

Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias

ISSN 0365514-8 Versión Impresa
ISSN 1514-2590 Versión Electrónica
ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Volumen 36 n° 2 año 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

ANALECTA

VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA VOL. 36 nº 2 2016

Publicación de la

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

Autoridades

Decano

Dr. Claudio Barbeito

Vicedecano

Dr. Miguel Petruccelli

Secretaria de Asuntos Académicos

Dra. Vanina Cambiaggi

Secretario de Posgrado

Dr. Luzbel de la Sota

Secretario de Ciencia y Técnica

Dr. Enrique Portiansky

Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. Cecilia di Lorenzo

Secretaria de Extensión

Méd.Vet. Elena del Barrio

Secretaria de Asuntos Estudiantiles

Méd. Vet. Verano Gómez

Prosecretario de relaciones Institucionales

Ms. Sci. Julio Copes

Coordinador Académico de Campos Experimentales

Méd. Vet. Hugo Marcantoni

ANALECTA VETERINARIA

Editor Responsable

Dr. Claudio Barbeito

Editor Asociado

Dr. Enrique Portiansky

Director

Dr. Nestor Stanchi

Coordinador Editorial

Dr. Julio Idiart

Secretarias de Redacción

Dra. Mónica Diessler

Dra. Mariela Scrochi

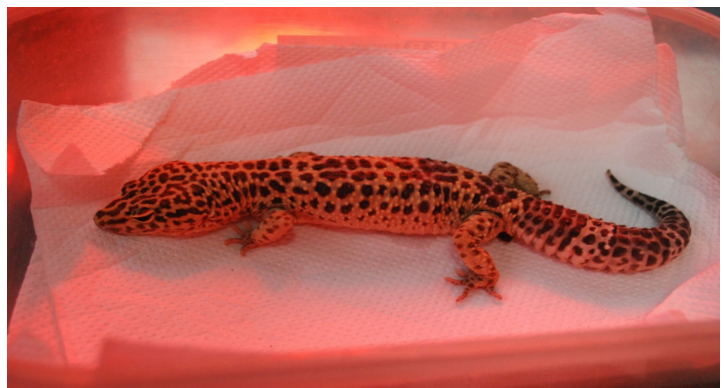


Foto de tapa: Gecko leopardo (*Eublepharis macularius*).
Lescano J, Quevedo M

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.

The Journal ANALECTA VETERINARIA is a biannual publication of the School of Veterinary Sciences of the National University of La Plata, Argentina. It is committed to the diffusion of scientific reports in the field of the Veterinary Sciences, generated both in this and in other institutions.

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&

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

ISSN 0365514-8 Versión Impresa

ISSN 1514-2590 Versión Electrónica

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

ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: 60 y 118 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

Comité Editorial

Dra. María Barrandeguy

Instituto de Virología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar, Argentina

Dr. Carlos Campero

Ex Investigador del INTA-Balcarce, Académico Correspondiente, Argentina

Dr. Rodolfo Cantet

Mejoramiento Genético Animal, Departamento de Producción Animal, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Dra. Cecilia Furnus

Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N Dulout", Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Dr. Mauricio Giuliadori

Fisiología y Patología Médica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Dr. Carlos Lanusse

Fisiología y Farmacología Veterinaria, Depto. de Fisiopatología, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

Dr. Antonio Javier Masot Gómez-Landero

Anatomía y Anatomía Patológica Comparada, Departamento de Medicina Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Extremadura, España

Dr. Martí Pumarola i Batle

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Barcelona, España

Dr. Francisco Reynaldi

Micología Médica e Industrial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Revisor del idioma inglés

Dr. Pablo Martino

Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

Evaluadores de trabajos de

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA convoca para la evaluación de sus artículos a reconocidos profesionales con amplia trayectoria en las diferentes disciplinas que contemplan las Ciencias Veterinarias.

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

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

VETERINARIA.

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

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

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 EF *et al.* 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

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas

LATINDEX (www.latindex.unam.mx),

Ulrich's International Periodicals Directory

(www.ulrichsweb.com)

Zoological Records

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

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

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

Directory of Open Access Journals

<http://www.doaj.org/>

Las opiniones expresadas por los autores 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 método 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 tiene como único objetivo facilitar la identificación de los productos mencionados 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

Diseño

Nestor Oscar Stanchi

ANALECTA VETERINARIA Vol 36 nº 1 2016

Artículos de investigación/Research articles

Evaluación de la actividad inhibitoria, *in vivo* e *in vitro*, del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y cinco diluyentes sobre cultivos de *Ascosphaera apis*

In vitro and *in vivo* evaluation of the inhibitory activity of *Cymbopogon citratus* essential oil and of five diluents on *Ascosphaera apis* cultures

Albo GN, Reynaldi FJ, Altamirano R, Vivot W, Córdoba SB

5-11

Estudio sobre alfabetización académica en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata

Study on the academic literacy at the School of Veterinary Sciences of the National University of La Plata

Santelices Iglesias OA, Migliorisi AL, Wright C, Nishida F, Grandinetti JAB, Paulovich FB, Saturno PD, Romero MA, López MA, Pachamé AV, Fernández PE, Fontana C, Zeinsteger P, Camiña AE, Gazzo S, Granero Agüero J, Barbeito CG

12-19

Flujo sanguíneo uterino durante el puerperio canino normal

Uterine blood flow during normal canine puerperium

Batista PR, Gobello C, Rodríguez R, Tórtora M, Corrada YA, Arias DO, Blanco PG

20-24

Comunicaciones cortas/Short communication

Descripción anatómica de los músculos masticadores de un ciervo axis (*Axis axis*)

Anatomical description of an axis deer (*Axis axis*) chewing muscles

Mateo AG, Sánchez HL

25-29

Revisiones/Reviews

Esporotricosis en caninos y felinos: hallazgos clínicos, métodos de diagnóstico y tratamiento

Canine and feline sporotrichosis: clinical findings, diagnostic methods and therapy

Martínez Cepeda GE

30-39

Artículos de investigación/Research articles

Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la frecuencia cardíaca y temperatura rectal en perros sanos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora

Effect of fish oil supplementation on heart rate and rectal temperature in healthy dogs during a treadmill training program

Pellegrino FJ, Risso A, Corrada Y

6-10

Análisis de la diversidad genética de una población de caballos Criollo Argentino mediante polimorfismos de nucleótido simple de los genes IL12B y TNF- α

Genetic diversity analysis of a Criollo Argentino horses population using single nucleotide polymorphisms of IL12B and TNF- α genes

Corbi Botto CM, Sadaba SA, Zappa ME, Peral García P, Díaz S

11-15

Daño en el ADN en leucocitos de equinos sometidos a esfuerzo físico

DNA damage in leukocytes of equines subjected to physical effort

Muriel M, Seoane A, Ferreira V, López R, Boffi FM, Picco SJ

16-22

Análisis espacial de los accidentes laborales *in itinere* en veterinarios de grandes animales en la provincia de Santa Fe

Spatial analysis of *in itinere* traffic injuries among veterinarians in Santa Fe province

Molineri AI, Signorini ML, Tarabla, HD

23-27

Revisiones/Reviews

Carbunco. Pasado y presente

Anthrax. Past and present

Bernagozzi JA, Barragán JH, Anselmino F

28-43

Descripción de casos/case report

Hemipenile prolapse and hemipenectomy in a leopard gecko (*Eublepharis macularius*)

Prolapso de hemipene y hemipenectomía en un gecko leopardo (*Eublepharis macularius*)

Lescano J, Quevedo M

44-48

Resúmenes de jornadas

Primera Jornada de Tecnologías de la Información y la Comunicación (TIC)

49-56

Experiencia en el uso de la Plataforma Moodle en dos cursos del primer año de la carrera de Medicina Veterinaria: Biología Celular y del Desarrollo e Histología. Alvarado Pinedo MF, González, NV, Flamini AM.

Uso de las redes sociales y de la plataforma Moodle para la implementación de un curso virtual para favorecer la retención de los alumnos de 1° año. Coll Cárdenas F, Olivera D, Piergiacomini V, Sánchez L, Alvarez MC, Laporte G, Marmunti M, Gavazza M, Palomo S, Savignone C, Fernández Blanco M, González Etchande B.

El audiovisual como herramienta pedagógica de integración en el curso de Economía General y Sociología. de la Arena G, Dumrauf S, Ateiro C, Fontana P, Urquiaga M, Saenz A, Alday JM, Perez Escalá S.

Microbiología Especial en un entorno virtual de enseñanza y aprendizaje. Gatti EM, Linzitto OR .

De las "Tecnologías de la Información y la Comunicación" a las "Tecnologías del Aprendizaje y el Conocimiento" en Microbiología Veterinaria. Gatti EM, Moredo FA, Stanchi NO.

Las TICs aplicadas al Curso de Microscopía Electrónica aplicada a la Investigación y el Diagnóstico. Jurado S, Peralta R, Faisal F, Queirel T.

Uso de TIC en un curso de grado de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. Kienast M, Saborido M, Acerbi F, Fusca A.

La simulación en la enseñanza de la inmunología veterinaria aplicada. de la Sota P, Astudillo G, Pardini Lais, Malbrán M, Mórtola E.

Aplicación del aprendizaje semipresencial (b-Learning): experiencia para el dictado de cursos optativos. Giacoboni G, Sguazza H, López C.

Apoyo del aula virtual en el dictado de cursos presenciales electivos/optativos. Giacoboni G Sguazza H, López C.

Soporte aula virtual Moodle: experiencia para el dictado del curso electivo Programa de Prerrequisitos y Bases para implementar Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP). Pellicer K, Aliverti F, Barbero R, Bignon G, Brusa V, de la Torre J, Lasta G, Leaden P, Ortega E, Salum L, Copes J.

Microscopía virtual como recurso didáctico en actividades presenciales. Santelices Iglesias OA, Wright C, Grandinetti JAB, Migliorisi AL, Paulovich FB, Saturno PD, Nishida F, Granero Agüero JM, Fontana C, Scenna GS, Sisti MS, Camiña AE, Portiansky EL.

Incorporación e impacto de nuevas herramientas de comunicación en el curso de Inmunobiología Animal Básica. Gos ML, Venturini MC, Campero LM, Rambeaud M, Pardini L, Dellarupe A, Bernstein M, Samus S, Miceli G, Larsen A, Serena S, Panei J, Mórtola E.

Curso de posgrado de Cardiología Clínica: Electrocardiografía y arritmias en pequeños animales online. Tórtora CM, Batista P, Arias DO.

Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la frecuencia cardíaca y temperatura rectal en perros sanos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora

Effect of fish oil supplementation on heart rate and rectal temperature in healthy dogs during a treadmill training program

Pellegrino FJ^{1,3*}, Riso A^{1,2,3}, Corrada Y^{1,3}

¹LAFIVET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP);

²IGEVET, FCV-UNLP; ³CONICET.

