-207.
4. Blattman AN, Hulme DJ, Kinghorn BP, Woolaston

RR, Gray GD, Beh KJ. A search for associations between major histocompatibility complex restriction fragment length polymorphism bands and resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Anim Genet* 1993 24 (4): 277-282.

5. Zanotti M, Poli G, Ponti W, Polli M, Rocchi M, Bolzani E, Longeri M, Russo S, Lewin HA, van Eijk MJ. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genet* 1996; 27 (5): 337-341.

6. Outteridge PM, Andersson L, Douch PG, Green RS, Gwakisa PS, Hohenhaus MA, Mikko S. The PCR typing of MHC-DRB genes in the sheep using primers for an intronic microsatellite: application to nematode parasite resistance. *Immunol Cell Biol* 1996; 74 (4): 330-336.

7. Feng J, Li Y, Hashad M, Schurr E, Gros P, Adams LG, Templeton JW. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene. *Genome Res.* 1996 6 (10):956-964.

8. Kelm SC, Dettleux JC, Freeman AE, Kehrli ME Jr, Dietz AB, Fox LK, Butler JE, Kasckovics I, Kelley DH. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *J Dairy Sci* 1997; 80 (8):1767-1775.

9. Kaufman J, Salomonsen J. The "minimal essential MHC" revisited: both peptide-binding and cell surface expression level of MHC molecules are polymorphisms selected by pathogens in chickens. *Hereditas* 1997; 127 (1-2): 67-73.

10. Dietz AB, Cohen ND, Timms L, Kehrli ME Jr. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; 80 (2):406-412.

11. Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JC, Leslie KE. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim Genet* 1998; 29 (3):185-193.

12. Eder C, Curik I, Brem G, Cramer R, Bodo I, Habe F, Lazary S, Solkner J, Marti E. Influence of environmental and genetic factors on allergen-specific immunoglobulin-E levels in sera from Lipizzan horses. *Equine Vet J* 2001; 33 (7): 714-720.

13. Matiasovic J, Kubickova S, Musilova P, Rubes J, Horin P. Characterization of the NRAMP1 (SLC11A1) gene in the horse (*Equus caballus* L.). *Eur J Immunogenet* 2002 29 (5): 423-429.

14. Maillard JC, Chantal I, Berthier D, Thevenon S, Sidibe I, Razafindraibe H. Molecular immunogenetics in susceptibility to bovine dermatophilosis: a candidate gene approach and a concrete field application. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 969: 92-96.

15. Mousel MR, Harrison L, Donahue JM, Bailey E. *Rhodococcus equi* and genetic susceptibility: assessing transferrin genotypes from paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15 (5): 470-472.

16. Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, Ollier WE. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 2003; 55 (1):23-28.
17. Park YH, Joo YS, Park JY, Moon JS, Kim SH, Kwon NH, Ahn JS, Davis WC, Davies CJ. Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *J Vet Sci* 2004; 5 (1): 29-39.
18. Acosta-Rodriguez R, Alonso-Morales R, Balladares S, Flores-Aguilar H, Garcia-Vazquez Z, Gorodezky C. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Vet Parasitol* 2005; 127 (3-4): 313-321.
19. Hill A. Host genetics of infectious diseases: Old and new approaches converge. *Emerging Infectious Diseases*. 1998; 4 (4): 695-697.
20. Thursz M. Genetic susceptibility in infectious diseases. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2000; 17: 253-264.
21. Geldermann H. Investigation on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. 1. Methods. *Theor. Appl. Genet* 1975; 46: 319-330.
22. Geldermann H. Biochemische Aspekte in der Haustier Genetik. 2. Zielrichtungen biochemisch-genetischer Arbeiten in der Haustiergenetik. *Züchtungskunde* 1976; 48: 339-361.
23. Geldermann, H, Piepper U, Roth YB. Effects of marked chromosome sections on milk performance in cattle. *Theor. Appl. Genet* 1985; 70: 138-146.
24. Beckmann, JS, Soller M. Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. *Theor. Applied Genetics* 1988; 76: 228-236.
25. Soller, M, JS Beckmann. Toward and understanding of the genetic basis of trypanotolerance in the N'Dama cattle of West Africa. Consultation Report submitted to FAO, Rome (March, 1987), pp 47.
26. Andersson L, Haley CS, Ellegren H, Knott SA, Johansson M, Andersson K, Andersson-Eklund L, Edfors-Lilja I, Fredholm M, Hansson I, Hkansson J, Lundstrom YK. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 1994; 263: 1771-1774.
27. Hanotte O, Ronin Y, Agaba M, Nilsson P, Gelhaus A, Horstmann R, Sugimoto Y, Kemp S, Gibson J, Korol A, Soller M, Teale A. Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East African Boran cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100 (13): 7443-7448.
28. Stuber CW, Moll RH, Goodman MM, Shaffer HE, Weir BS. Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* 95: 225.
29. Soller M. Relative power of likelihood-ratio tests and AMOVA for detecting linkage between quantitative traits loci and marker loci. *Genetics* 1990; 126.
30. Charlier G, Farnir F, Berzi P, Vanmanshoven P, Brouwers B, Vromans H, Georges M. Identity-by-descent mapping of recessive traits in livestock: application to map the bovine syndactyly locus to chromosome 15. *Genome Res* 1996; 6: 580-589.
31. Brostrom H, Fahlbrink E, Dubath ML, Lazary S. Association between equine leucocyte antigens (ELA) and equine sarcoid tumors in the population of Swedish half-breds and some of their families. *Vet Immunol Immunopathol* 1988; 19 (3-4): 215-223.
32. Weitkamp LR, Kenney RM, Bailey E, MacCluer JW, Brown JS, Blanchard TL, Sertich PL, Love CC, Hunt PR. Pathological changes of the mare endometrium and genotypes for transferrin and ELA. *J Reprod Fertil Suppl* 1991; 44: 275-282.
33. Antczack DF. The Major Histocompatibility Complex of the Horse. 1992. *Equine Infectious Diseases VI*. Pag. 99.
34. Giovambattista G, Golijow CD, Dulout FN, Lojo MM. Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Anim Genet* 1996; 27 (1): 55-56.
35. Diaz S, Giovambattista G, Dulout FN, Peral-Garcia P. Genetic variation of the second exon of ELA-DRB genes in Argentine Creole horses. *Anim Genet* 2001; 32 (5): 257-63.
36. Ripoli MV, Diaz S, Peral-Garcia P, Giovambattista G. Nucleotide sequence of the upstream regulatory region of BoLA-DRB. *Eur J Immunogenet*. 2002; 29(6):537-40.
37. Villegas-Castagnasso EE, Diaz S, Giovambattista G, Dulout FN, Peral-Garcia P. Analysis of ELA-DQB exon 2 polymorphism in Argentine Creole horses by PCR-RFLP and PCR-SSCP. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003; 50 (6): 280-285.
38. Ripoli MV, Peral-Garcia P, Dulout FN, Giovambattista G. Polymorphism in the bovine BOLA-DRB3 upstream regulatory regions detected through PCR-SSCP and DNA sequencing. *Gene* 2004; 339: 71-78.
39. Ripoli MV, Liron JP, De Luca JC, Rojas F, Dulout FN, Giovambattista G. Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in Saavedreno Creole dairy cattle. *Biochem Genet* 2004; 42 (7-8): 231-240.
40. Diaz S, Giovambattista G, Peral-Garcia P. Polymorphisms of the upstream regulatory region of the major histocompatibility complex DRB genes in domestic horses. *Int J Immunogenet* 2005; 32 (2): 91-98.
41. Goto RM, Afanassieff M, Ha J, Iglesias GM, Ewald SJ, Briles WE, Miller MM. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) assays for major histocompatibility complex B genotyping in chickens. *Poult Sci* 2002 81 (12): 1832-1841.