*Correo electrónico del autor: fpellegrino@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la frecuencia cardíaca y temperatura rectal en perros sanos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora. En un diseño experimental cruzado, 5 perros machos fueron asignados aleatoriamente a los grupos control y aceite de pescado, y recibieron diariamente 54 mg de aceite de pescado/kg de peso corporal^{0,75}. Todos fueron entrenados en cinta trotadora dos veces por semana durante 12 semanas. Cada sesión incluyó un total de 30 minutos a 8 km/h y 7,5% de pendiente. Se evaluó la frecuencia cardíaca previa, inmediatamente posterior y a los 5 minutos de finalizada cada sesión de entrenamiento. Se midió la temperatura rectal previa y posterior a cada sesión. En el grupo aceite de pescado, la frecuencia cardíaca y temperatura rectal posteriores a cada sesión de entrenamiento disminuyeron significativamente ($P < 0,01$) y se observó una tendencia de disminución en la frecuencia cardíaca post 5 min ($P = 0,07$). No se encontraron diferencias significativas entre grupos para la frecuencia cardíaca y temperatura rectal previas ($P > 0,1$). Los resultados obtenidos podrían reflejar una mejora en el rendimiento en perros suplementados con aceite de pescado durante el entrenamiento en cinta trotadora. Sin embargo, sería interesante realizar más estudios que permitan explicar los mecanismos por los cuales la suplementación con aceite de pescado podría mejorar el rendimiento en entrenamiento.

Palabras clave: canino, ácidos grasos omega 3, ejercicio, fisiología

Abstract: The aim of this study was to assess the effect of fish oil supplementation on heart rate and rectal temperature in healthy dogs during a treadmill training program. In a crossover experimental design, 5 male dogs were randomly assigned to control and fish oil groups, and received 54 mg fish oil/kg of body weight^{0.75} per day. All dogs were trained on a treadmill twice a week for 12 weeks. Each session was 30 minutes long, at 8 km/h speed and a 7.5% slope. Heart rate was assessed before, immediately after and 5 minutes after finishing each training session. Rectal temperature was measured before and after each session. In the fish oil group, heart rate and rectal temperature after each training session were significantly reduced ($P < 0.01$), and heart rate after 5 minutes showed a downward trend ($P = 0.07$). No significant differences were found between groups for previous heart rate and rectal temperature ($P > 0.1$). The results obtained might show an improvement in the performance of dogs receiving fish oil supplementation during treadmill training. However, it would be interesting to conduct further studies to explain the mechanisms by which fish oil supplementation might improve performance during training.

Key words: canine, omega 3 fatty acids, exercise, physiology

Introducción

En caninos, el ejercicio induce cambios en diferentes parámetros fisiológicos como la frecuencia cardíaca (FC) y la temperatura rectal (TR) (Ferasin y Marcora 2009; Piccione *et al.* 2012). Los cambios fisiológicos producidos durante el esfuerzo dependerán del tipo, duración e intensidad de la actividad física realizada, así como también del nivel de entrenamiento previo del animal (Piccione *et al.* 2012).

A pesar de los numerosos estudios que intentan esclarecer los cambios fisiológicos inducidos por el ejercicio en caninos, hasta el momento no se dispone de programas de entrenamiento específicos en cinta trotadora. Es por ello que los entrenadores necesitan de parámetros objetivos que permitan evaluar la condición física y así determinar la eficacia del programa de entrenamiento. La disminución de la FC, tanto en reposo como durante el ejercicio, ha sido reportada en perros (Stepien *et al.* 1998; Stuewe *et al.* 2000; Wyatt y Mitchell 1974), y es considerada un marcador cardíaco de adaptación en respuesta al entrenamiento aeróbico (Stuewe *et al.* 2000). Asimismo, la temperatura corporal es una importante medida fisiológica de la respuesta termorreguladora al esfuerzo (Angle y Gillete 2010), pudiendo ser estimada de forma precisa mediante termometría rectal (Greer *et al.* 2007). Por otra parte, en humanos y equinos la suplementación con aceite de pescado, como fuente de ácidos grasos omega 3, lleva a reducciones de la FC durante el ejercicio en cinta trotadora (Buckley *et al.* 2009; O'Connor *et al.* 2004).

Se ha propuesto que los ácidos grasos omega 3 pueden modular la variabilidad de la FC a nivel del sistema nervioso autónomo y del corazón (Christensen 2011). O'Connor *et al.* (2004), observaron que la suplementación con aceite de pescado tiende a disminuir el hematocrito en equinos durante el ejercicio en cinta trotadora, lo que llevaría a la disminución de la viscosidad sanguínea resultando en reducciones de la FC. Otros estudios en humanos han reportado que la suplementación con aceite de pescado disminuye el consumo de oxígeno durante el ejercicio (Peoples *et al.* 2008; Kawabata *et al.* 2014), donde la incorporación de ácidos grasos omega 3 en la membrana del eritrocito jugaría un rol fundamental (Kawabata *et al.* 2014). Así, la suplementación con aceite de pescado podría mejorar el rendimiento aeróbico durante el entrenamiento. Hasta el momento no existen comunicaciones sobre el tema en caninos.

Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la FC y TR en perros sanos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora.

Materiales y métodos

Animales

El presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la FCV-UNLP, La Plata, Argentina. Se incluyeron 5 perros machos clínicamente sanos, provenientes de propietarios particulares, de raza Weimaraner (n=1), Labrador retriever (n=1), Ovejero belga (n=1) y mestizos (n=2), de 2 a 5 años de edad y con un peso de 20 a 35 kg. Se realizó a cada animal un examen clínico y ortopédico completo para descartar posibles enfermedades. Antes de iniciar el estudio, los perros tuvieron un periodo de adaptación al uso de la cinta trotadora (DobleXX, Argentina) de cuatro semanas, dos veces por semana.

Diseño experimental y programa de entrenamiento

En un diseño experimental cruzado, los perros fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes grupos:

-Grupo control (C) = los perros recibieron una dieta control de alimento balanceado *Premium* durante 12 semanas.

-Grupo aceite de pescado (AP) = los perros recibieron la misma dieta y por igual tiempo que el grupo C, pero suplementada diariamente con cápsulas de digestión gástrica conteniendo aceite de pescado. Dosis: 54 mg de aceite de pescado/kg de peso metabólico (peso corporal^{0,75})/día.

Los perros que en el primer periodo estuvieron en el grupo C, en el segundo periodo se incorporaron al grupo AP. Los perros que en el primer periodo estuvieron en el grupo AP, en el segundo periodo se incorporaron al grupo C. Se incluyeron 8 semanas de descanso entre periodos, durante el cual los animales no recibieron entrenamiento ni suplementación.

Las raciones diarias de alimento balanceado para cada animal se calcularon sobre la base de los requerimientos energéticos de mantenimiento (MER) mediante la fórmula: MER = [130 kcal/kg/día x kg de peso metabólico] (National Research Council, 2006).

Se realizó un programa de entrenamiento en cinta trotadora de 12 semanas de duración, con una frecuencia de dos veces por semana. Cada sesión de entrenamiento incluyó un total de 30 minutos de trote a velocidad constante de 8 km/h con un grado de inclinación ascendente de la cinta del 7,5%.

Los perros permanecieron en los hogares de los propietarios durante todo el estudio. Los propietarios firmaron un consentimiento por escrito antes del experimento, aceptando administrar solamente la dieta control (C) o la dieta control con el suplemento (AP).

Parámetros evaluados

La FC en latidos por minuto fue evaluada mediante auscultación del área cardíaca, previa (FC-Pre) e inmediatamente posterior (FC-Post) a cada sesión de entrenamiento, y a los 5 minutos (FC-Post 5 min) de finalizada cada sesión para evaluar la fase de recuperación.

La TR fue medida mediante el uso de termómetro digital previa (TR-Pre) e inmediatamente posterior (TR-Post) a cada sesión de entrenamiento.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño cruzado con mediciones repetidas en el tiempo, en el que cada perro fue considerado una unidad experimental. Los datos fueron analizados con el ProcMixed de SAS (versión 9.0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El modelo mixto lineal incluye el efecto aleatorio de los perros, el periodo del diseño cruzado, el efecto fijo del tiempo, el tratamiento (C vs AP), la interacción tiempo por tratamiento y la interacción periodo por tratamiento. Los datos se representan como medias \pm el error estándar de las medias (SEM). Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$ y como tendencia un valor de $P < 0,10$.

Resultados

En el grupo AP, la FC-Post y la TR-Post disminuyeron significativamente a lo largo del programa de entrenamiento ($P < 0,05$), y se observó una tendencia de disminución en la FC-Post 5 min ($P = 0,07$). No se encontraron diferencias significativas entre grupos para la FC-Pre y la TR-Pre ($P > 0,1$) (Figuras 1 y 2).

Discusión

En el presente estudio, los perros suplementados con aceite de pescado tuvieron reducciones en la FC-Post pero no en la FC-Pre. El hecho de que no se encontraran diferencias entre grupos para la FC-Pre podría deberse a que la misma no sea reflejo de una verdadera FC en reposo, debido a la posible ansiedad de los perros a iniciar la sesión de entrenamiento, como se ha propuesto en humanos (Buckley et al. 2009). En los estudios llevados a cabo en humanos y equinos (Buckley et al. 2009; O'Connor et al. 2004), la suplementación con aceite de pescado produjo reducciones en la FC durante el ejercicio en cinta trotadora, pero no produjo efectos sobre la FC en reposo ni durante la fase de recuperación. Contrariamente, en el presente estudio se observó, durante la fase de recuperación, una tendencia de disminución de la FC-Post 5 min en el grupo AP. Estas diferencias quizás puedan deberse a los tiempos de suplementación, a los protocolos de entrenamiento utilizados o a diferentes respuestas biológicas propias de las especies bajo estudio. En los estudios antes mencionados los tiempos de suplementación fueron de 5 semanas en humanos (Buckley et al. 2009) y de 9 en equinos (O'Connor et al. 2004), siendo menores al del presente trabajo, lo que podría condicionar la respuesta biológica. Sin embargo, sería necesario aumentar la cantidad de animales para evaluar si la tendencia a una recuperación más pronta en el grupo AP podría deberse al efecto de la suplementación. Los valores más bajos de FC-Post en el grupo AP se correspondieron con menores valores de TR-Post, sugiriendo una mejor respuesta termorreguladora y un mayor rendimiento

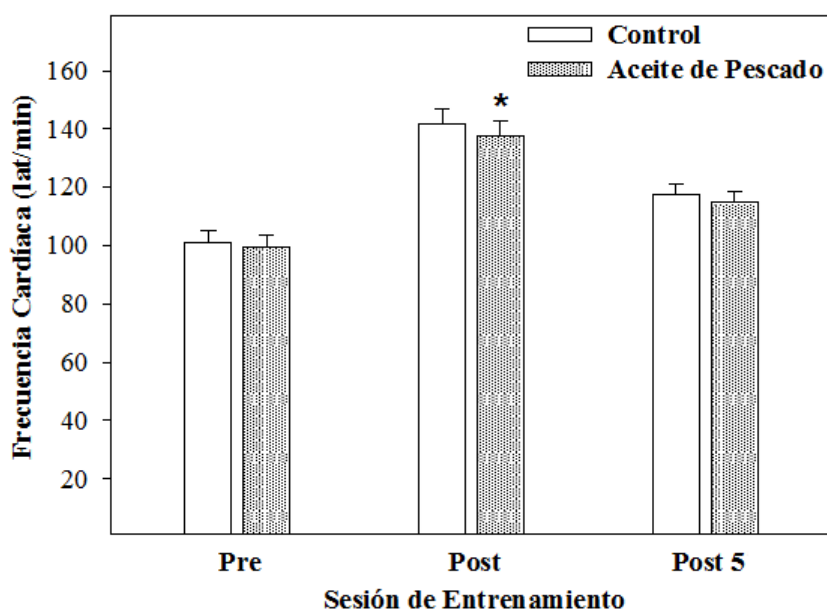


Figura 1. Media \pm SEM de los valores de frecuencia cardíaca (lat/min) previo a comenzar la sesión de entrenamiento (Pre), inmediatamente posterior (Post), y a los 5 minutos (Post 5) de finalizada la misma, en 5 perros sanos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora de 12 semanas de duración. * = $P < 0,01$.

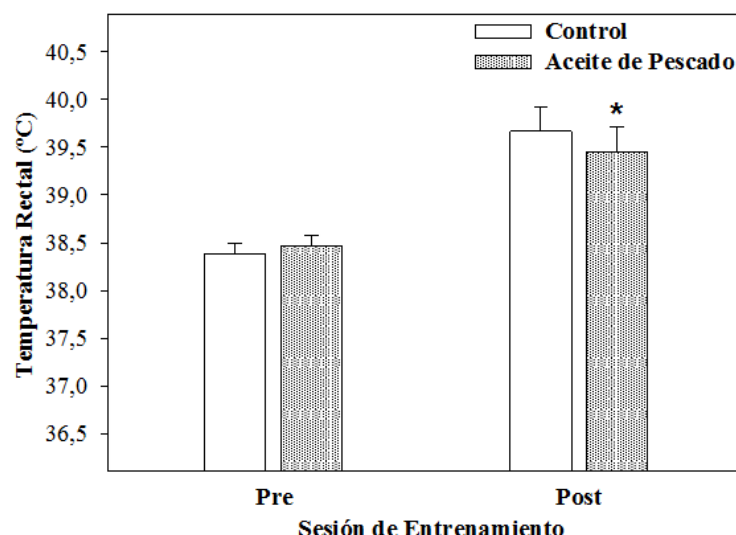


Figura 2. Media \pm SEM de los valores de temperatura rectal ($^{\circ}$ C) previa (Pre) e inmediatamente posterior (Post) a cada sesión de entrenamiento, en 5 perros sanos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora de 12 semanas de duración. * = $P < 0,01$.

en entrenamiento para el grupo suplementado. En línea con estudios previos, la determinación de la FC y TR se muestran como parámetros adecuados para evaluar la respuesta al ejercicio en perros durante el entrenamiento en cinta trotadora (Ferasin y Marcora 2009; Piccione *et al.* 2012). En coincidencia con lo propuesto por Piccione *et al.* (2012), tales parámetros deberían ser considerados en la planificación de programas de entrenamiento específicos en cinta trotadora. Finalmente, a pesar del compromiso de los propietarios en alimentar a sus perros durante el transcurso del estudio con la dieta control (C) o la dieta control con el suplemento (AP), la limitación de no tratarse de un estudio exclusivo de laboratorio impide la supervisión constante de los animales y la certeza de saber si consumieron exclusivamente las dietas bajo estudio.

En conclusión, los resultados obtenidos podrían reflejar una mejora en el rendimiento físico en perros suplementados con aceite de pescado durante el entrenamiento en cinta trotadora. Sin embargo, sería interesante realizar más estudios en mayor cantidad de animales que permitan explicar los mecanismos por los cuales la suplementación con aceite de pescado podría llevar a mejoras en el rendimiento deportivo.

Agradecimientos

Este estudio fue sustentado por el proyecto de incentivos 11V/226 de la Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Los autores agradecen a la empresa Vitalcan® por la provisión de alimento balanceado.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, relaciones financieras, personales o de otro tipo con personas u organizaciones que pudieran afectar al presente trabajo.

Bibliografía

- Angle TC, Gillette RL. Telemetric measurement of body core temperature in exercising unconditioned Labrador retrievers. *Can J Vet Res.* 2011; 75(2): 157-9.
- Buckley JD, Burgess S, Murphy KL, Howe PRC. DHA-rich fish oil lowers heart rate during submaximal exercise in elite Australian Rules footballers. *J Sci Med Sport.* 2009; 12: 503-7.
- Christensen JH. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and heart rate variability. *Front physiol.* 2011; 2: 84.
- Ferasin L, Marcora S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *J Comp Physiol B.* 2009; 179: 839-45.
- Greer RJ, Cohn LA, Dodam JR, Wagner-Mann CC, Mann FA. Comparison of three methods of temperature measurement in hypothermic, euthermic, and hyperthermic dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 230(12): 1841-8.
- Kawabata F, Neya M, Hamazaki K, Watanabe Y, Kobayashi S, Tsujia T. Supplementation with eicosapentaenoic acid-rich fish oil improves exercise economy and reduces exertion during submaximal steady-state exercise in normal healthy untrained men. *Biosci Biotech Bioch.* 2014; 78(12): 2081-8.
- National Research Council. Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, DC: National Academy Press. 2006.
- O'Connor CI, Lawrence LM, Lawrence ACSt, Janicki KM, Warren LK, Hayes S. The effect of dietary fish oil supplement-

tation on exercising horses. *J Anim Sci.* 2004; 82: 2978-84.

Peoples GE, McLennan PL, Howe PR, Groeller H. Fish oil reduces heart rate and oxygen consumption during exercise. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008; 52(6): 540-7.

Piccione G, Casella S, Panzera M, Giannetto C, Fazio F. Effect of moderate treadmill exercise on some physiological parameters in untrained beagle dogs. *Exp Anim.* 2012; 61(5): 511-5.

Stepien RL, Hinchcliff KW, Constable PD, Olson J. Effect of endurance training on cardiac morphology in Alaskan sled dogs. *J Appl Physiol.* 1988; 85: 1368-75.

Stuewe RS, Gwartz, PA, Agarwal N, Mallet RT. Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32: 903-13.

Wyatt HL, Mitchell JH. Influences of physical training on the heart of dogs. *Circ Res.* 1974; 35: 883-9.

Análisis de la diversidad genética de una población de caballos Criollo Argentino mediante polimorfismos de nucleótido simple de los genes IL12B y TNF- α

Genetic diversity analysis of a Criollo Argentino horses population using single nucleotide polymorphisms of IL12B and TNF- α genes

Corbi Botto CM^{1,2}, Sadaba SA^{1,2}, Zappa ME¹, Peral García P¹, Díaz S^{1*}

¹Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout" (IGEVET),
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

CCT La Plata, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET);

²Becarios CONICET. *Correo electrónico de la autora: sdiaz@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: La caracterización de una población es el primer paso en el camino hacia su conservación y utilización. La raza Criollo Argentino es una de las referentes de la especie equina en Argentina y, por lo tanto, un patrimonio ganadero local que representa un recurso único en cuanto a la identidad y al sistema productivo del país. El objetivo de este trabajo fue analizar una población de caballos Criollo Argentino del norte de Argentina por medio de la caracterización de la variabilidad genética de cuatro marcadores moleculares del tipo *single nucleotide polymorphism* (SNP) localizados en los genes que codifican para las citoquinas IL-12B y TNF- α . Se recolectaron muestras de 50 caballos Criollo Argentino y se extrajo ADN genómico que se utilizó para tipificar mediante PCR-Pirosecuenciación®, tres SNPs en el promotor del gen TNF- α y uno localizado en el exón 5 del gen IL-12B. Se estimaron frecuencias génicas y genotípicas, equilibrio de Hardy-Weinberg y diversidad genética. En IL-12B se detectaron dos alelos, mientras que en TNF- α se observaron 4 haplotipos, entre ellos uno no descrito hasta el momento en equinos. Los resultados muestran que la heterocigosis esperada fue superior en TNF- α ($H_e=0,764$) y la población se encuentra en equilibrio para el locus IL-12B (p -valor $\geq 0,05$). Se destaca la importancia del caballo Criollo Argentino como acervo génico para el estudio de características genéticas y enfermedades de la especie equina.

Palabras clave: equinos, SNP, citoquinas, variabilidad genética

Abstract: Characterization of genetic resources is a key step in the pursuit of its use and conservation. Criollo Argentino is one of the iconic breeds of the equine species in Argentina, and therefore a local livestock patrimony that represents a unique resource in terms of productive system and identity of the country. The aim of this work was to analyze a population of Criollo Argentino horses from the north of Argentina by characterizing the genetic variability of four single nucleotide polymorphisms (SNP) located in the genes that encode for IL-12 and TNF- α cytokines. Hair samples from 50 Criollo Argentino horses were collected to isolate genomic DNA, and genotype by PCR-Pyrosequencing™, three SNPs located in the TNF- α gene promoter region, and one located in exon 5 of IL-12B gene. Genic and genotypic frequencies were estimated, as well as Hardy-Weinberg equilibrium and genetic diversity. Two alleles were detected in IL-12B, while TNF- α showed four haplotypes, one of which never described up until now in horses. Results show that genetic diversity was higher in TNF- α ($H_e=0.764$) and IL-12B is in equilibrium (p -value ≥ 0.05). This shows the importance of Criollo Argentino breed as an interesting genetic pool for the study of genetic characteristics and diseases of the equine species.

Key words: equine, SNP, cytokine, genetic variability

Introducción

La caracterización de una población es el primer paso en el camino hacia su conservación y utilización. La raza Criollo Argentino es una de las referentes de la especie equina en Argentina y, por lo tanto, un patrimonio ganadero local que representa un recurso único en cuanto a la identidad y al sistema productivo del país. La selección de esta raza para el estudio se realizó teniendo en cuenta las características genéticas que presentan estos caballos con respecto a los marcadores genéticos analizados en estudios previos (Peral García 1994; Díaz 1997), así como a sus rasgos de rusticidad y adaptabilidad, producto de períodos de la raza sujeta a la selección natural en ambientes diversos. Esta adaptación a las condiciones de vida del medio ambiente le permitió desarrollar sus grandes cualidades de resistencia a las enfermedades (Dowdall 1982), posicionando al caballo Criollo Argentino como la herramienta de trabajo para muchos productores en este país.