42. Iglesias GM, Soria LA, Goto RM, Jar AM, Miquel MC, Lopez OJ, Miller MM. Genotypic variability at the major histocompatibility complex (B and Rfp-Y) in Camperos broiler chickens. *Anim Genet* 2003; 34 (2): 88-95.
43. Collins A, Morton NE. Mapping a disease locus by allelic association. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 95 (4): 1741-1745.
44. Schneider S, Roessli D, Excoffier, L. Arlequin: A Software for Population Genetics Data Analysis Ver 2.000. 1997. University of Geneva: Geneva, Switzerland.
45. Slatkin M, Excoffier L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity*. 1996; 76:377-83.
46. Terwilliger JD. A powerful likelihood method for the analysis of linkage disequilibrium between trait loci and one or more polymorphic marker loci. *Am J Hum Genet* 1995; 56 (3): 777-787.
47. Devlin B, Risch N, K Roeder. Disequilibrium mapping: composite likelihood for pairwise disequilibrium. *Genomics* 1996; 36 (1): 1-16.
48. Sham PC, Curtis D. An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann Hum Genet* 1995; 59: 323-336.
49. Lam JC, Roeder K, Devlin B. Haplotype fine mapping by evolutionary trees. *Am J Hum Genet* 2000; 66 (2): 659-673.
50. Schaid DJ. General score tests for associations of genetic markers with disease using cases and their parents. *Genet Epidemiol* 1996; 13 (5): 423-449.
51. Weir BS. Genetic data analysis II. Sinauer, Sunderland, Mass, 1996.
52. Abecasis GR, Cookson WO, Cardon LR. Pedigree tests of transmission disequilibrium. *Eur J Hum Genet* 2000; 8 (7): 545-551.
53. Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 1996; 59 (5): 983-989.
54. Spielman RS, Ewens WJ. A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 1998; 62 (2): 450-458.
55. MacLean CJ, Martin RB, Sham PC, Wang H, Straub RE, Kendler KS. The trimmed-haplotype test for linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 2000; 66 (3):1062-1075.

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

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

Normas generales de redacción

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

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

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

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

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

Normas particulares de redacción:

1.Trabajos de investigación:

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

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

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

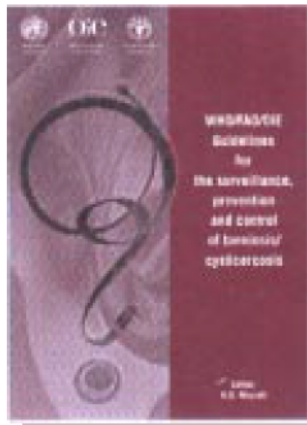
OIE/FAO/OIE

Organización Mundial de Sanidad Animal

Ha publicado los siguientes libros y revistas que pueden ser adquiridos a través de la OIE 12 rue de Prony, 75017, Paris, France.

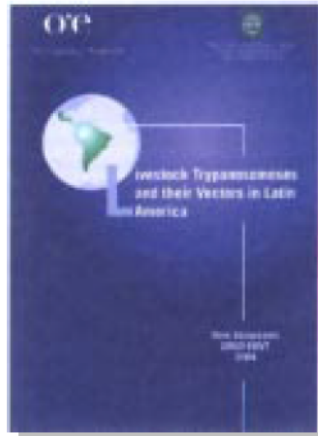
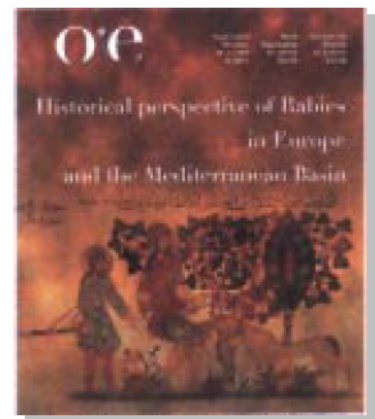
Fax: 33 (01) 1 42.67.09.87

E-mail: pub.sales@oie.int o consultarlas en www.oie.int



Directrices para la vigilancia, la prevención y el control de la teniasis/cisticercosis.
por K.D.Murrell *et al.*

Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin. por A.A. King y col.



Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. por Marc Desquesnes.

Revista científica y técnica de la OIE. Número pluritemático. Vol 23 (3) Diciembre de 2004.



Zoonosis y patógenos emergentes de importancia para la salud pública. L.J. King. editor.