El conocimiento de la variabilidad genética entre individuos de una especie resulta relevante para comprender, por ejemplo, los procesos biológicos y celulares que subyacen tras una entidad patológica. Partiendo de la premisa de que la expresión diferencial de algunos genes podría tener consecuencias en el proceso de la enfermedad, es importante profundizar en el conocimiento de la variación de las secuencias en los genes implicados en la respuesta inmune.

La identificación de variantes en el ADN que contribuyen a las enfermedades ha sido un objetivo central en la genética humana y ha cobrado importancia creciente en especies domésticas y pecuarias. Poder identificar los *loci* causales requiere de la habilidad para determinar variaciones en la secuencia de ADN a escala genómica. En la gran mayoría de los sitios genómicos (~99%) cada individuo tiene el mismo residuo nucleotídico en ambos cromosomas homólogos (LaFramboise 2009). En contraste, los polimorfismos de nucleótido simple o *single nucleotide polymorphisms* (SNP) son posiciones genómicas en las que coexisten dos nucleótidos distintos (alelos) y cada uno aparece en una proporción significativa de la población (polimorfismos). Los SNPs son la fuente de variación genética más común e informativa en los individuos de una especie. El número de SNPs publicados en las bases de datos supera el millón y medio en humanos, y corresponden a una frecuencia aproximada de un SNP cada 2000 pb (Kruglyak y Nickerson 2001; Zhao *et al.* 2003), en tanto que el genoma equino tiene un tamaño aproximado de 2,67 Gb con una frecuencia de un SNP cada 1500 pb (Wade *et al.* 2009).

El objetivo de este trabajo fue analizar una población de caballos de la raza Criollo Argentino del

norte de Argentina por medio de la caracterización de la variabilidad genética de cuatro marcadores moleculares del tipo SNP, localizados en los genes equinos que codifican mediadores de la respuesta inmune tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y subunidad p40 de la interleuquina 12 (IL-12B).

Materiales y métodos

Población analizada

Para este estudio se utilizaron muestras de pelo y sangre de 50 caballos de la raza Criollo Argentino, hijos de cinco padrillos diferentes. Los caballos pertenecen a la Cabaña de Caballos Criollos de INTA Leales del Instituto de Investigación Animal del Chaco Semiárido (IIACS), localizada en Tucumán.

Toma de muestras y extracción de ADN

Las muestras de sangre se tomaron por punción yugular con aguja estéril y se mantuvieron refrigeradas para extraer la interfase que contiene el *buffy-coat*. Posteriormente se almacenaron en freezer a -20 °C. La extracción de ADN se realizó con el reactivo DNAzol® siguiendo las recomendaciones del fabricante (Ausubel *et al.* 1990). El ADN resultante se resuspendió en agua destilada estéril y se cuantificó con espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare). Alternativamente, los bulbos pilosos se usaron para extraer el ADN mediante el uso de NaOH 200 mM.

Genotipificación de los SNPs

Se analizaron cuatro marcadores moleculares del tipo SNP ubicados en los genes que codifican para las citoquinas IL-12B y TNF- α . Usando el ADN genómico extraído como molde, se amplificaron separadamente las regiones de interés (exón 5 de IL-12B y promotor de TNF- α) mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos (Tabla 1). Los productos de PCR se observaron mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida) al 6% en tampón TBE1X (Tris-Cl 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH=8,4), se sometieron a tinción con bromuro de etidio (5mg/ml) y se observaron bajo transiluminación UV. Posteriormente, los SNPs se detectaron mediante Pirosecuenciación®, según el procedimiento recomendado (Ronaghi 2001).

Análisis estadístico

Para cada marcador se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) mediante el test de estimación de probabilidad de P-valores. Además, se estimó la diversidad genética mediante el cálculo de la heterocigosis (He) de los individuos por locus observado y según

Cebador	Secuencia
IL12Be5 F	5'-CACGACCTTACTCCAAAGCCCA-3'
IL12Be5-R-biot	5'-CTTGCCCTGGACCTGAATAGAG-3'
TNF- α F2	5'-GCCAGGAGAGAGAGAAGCAA-3'
TNF- α P1R	5'-CGATCACCCCAAAGTGCAG-3'

Tabla 1. Secuencias de los cebadores específicos utilizados para la amplificación por PCR de las citoquinas IL-12 y TNF- α .

lo esperado bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, de acuerdo a la fórmula de Nei (1978), incorporando la corrección de Levene (1949) para pequeñas muestras. Estos análisis genéticos poblacionales se realizaron utilizando el conjunto de programas GENEPOP versión 4.0 (Rousset 2008). La composición y diversidad de haplotipos del promotor de TNF- α se determinó mediante el programa PHASE (Scheet y Stephens 2005) y el análisis de segregación familiar con datos de *pedigree*.

Resultados

La Pirosecuenciación® permitió detectar exitosamente, en la población de caballos Criollo Argentino analizada, el SNP del exón 5 de IL-12B. El alelo G ($f=0,82$) resultó el más frecuente y se detectaron los tres genotipos posibles: GG, AG, AA, con frecuencias genotípicas de: 0,66, 0,32 y 0,02, respectivamente. La población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p \geq 0,05$). La heterocigosis esperada para el locus IL12B fue de $He=0,298$. Los pirogramas obtenidos se muestran en la Figura 1.

Los pirogramas de la Figura 2 muestran las dos bases posibles para cada posición: TNF^{-95C/T}, TNF^{-89C/T} y TNF^{-85C/T}; tomadas en conjunto, estas tres posiciones permiten definir los haplotipos probables en el promotor del gen TNF- α . Para verificar los distintos haplotipos observados en la población en estudio, se analizaron los resultados obtenidos con el programa

PHASE y se compararon con la segregación en individuos emparentados. Los haplotipos presentes en la población de caballos criollos fueron: TTC (Fig. 2a), CTT (Fig. 2b), CTC (Fig. 2c), con frecuencias de: 0,399, 0,268 y 0,231, respectivamente. Además, se detectó la variante C en la posición TNF-89_{CT} (Fig. 2d), generando una combinación haplotípica poco frecuente (TCT, $f=0,059$). La heterocigosis esperada en TNF- α fue de $He=0,764$.

Discusión

Los polimorfismos de nucleótido simple son las variaciones genéticas más comunes descritas en los genes de citoquinas (Merino *et al.* 2013). El polimorfismo en el gen de IL12p40 fue descrito en estudios de asociación con las enfermedades equinas causadas por *Lawsonia intracellularis* y *Rhodococcus equi*, en razas de caballos de Europa, y no existen reportes previos en razas que se crían en nuestro país. La presencia de variabilidad en la región del promotor del gen TNF- α y la distribución de los haplotipos del TNF- α se limitaban a razas como Old Kladruber, Akhal-Teke, Thoroughbred, Arabes y Standardbred. En los caballos Criollo Argentino, los resultados evidencian desequilibrio de ligamiento, es decir, la frecuencia incrementada de determinadas combinaciones de SNPs (haplotipos) y la ausencia de otras. La construcción de haplotipos puede realizarse mediante un análisis de segregación familiar, el estudio de individuos de parentesco conocido y/o con la asistencia de software específico, tal como el programa PHASE. Sobre la base de los datos de frecuencias de los SNPs en la población analizada, el software asigna una probabilidad de ocurrencia a cada uno, siendo casi nula para los haplotipos CCT (< 4 %) y TTT (< 0,2 %). Además, el análisis de segregación de los individuos emparentados permitió confirmar la ausencia de animales con estos dos haplotipos.

Según las probabilidades de ocurrencia estimadas en la población analizada, entre los haplotipos que presentan la variante C en la posición TNF⁻⁸⁹ (CCT,

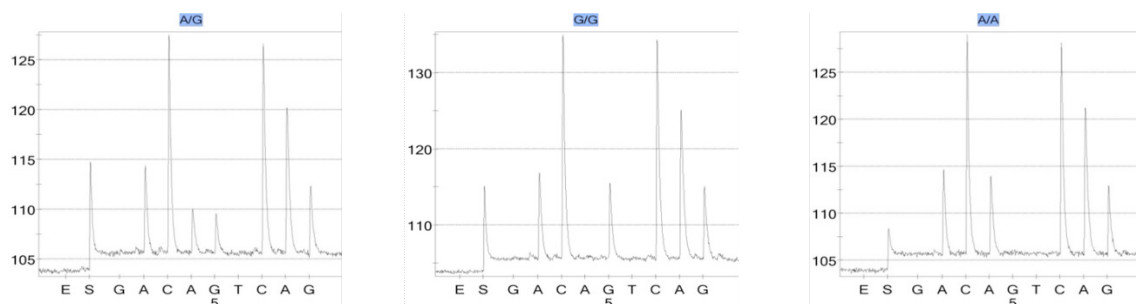


Figura 1. Pirogramas correspondientes a los genotipos detectados en el exón 5 del gen IL12B mediante Pirosecuenciación®: a) AG, b) GG, c) AA.

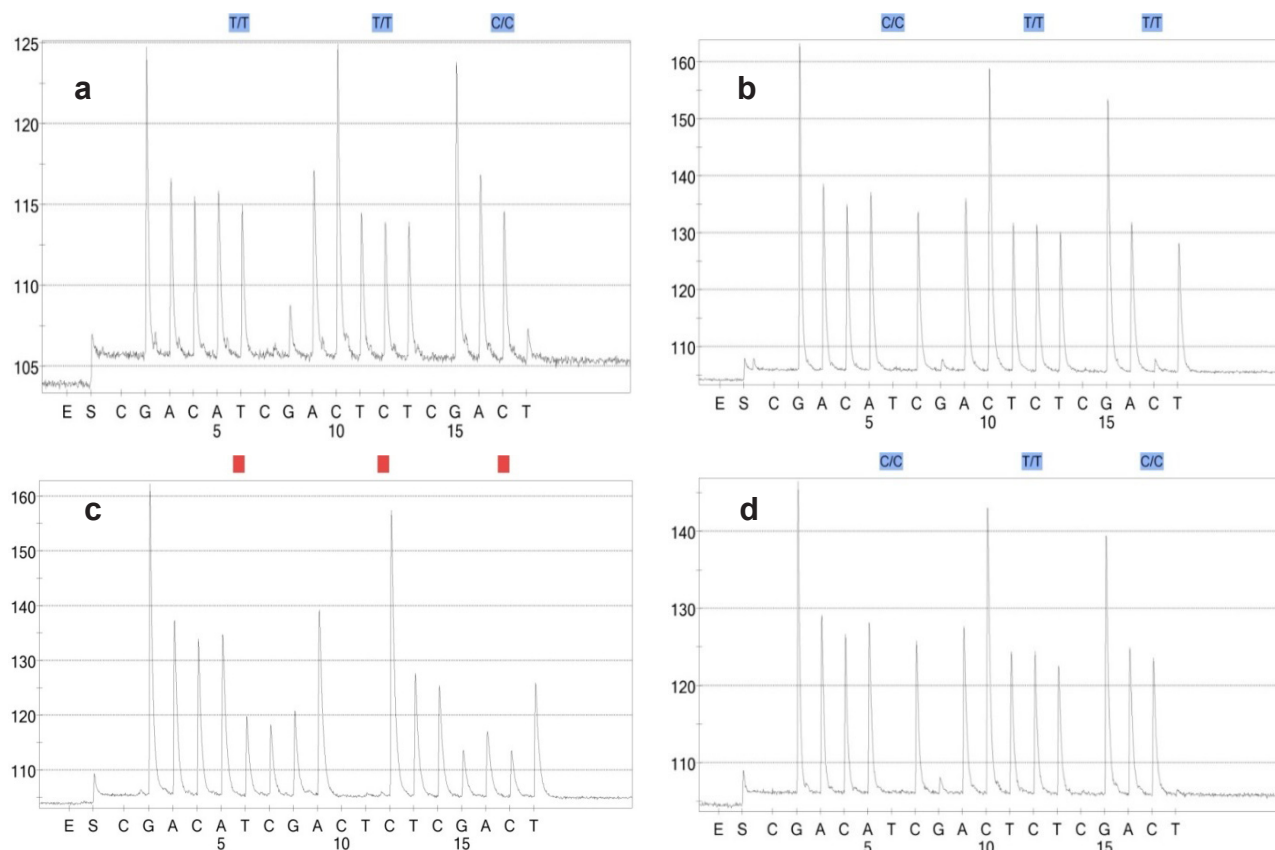


Figura 2. Pirogramas obtenidos para $TNF_{-95C/T}$, $TNF_{-89C/T}$ y $TNF_{-85C/T}$. Se observan los cuatro haplotipos presentes en la población: a) TTC, b) CTT, c) CTC y d) TCT.

TCT, CCC), el haplotipo TCT sería el único probable en esta población. Es de destacar que la presencia de la variante C en esta posición no había sido descrita previamente en ninguna raza equina; sólo se encuentra descrita en asnos y cebras de Grant (Brown *et al.* 2006).

Dada la importancia que tiene la secuencia del promotor en la función regulatoria del gen, el desequilibrio de ligamiento observado podría determinar la eficiencia en la afinidad e interacción con factores de transcripción específicos, que condicionarían la intensidad de la respuesta inmune en las que intervienen estas citoquinas.

Las distintas frecuencias de los haplotipos obtenidas podrían deberse a la presión selectiva sobre ciertos SNPs en esta raza equina. Por lo tanto, la presencia de polimorfismos en los genes de las citoquinas estudiadas pone en evidencia la riqueza del acervo génico de los caballos Criollo Argentino y permite describir un entorno genético informativo para estudios relacionados con la respuesta inmune, por ejemplo, ante enfermedades infecciosas.

Conclusiones

En este trabajo se estimaron los valores de diversidad genética en una población de caballos de la raza Criollo Argentino mediante el análisis de cuatro

SNPs localizados en el exón 5 del gen que codifica para IL-12B y en el promotor de $TNF-\alpha$. En este último se detectó el polimorfismo del SNP $TNF_{-89C/T}$ por lo que se pudo evaluar la presencia de un nuevo haplotipo, no descrito hasta el momento en equinos. Si bien serán necesarios futuros estudios para poder definir si la presencia de estas variantes en las citoquinas estudiadas, y especialmente en el promotor del $TNF-\alpha$, podría tener consecuencias en la respuesta inmune frente a enfermedades o entidades patológicas específicas, los resultados obtenidos permiten destacar la importancia del caballo Criollo Argentino como acervo génico para el estudio de características genéticas y enfermedades de la especie equina.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, relaciones financieras, personales o de otro tipo con personas u organizaciones que pudieran afectar al presente trabajo.

Bibliografía

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Struhl K, 1990. Current protocols in molecular biology. New York; John Wiley & Sons, Inc., NY.

Brown JJ, Ollier WER, Thomson W, Matthews JB, Carter SD, Binns M, Pinchbeck G, Clegg PD. $TNF-\alpha$ SNP haplotype frequencies in equidae. Tissue Antigens. 2006; 67: 377-82.

Díaz S. 2003. Estudio del polimorfismo y poligenismo de los *loci* DRB en caballos criollos argentinos. Tesis Doctoral para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

Dowdall, RC, 1982. Criando Criollos. Buenos Aires; Editorial Hemisferio Sur S.A.

Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet.* 2001; 27(3): 234-5.

LaFramboise T. Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(13): 4181-93.

Levene H. On a matching problem arising in genetics. *Ann Math Statist.* 1949; 20: 91-4.

Merino AM, Zhang K, Kaslow RA, Aissani B. Structure of tumor necrosis factor-alpha haploblocks in European populations. *Immunogenetics.* 2013; 65(7):543-52.

Peral García P. 1994. Caracterización de los equinos de Pura Raza Criolla. Su comparación con los equinos de Pura Raza Española mediante sus polimorfismos genéticos. Tesis Doctoral para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.

Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 1978; 89: 583-90.

Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 2001; 11(1): 3-11.

Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resou.* 2008; 8: 103-6.

Scheet P, Stephens M. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *Am J Hum Genet.* 2005; 78:629-44.

Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science.* 2009; 326: 865-7.

Zhao Z, Fu YX, Hewett-Emmett D, Boerwinkle E. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene.* 2003; 312: 207-13.

Daño en el ADN en leucocitos de equinos sometidos a esfuerzo físico

DNA damage in leukocytes of equines subjected to physical effort

Muriel M^{1*}, Seoane A², Ferreira V¹, López R¹, Boffi FM³, Picco SJ²

¹Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales, Centro de Fisiología y Fisiopatología del Equino Deportivo, Hospital Escuela;

²Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET-CONICET-UNLP).

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata; ³Profesional independiente.

*Correo electrónico del autor: marcosmuriel@yahoo.com

Resumen: En los últimos años se ha observado un creciente interés por el estudio de los efectos beneficiosos y perjudiciales asociados al ejercicio. El objetivo del presente trabajo fue establecer la existencia de daño en el ADN en leucocitos circulantes de equinos sometidos a un test de ejercicio de alta intensidad y corta duración. La determinación del daño en el ADN se realizó mediante el ensayo cometa versión alcalina. Se usaron 5 equinos. Se extrajeron muestras de sangre al comenzar el ejercicio, al alcanzar la velocidad máxima, al finalizar el ejercicio y a los 30 días post ejercicio. Simultáneamente se realizaron ergoespirometrías continuas para determinar el consumo de oxígeno durante el ejercicio. La frecuencia relativa de células con daño en el ADN fue 0,122, 0,240, 0,210 y 0,100, mientras que el índice de daño en el ADN fue 11,8, 28,4, 23 y 10,4 UA. Se observaron incrementos significativos con respecto al tiempo basal y 30 días post ejercicio cuando los animales alcanzaron la máxima velocidad y al finalizar el ejercicio ($p < 0,05$). Se observó una alta correlación entre el consumo de oxígeno y las células con daño ($r = 0,905$), así como con el índice de daño ($r = 0,935$). Estos resultados sugieren que los factores inductores de daño genotóxico se producen mayoritariamente durante el esfuerzo físico y que probablemente se deban a radicales libres del oxígeno.

Palabras clave: equinos, ejercicio, daño en el ADN

Abstract: In recent years there has been a growing interest in the study of the beneficial and harmful effects associated with exercise. The aim of this study was to establish the existence of DNA damage in circulating leukocytes of horses undergoing high intensity and short term physical activity by using the alkaline comet assay. Five horses subjected to a standardized exercise test were used. Samples were collected before starting the exercise, at the point of reaching maximal speed, at the end of the test and 30 days post exercise. Simultaneously, oxygen consumption during the exercise test was measured. The relative frequency of cells with DNA damage was 0.122, 0.240, 0.210 and 0.100, respectively. DNA damage index was 11,8, 28,4, 23 and 10,4 UA, respectively. Significant increases were observed from baseline time and 30 days after exercise when the animals reached maximum speed and at the end of the exercise ($p < 0.05$). These results suggest that genotoxic damage inducing factors occur mainly during physical fatigue, and that this is probably due to oxygen free radicals.

Key words: equine, exercise, DNA damage

Introducción

En los últimos años se ha observado un creciente interés por el estudio de los efectos beneficiosos y perjudiciales asociados al ejercicio. Evidencias obtenidas a partir de algunos estudios realizados en animales sugieren que el ejercicio regular disminuye el riesgo de daño en el ADN (Schneider *et al.* 1995; Radak *et al.* 2002). Sin embargo, evidencias recientes parecen indicar que el ejercicio intenso y de corta duración potenciaría la aparición de daño en dicha molécula (Cash *et al.* 2014). La génesis de dicho daño se vincula a la generación de radicales libres durante el ejercicio. En años recientes numerosos trabajos han reportado la aparición de daño en el ADN asociado a estrés oxidativo y ejercicio en diferentes modelos y tipos de animales (Wierzbica *et al.* 2006; Gandhi y Gunjan 2009). Las primeras evidencias que relacionan al ejercicio con el daño oxidativo datan del año 1978 (Dillard *et al.* 1978) pero es en las últimas tres décadas que se han acumulado abundantes conocimientos que vinculan estos dos hechos. En la actualidad, está claramente establecido que durante el ejercicio se produce un aumento en la producción de radicales libres (RL) del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y del nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*) y que dicho aumento tiene su base en el incremento de ROS y RNS producidos especialmente en el propio músculo en ejercicio (Powers y Jacson 2008). La producción de RL puede alcanzar niveles alarmantes durante el ejercicio extremo, rompiendo el equilibrio oxidante/antioxidante y causando daño en moléculas orgánicas, tales como componentes de membrana, proteínas, ADN, etc.

La versión alcalina de la electroforesis en gel de células aisladas, más conocida como “*Ensayo Cometa*”, es un método sensible, confiable y rápido para detectar rupturas de simple y doble cadena en la molécula de ADN, así como sitios lábiles al álcali. Con esta técnica, la cantidad de daño en el ADN está dada por la cantidad de ADN que migra en el campo electroforético, en forma proporcional a la cantidad de daño presente (Picco *et al.* 2001).

El objetivo del presente trabajo fue establecer la existencia de daño en el ADN en leucocitos circulantes de equinos sometidos a un test de ejercicio de alta intensidad y corta duración mediante la utilización de la electroforesis en gel de células aisladas (“*Ensayo Cometa*”).

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron cinco equinos de raza Árabe (2 hembras, 2 machos castrados y un macho entero) con un peso promedio de 356,4 kg (\pm 47,22) y entre 4 y

7 años de edad, habituados a realizar entrenamiento en forma continua en cinta ergométrica. Los caballos fueron alojados en boxes del Hospital Escuela y del Laboratorio de Fisiología y Fisiopatología del Equino Deportivo de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) durante todo el período de ensayo. Los animales se alimentaron sobre la base de un 2,5% del peso corporal de materia seca. La dieta presentó una relación 50:50 de heno (rollo de pastura) y concentrado (alimento balanceado con un 12% de proteína y 2,75 Mcal/Kg), y agua ad-libitum.

Protocolo de ejercicio

Los animales fueron sometidos a un test de ejercicio estandarizado sobre una cinta ergométrica marca Kagra modelo 2200. El test constó de las siguientes etapas: un precalentamiento de 1 min a 1,5 m/s y 4 min a 4 m/s; a continuación y con un 3% de pendiente se realizaron etapas de 1 min. de duración con intensidades crecientes (5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13 m/s etc.) hasta alcanzar el punto de fatiga. Alcanzado el mismo se realizó la fase de recuperación sin pendiente a 4 y 1,5 m/s durante 4 y 1 min, respectivamente.

Toma de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción de la vena yugular derecha. Para ello se utilizaron Abbocat N° 14 y una guía de 1,20 m de longitud recubierta con papel de aluminio para evitar el contacto de la sangre con la luz. Dichos elementos permanecieron colocados y permeables durante todo el test de ejercicio. Las muestras se tomaron con el animal en reposo previo al ejercicio (T0), durante el test de ejercicio a la máxima velocidad desarrollada por cada caballo (T1), al finalizar el ejercicio (T2) y 30 días post ejercicio (T3). En cada toma de muestras se extrajeron 2,5 ml de sangre, las que fueron almacenadas en tubos eppendorf heparinizados. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta el posterior análisis.

Ensayo cometa (versión alcalina)

Para la realización del ensayo cometa las muestras fueron almacenadas en ambiente oscuro y a 4 °C por no más de 30 minutos. El ensayo se desarrolló de acuerdo con el protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) con pequeñas modificaciones. Se mezclaron 15 ml de sangre con 75 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% (Gibco BRL, NY, USA). Dicha mezcla se colocó sobre un portaobjetos cubierto previamente con agarosa de punto de fusión normal al 0,5% (Promega, USA) previamente solidificada. Se preparon dos portaobjetos por animal. Luego, las células fueron lisadas en una solución detergente (100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 1% Triton X-100 y

10 % DMSO) durante, al menos, una hora antes de la electroforesis. Para la electroforesis los portaobjetos fueron colocados en cubeta horizontal y cubiertos con una solución alcalina de electroforesis (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH > 13) durante 20 minutos. La electroforesis se realizó durante 30 minutos a 25 V y 300 mA (1,25 V/cm). Luego de la electroforesis los portaobjetos fueron enjuagados 3 veces con una solución buffer de Tris (pH 7,5) durante 5 minutos y finalmente con agua destilada. Una vez secos, los portaobjetos fueron teñidos con una solución de SYBR Green I 1/1000 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) (Ward y Marples 2000). El análisis se realizó utilizando un microscopio Olympus BX 40, provisto de una lámpara de mercurio de alta presión de 100 W USHIO USH 102 D. El registro de las imágenes se realizó con una cámara Sony CCD y las imágenes se grabaron utilizando el software Image Pro Plus^a. Los leucocitos fueron clasificados primariamente en normales (núcleos sin migración del ADN) y anormales (núcleos con migración del ADN) (Figura 1). Posteriormente se realizó la clasificación por niveles de daño, siguiendo el criterio propuesto por Kobayashi *et al.* (1995). Finalmente se estableció el índice de daño en el ADN de acuerdo con los criterios y fórmula propuestos por Collins (2004), expresando los resultados en unidades arbitrarias de daño (UA).

Ergoespirometría

Los registros ergoespirométricos fueron obtenidos a través del sistema Cortex Biofísica MetaVet. El equipo se calibra con cada caballo en particular en función de las condiciones atmosféricas (temperatura ambiental, presión atmosférica, humedad relativa

ambiente, presión de oxígeno ambiental y presión de dióxido de carbono ambiental) del lugar en el que se va a realizar el test de ejercicio. Una vez calibrado el equipo, se le coloca al equino la máscara provista de sensor de flujo/volumen y luego se lo sube a la cinta ergométrica para dar inicio al ejercicio. Este equipo permite medir el consumo de oxígeno (VO₂) en ambas condiciones, "Body temperature pressure saturated" (BTPS) en la que el análisis se realiza en presencia de vapor de agua o en "Standard temperature pressure and dry" (STPD), la que corresponde a una situación de 0 °C de temperatura y 760 mmHg de presión atmosférica al nivel del mar, en condiciones de ausencia de vapor de agua (seco). La información obtenida fue procesada con el Programa MetaSoft Vet Metabolic Stress®.

Análisis de los datos

Las frecuencias relativas de células anormales (0= ausencia; 1= 100 %) en cada tiempo de muestreo fueron comparadas utilizando el test de Chi cuadrado con corrección de Yates. Los diferentes niveles de daño y el índice de daño fueron comparados utilizando el test *t* de Student's (SSPS® Versión 11). La asociación entre células con daño o índice de daño con el consumo de oxígeno se realizó a través del coeficiente de correlación y *r* ajustado. Los resultados se expresaron como la media ± DS.

Resultados

Los resultados obtenidos al realizar el ensayo cometa versión alcalina se presentan en la tabla 1. La frecuencia relativa de células con daño en el ADN fue

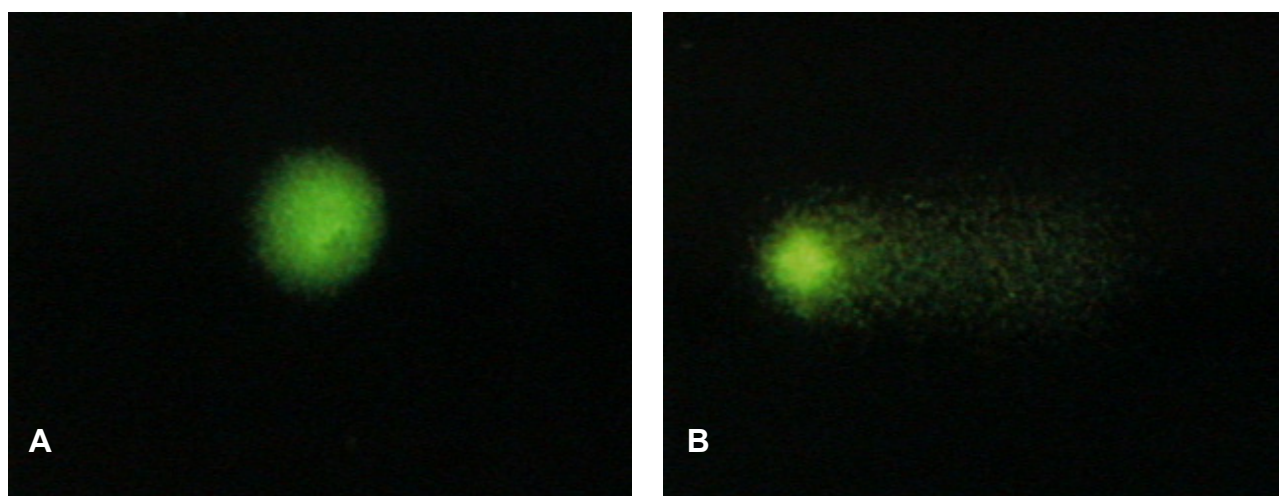


Figura 1. Imagen de un leucocito equino sin migración aparente del ADN (A) y de un leucocito con alto nivel de fragmentación del mismo (B), evidenciado por la reducción del diámetro del núcleo y la amplia cola de partículas fluorescentes que se forma hacia el polo positivo durante la electroforesis (cola del cometa). Tinción fluorescente Syber Green I (dilución 1/1000). Objetivo 40X.

Tabla 1. Resultados de la prueba de Chi cuadrado cuando se compararon las células anormales (con daño en el ADN) observados en el T0 y en los tiempos T1, T2 y T3.

Grupo comparado	Células con daño (cada 1000 células)	Valor de Chi cuadrado	Valor de p
T0	122	--	--
T1	240	46,17	< 0,001
T2	210	27,34	< 0,001
T3	100	2,23	0,135

0,122, 0,240, 0,210, y 0,100 para los tiempos T0, T1, T2 y T3, respectivamente. Se observó un aumento significativo de la frecuencia de células con daño con respecto al reposo (T0) en T1 y T2 ($X^2= 46,17$; $p < 0,005$ y $X^2= 27,34$; $p < 0,005$). También fue significativa la disminución observada entre T3 con respecto a T1 y T2, respectivamente ($X^2= 68,47$; $p < 0,005$ y $X^2= 45,36$; $p < 0,005$). No se observaron diferencias entre T0 y T3.

El índice de daño en el ADN experimentó un comportamiento similar al observado para la frecuencia de células con daño, siendo los valores obtenidos 11,8 ($\pm 3,56$), 28,4 ($\pm 9,12$), 23 ($\pm 9,66$) y 10,4 UA ($\pm 0,89$) para T0, T1, T2 y T3, respectivamente. Se observaron incrementos significativos entre T0 y T1 y entre T0 y T2 ($p= 0,0026$ y $0,020$, respectivamente) y disminuciones significativas entre T1 y T3 y entre T2 y T3 ($p= 0,001$ y $0,0099$, respectivamente). No se observaron diferencias entre T0 y T3.

La tabla 2 presenta los resultados obtenidos con el ensayo cometa, según el criterio de clasificación del daño en el ADN propuesto por Kobayashi *et al.* (1995). El nivel de células sin migración aparente del ADN (grado 0) alcanzó mínimos valores con respecto al control cuando los animales alcanzaron la velocidad máxima (T1) ($p= 0,006$) y al finalizar el test de ejercicio ($p= 0,021$). También se observaron diferencias significativas entre T1 y T3 y entre T2 y T3 ($p= 0,0021$ y $0,0084$, respectivamente). El nivel de células con daño leve (grado 1) presentó un comportamiento inverso al de las células grado 0, incrementándose

hasta alcanzar los equinos la máxima velocidad (T1) y al momento de finalizar el test de ejercicio (T2). Ambos incrementos fueron significativos con respecto al T0 ($p= 0,012$ y $0,023$, respectivamente). De la misma manera, también se observaron diferencias significativas entre T1 y T3 y entre T2 y T3 ($p= 0,003$ y $0,007$, respectivamente). Las células con daño moderado (grado 2) tuvieron un comportamiento similar al observado en los dos casos anteriores, pero no se observaron diferencias estadísticas significativas. Algo similar ocurrió con las células con daño intenso (grado 4) y con máximo nivel de daño (grado 5), en las cuales, si bien los máximos valores se observaron en T1 y T2, estos incrementos no fueron suficientes para ser estadísticamente significativos.

Los resultados obtenidos a partir de las ergoespirometrías (Tabla 3) muestran un marcado incremento en el consumo de oxígeno el cual inicialmente fue 3,367 l/min (velocidad inicial: 1,6 m/s), alcanzando su valor máximo en el momento de máxima velocidad (45,78 l/min a 12,72 m/s), cediendo al final del ejercicio, momento en el cual los valores promedio fueron de 16,259 l/min. Esto representó un incremento en el consumo de oxígeno de aproximadamente 14 veces en relación con el registrado al inicio del ejercicio. Al final del mismo el consumo de oxígeno se redujo, pero aun así se mantuvo incrementado unas 5 veces en relación con el registrado al inicio. La $VO_{2\text{máx}}$ alcanzó un valor promedio de 51 77 l/min. Puede observarse en la tabla 1 que tanto al inicio como al final del ejercicio los valores de consumo de oxígeno presentaron

Tabla 2. Resultados obtenidos con el ensayo cometa al clasificar las células de daño en los 5 grados propuestos por Kobayashi *et al.* (1995). Valores medios expresados en porcentaje (\pm DS).

Tiempo	Grado 0 %	Grado 1 %	Grado 2 %	Grado 3 %	Grado 4 %
T0	88,60 ($\pm 3,84$)	11,00 ($\pm 4,18$)	0,40 ($\pm 0,54$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)
T1	76,00 ($\pm 7,84$)	21,60 ($\pm 7,43$)	1,20 ($\pm 1,09$)	0,40 ($\pm 0,89$)	0,80 ($\pm 0,83$)
T2	79,00 ($\pm 8,09$)	19,60 ($\pm 7,02$)	1,00 ($\pm 1,79$)	0,20 ($\pm 0,44$)	0,20 ($\pm 0,44$)
T3	90,00 ($\pm 1,22$)	9,6 ($\pm 1,67$)	0,40 ($\pm 0,54$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,00 ($\pm 0,00$)

Tabla 3. Valores individuales y medios de consumo de O₂ (l/min) y velocidad máxima alcanzada (m/s) por los equinos utilizados en el ensayo.

	Consumo de O ₂ (l/min)			VO ₂ Max ⁴ (l/min)	Velocidad máxima ⁵ (m/s)
	Inicio ¹	Velocidad máxima ²	Fase final del ejercicio ³		
Equino 1	3,62	48,968	12,78	50,688	12,2
Equino 2	1,461	52,899	17,907	65,823	12,4
Equino 3	4,044	35,439	10,715	40,737	12,4
Equino 4	1,916	53,974	24,316	59,271	14,3
Equino 5	5,796	37,621	15,579	42,332	12,3
Media	3,36	45,78	16,25	51,77	12,72
DS⁶	1,743	8,681	5,266	10,790	0,887
ES⁷	0,779	3,882	2,355	4,825	0,396
CV⁸	51,778	18,963	32,388	20,842	6,974

¹Valor medio obtenido luego de hacer caminar a los caballos a 1,6 m/s durante 60 segundos, con determinaciones cada 10 segundos. ²Valor medio obtenido luego de hacer correr a los caballos a más de 12 m/s hasta agotamiento, con determinaciones cada 10 segundos. ³Valor medio obtenido luego de hacer caminar a los caballos a 1,6 m/s durante 60 segundos, con determinaciones cada 10 segundos, inmediatamente antes de bajarlos de la cinta ergométrica. ⁴Valor máximo de consumo de O₂. ⁵Velocidad máxima desarrollada por cada caballo. ⁶DS: desvío estándar. ⁷ES: error estándar de la media. ⁸CV: coeficiente de variación.

una gran dispersión, con coeficientes de variación cercanos al 52 y 32 %, respectivamente, mientras que en el esfuerzo máximo y con el máximo consumo de oxígeno la dispersión fue menor (entre 18 y 20 %).

La correlación entre la frecuencia de células con daño en el ADN y el consumo de oxígeno durante el test de ejercicio fue de 0,905 ($R^2= 0,819$), mientras que la asociación entre índice de daño y consumo de oxígeno arrojó una correlación de 0,935 ($R^2= 0,875$).

Discusión

La producción de daño en el ADN asociado al ejercicio no es, en sí mismo, un fenómeno desconocido. Existen numerosos estudios en animales o humanos sometidos a diferentes niveles de ejercicio en los que se demostró el daño en el ADN, muchos de ellos utilizando también el ensayo cometa. Sin embargo, el denominador común de estos trabajos fue la estimación del daño posterior al ejercicio y no durante el mismo (Hartmann et al. 1995; Niess et al. 1996; 1998; Mastaloudis et al. 2004). En tal sentido, este trabajo evaluó la generación de daño en el ADN durante el desarrollo del ejercicio mismo, bajo un modelo particular de ejercicio estandarizado.

Los resultados obtenidos permiten observar que el ejercicio, bajo las condiciones planteadas en el presente ensayo, produce un incremento en el nivel de daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica, alcanzando su máxima expresión en el momento de llegar los equinos a la máxima velocidad, pero manteniéndose significativamente alto al finalizar la prueba.

La frecuencia de células con daño refleja la

cantidad de células que se ven afectadas por lesiones en sus moléculas de ADN, mientras que el índice de daño representa una medida indirecta de la magnitud de dicho daño. El hecho de que en el momento en que se produce la mayor intensidad del ejercicio se haya observado la mayor frecuencia de células con migración del ADN y el mayor índice de daño demuestra que los factores inductores de daño genotóxico se producen mayoritariamente durante el esfuerzo físico. La reducción de ambas variables entre el máximo nivel de ejercicio y el fin del ejercicio puede sugerir que en ese lapso hay una intensa reparación del daño. Estudios realizados por von Zeland (1984) en células de mamíferos demostraron que, tras inducir daño con rayos x y g, la eficacia de la reparación permite a las células recomponer el 80 % de las lesiones en la molécula de ADN entre 5 y 10 minutos post exposición, mientras que el 20% restante se repara pocas horas después. Estos hallazgos son concordantes con lo observado en el presente trabajo, ya que entre la aparición del máximo nivel de daño y la reducción del mismo transcurrieron 5 minutos.

Los mecanismos propuestos para explicar la aparición de daño en el ADN tras el ejercicio extremo incluyen la producción de ROS a partir de la cadena mitocondrial transportadora de electrones, el proceso de isquemia-reperusión, las reacciones catalizadas por la xantina oxidasa, algunos mecanismos inflamatorios y la producción de catecolaminas (Hartmann y Niess 1999). La cadena transportadora de electrones mitocondrial es posiblemente la principal responsable del pico de daño observado durante el ejercicio máximo. Esto se debe a que durante el mismo el consumo de oxígeno se

incrementa más de 10 veces, pero en la fibra muscular lo hace unas 100 veces, con el consiguiente aumento proporcional de la actividad de la cadena respiratoria y de la producción de anión superóxido (Gandhi y Gunjan 2009). Este último tiene amplia capacidad de difusión a través de las membranas plasmáticas (Picco 2004). En concordancia con esta teoría, en el presente trabajo los niveles de consumo de oxígeno alcanzaron su máxima expresión en el momento que los equinos alcanzaron la máxima velocidad, lo cual indica que en esa instancia los animales expresaron la máxima demanda de oxígeno y, por ende, el máximo consumo. Dicha variable presentó un alto nivel de correlación tanto con la frecuencia de células con daño en el ADN como con la intensidad del daño.

Tras el ejercicio, la producción de O_2^- por acción de la cadena respiratoria disminuye pero se activan otros mecanismos capaces de generar o mantener el estrés oxidativo, como la isquemia-reperusión, la cual es proporcional al esfuerzo realizado y que culmina con la reoxigenación de las áreas isquémicas y la consiguiente producción de ROS (Adams y Best 2002). Es probable que, tras el ejercicio intenso, adquieran más relevancia factores tales como mediadores inflamatorios, liberación de RL por los leucocitos y el fenómeno recién mencionado de isquemia-reperusión. Este último probablemente también genere daño en el ADN por la vía de la producción de ROS, aunque el origen de estos últimos sea diferente de los generados por un excesivo funcionamiento de la cadena respiratoria. La activación de estos mecanismos secundarios de producción de daño serían los responsables de mantener elevados los niveles de daño en el ADN al final del ejercicio, contrarrestando parcialmente el efecto de los mecanismos de reparación. Es por ello que futuros estudios serán necesarios para dilucidar la responsabilidad de cada uno de los factores generadores de daño durante el ejercicio bajo modelos experimentales como el planteado en el presente trabajo.

Conclusiones

Nuestros resultados, si bien se obtuvieron sobre una población pequeña, muestran que el ejercicio de alta intensidad y corta duración, bajo las condiciones planteadas en el presente ensayo, produjo un incremento en el nivel de daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica, alcanzando su máxima expresión al llegar los equinos a la máxima velocidad, pero manteniéndose significativamente alto hasta finalizar la prueba. Simultáneamente se observó una alta correlación entre el consumo de oxígeno, la cantidad de células con daño en el ADN y la intensidad de dicho ADN, lo cual sugiere una asociación entre la producción de radicales libres del oxígeno y la lesión de la molécula de ADN.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

- Adams AK, Best TM. The role of antioxidants in exercise and disease prevention. *Phys Sportsmed.* 2002; 30: 37-44.
- Cash SW, Beresford SAA, Vaughan TL, Heagerty PJ, Bernstein L, White E, Neuhauser ML. Recent physical activity in relation to DNA damage and repair using the comet assay. *J Phys Act Health.* 2014; 11(4): 770-6.
- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26: 249-61.
- Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol.* 1978; 45: 927-32.
- Gandhi G, Gunjan. Exercise-induced genetic damage: a review. *Int J Hum Genet.* 2009; 9 (2): 69-96.
- Hartmann A, Niess AM, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit G. Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat Res.* 1995; 346(4): 195-202.
- Hartmann A, Niess AM. Oxidative DNA damage in exercise. En: Sen C K, Packer L, Hänninen O (Eds.): *Exercise and oxygen toxicity: a handbook.* 1999. Elsevier Science: B.V. North Holland/New York, pp.195-217.
- Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerised image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* 1995; 3: 103-15.
- Mastaloudis A, Yu TW, O'Donnell RP, Frei B, Dashwood RH, Traber MG. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med.* 2004; 36: 966-75.
- Niess AM, Baumann M, Roecker K, Hartmann T, Mayer F, Dickhuth HH. Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leukocytes. *J Sports Med Phys Fitness.* 1998; 38: 111-5.
- Niess AM, Hartmann A, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med.* 1996; 17: 397-403.
- Picco SJ, De Luca JC, Mattioli GA, Dulout FN. DNA damage induced by copper deficiency in cattle assessed by the comet assay. *Mutat. Res.* 2001; 498: 1-6.
- Picco SJ. Consecuencias genotóxicas y clastogénicas de la hipocuprosis bovina. Tesis Doctoral. 2004. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.
- Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008; 88 (4): 1243-76.
- Radak Z, Naito H, Kaneko T. Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 2002; (2): 273-8.

Schneider S, Willis PE, Parkhouse WS. The effects of age and physical activity on cardiac mitochondrial DNA template availability. *Age* 1995; 18(4): 151-7.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175, 184-91.

Van Zeeland AA. DNA repair. En: *Mutations in man*. Obe, G. (ed.). Springer, Berlin, 1984: 35-57.

Ward TH, Marples B. Technical report SYBR Green I and the improved sensitivity of the single-cell electrophoresis assay. *Int J Radiat.* 2000; 76: 61-5.

Wierzba TH, Olek RA, Fedeli D, Falcioni G. Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. *J Physiol Pharmacol.* 2006; 57 (Suppl 10): 115-31.

Análisis espacial de los accidentes laborales *in itinere* en veterinarios de grandes animales en la provincia de Santa Fe

Spatial analysis of *in itinere* traffic injuries among veterinarians in Santa Fe province

Molineri AI¹, Signorini ML^{1,2*}, Tarabla, HD²

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Rafaela, Ruta 34 Km 227, Rafaela, C.P. 2300, provincia de Santa Fe, Argentina. ²Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. Kreder 2805, Esperanza C.P. 3080, provincia de Santa Fe, Argentina.

*Correo electrónico del autor: signorini.marcelo@inta.gob.ar

Resumen: En la práctica de grandes animales el profesional debe viajar frecuentemente para atender a sus clientes, exponiéndose a los riesgos del tránsito. Los objetivos de este trabajo fueron: a) evaluar la frecuencia de veterinarios que sufrieron accidentes laborales *in itinere* (Alii) en la provincia de Santa Fe y la posible asociación espacial entre los casos detectados y b) estimar la percepción de los riesgos y el uso de elementos de protección personal. Se efectuó un estudio observacional sobre profesionales veterinarios que se dedican al manejo y atención de grandes animales en la provincia de Santa Fe, Argentina. El diseño fue transversal, la unidad de interés el veterinario y la población objetivo los veterinarios rurales santafesinos. La tasa de respuesta a un cuestionario estructurado que respondieron en forma anónima fue del 75,8% (n= 562). El análisis de los datos incluyó la búsqueda de agrupamientos espaciales para poblaciones de distribución heterogénea utilizando el programa SatScan versión 9.2. La frecuencia de accidentes fue del 14,8%. Se encontró un agrupamiento espacial (p= 0,017) en el sudeste provincial (riesgo relativo= 0,42). La frecuencia de veterinarios que sufrieron accidentes fue decreciendo desde el norte al sur de la provincia. El tránsito en rutas fue percibido como más riesgoso por una mayor proporción de entrevistados que el tránsito en caminos rurales. Las frecuencias de uso de luz baja durante el día y cinturón de seguridad fueron independientes de las percepciones del riesgo en el tránsito. Dado que la frecuencia de accidentes entre los veterinarios es alta, resulta fundamental diseñar estrategias de educación para evitar daños futuros.

Palabras clave: veterinaria, accidente laboral, percepción de riesgos, epidemiología

Abstract: In large animal practice, veterinarians must travel frequently and hence, exposing to traffic hazards. The aims of this study were: a) to evaluate frequency and spatial association of commuting accidents in the Santa Fe province, b) to estimate the perception of risks and use of personal protection elements *in itinere*. An observational study in veterinarians working in large animal practice was carried out. Study design was cross-sectional, the unit of interest was the veterinarian and the target population the large animal practitioners in Santa Fe province. The response rate to a structured questionnaire was 75.8% (n = 562). Answers were anonymous. Data analysis included Spearman rank correlation, and the search for clusters in heterogeneously distributed populations using SatScan 9.2. The frequency of traffic accidents was 14.8%. A spatial cluster (p = 0.017) was found in the Southeastern region of the province (relative risk= 0.42). Frequency of practitioners that suffered accidents was decreased from North to South. Travelling on paved main roads was perceived riskier than travelling on dirt rural roads. Turning on low lights during the day and wearing seat belt were independent form risk perceptions. Since the frequency of accidents is high among large animal practitioners, new educational strategies must be designed to avoid further damages.

Key words: veterinary, work injury, risk perception, epidemiology

Introducción

Las lesiones por accidentes de transporte terrestre constituyen la segunda causa de muerte violenta en las Américas (OPS 2015) y representan un problema de creciente magnitud para la salud pública en Argentina (Leveau 2013; Leveau y Ubeda 2012; Ubeda et al. 2012). Los veterinarios de grandes animales tienen que viajar frecuentemente para atender sus pacientes, lo que conlleva un alto riesgo de accidentes laborales *in itinere* (ALii) (Signorini et al. 2014; Lucas et al. 2012; Tarabla 2009; Fritschi et al. 2006). Si bien se cuenta con información sobre su frecuencia (Signorini et al. 2014; Tarabla 2009), hasta el momento, en Argentina no se han realizado análisis epidemiológicos que permitan identificar posibles factores asociados a su presentación en determinadas zonas geográficas. El análisis espacial permite detectar agrupamientos (*clusters*) (Moore y Carpenter 2012) y sólo recientemente se ha utilizado en el país para estudiar las muertes por lesiones de tránsito (Leveau 2013; Leveau y Ubeda 2012). La mayoría de los accidentes pueden prevenirse mejorando la capacitación de los trabajadores y adoptando prácticas seguras (Hope et al. 1999; Schenker et al. 2002; Angoules et al. 2007), aunque dicha adopción puede no estar necesariamente relacionada con la percepción de riesgos que tiene el trabajador (Tarabla et al. 2009). Los objetivos de este trabajo fueron: a) evaluar la frecuencia de veterinarios que sufrieron ALii en la provincia de Santa Fe y la posible asociación espacial entre los casos detectados y b) estimar la percepción de los riesgos y el uso de elementos de protección personal (EPP).

Materiales y métodos

Se efectuó un estudio observacional sobre profesionales veterinarios que se dedican al manejo y atención de grandes animales en la provincia de Santa Fe, Argentina. El diseño fue de tipo transversal, la unidad de interés el veterinario y la población objetivo los veterinarios rurales santafesinos. Se censaron 741 profesionales que participaron en jornadas obligatorias de capacitación continua del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Santa Fe (1^{era} y 2^{da} Circunscripción), siendo la tasa de respuesta del 75,8 % (n= 562). Se les entregó a los profesionales un cuestionario estructurado dividido en tres secciones: a) características demográficas del entrevistado (sexo, edad, antigüedad profesional y región geográfica de ejercicio profesional), b) cuantificación de la frecuencia de accidentes *in itinere* y c) percepción de los riesgos *in itinere* y uso de elementos de protección personal. Previo a la distribución del cuestionario, se explicó la finalidad e importancia de la encuesta, poniéndose énfasis en que el interés de las mismas no estaba

en las actividades o actitudes de ningún colega en particular, sino en las frecuencias a nivel poblacional, por lo que las respuestas debían ser anónimas.

La “percepción del riesgo” fue definida de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO) (2002) y estimada mediante una escala ordinal (alta/ media/ baja). El análisis estadístico incluyó coeficiente de Spearman y χ^2 . Los elementos de protección personal utilizados *in itinere* (EPPii) incluidos en el estudio fueron el cinturón de seguridad y la luz baja durante el día. Su frecuencia de uso se estimó mediante una escala ordinal (Tarabla 2009).

El análisis de la ocurrencia de ALii incluyó la búsqueda de agrupamientos espaciales para poblaciones de distribución heterogénea asumiendo una distribución Bernoulli. El análisis se realizó utilizando el programa SatScan versión 9.2 (disponible en www.satscan.org). Además, se calculó la frecuencia de ALii en cada departamento de la provincia. Los mapas fueron realizados con QGIS versión 2.2.0-Valmiera (disponible en www.qgis.org).

Resultados

En promedio, los veterinarios que respondieron a las encuestas tenían 42,2±10,1 años de edad y habían desarrollado su actividad profesional durante 16,2±11,1 años. El 93 % de los encuestados eran hombres. Las mujeres eran significativamente más jóvenes y tenían menor antigüedad laboral que los hombres (p<0,001). La región geográfica donde se desarrollaba la labor profesional no estuvo significativamente asociada ni a la antigüedad profesional ni al sexo.

El porcentaje de veterinarios que sufrieron ALii fue del 14,8 %, siendo mayores en departamentos ubicados en el norte provincial (San Cristóbal: 23 %, 9 de Julio: 21 % y General Obligado: 20 %) (Figura 1). Se encontró un *cluster* significativo (p= 0,017) de 180,79 Km de radio en el sureste provincial (coordenadas del centro: 33.228894 S, 60.330247 O) y riesgo relativo= 0,42 (*cluster* de baja tasa) (Figura 1).

El uso de la luz baja durante el día y del cinturón de seguridad fue más frecuente en rutas que en caminos rurales (Figura 2). Aunque la frecuencia de utilización de la luz baja durante el día y el cinturón de seguridad tendieron a estar correlacionadas entre sí, los coeficientes fueron relativamente bajos (Tabla 1).

El tránsito en rutas fue percibido como más riesgoso por una mayor proporción de entrevistados (riesgo alto: 63,1 %, medio: 32,4 %, bajo: 4,5 %) que el tránsito en caminos rurales (riesgo alto: 46,3 %, medio: 39,4 %, bajo: 14,3 %). Aunque estas cifras parecen corresponderse con el mayor uso de EPPii en rutas que en caminos rurales, las frecuencias de uso de

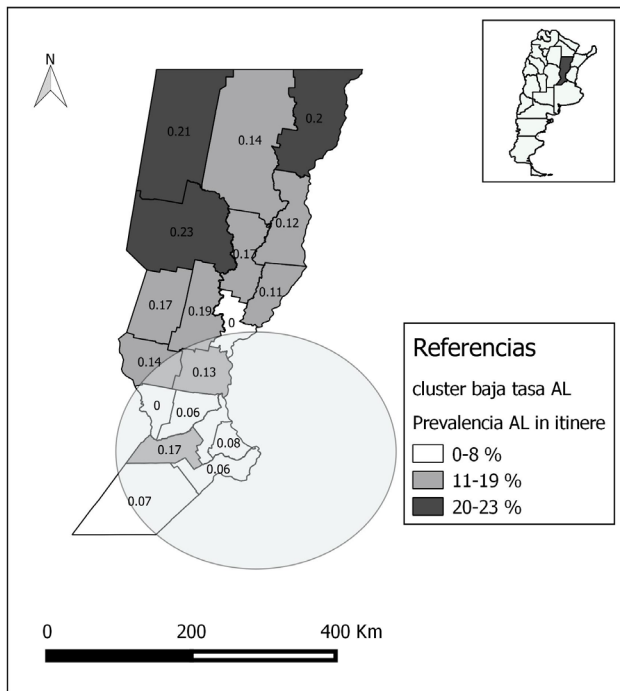


Figura 1: Mapa coroplético que muestra la frecuencia de veterinarios que sufrieron accidentes *in itinere* de la provincia de Santa Fe y el *cluster* de baja tasa.

EPP*ii* fueron independientes de las percepciones del riesgo en el tránsito hacia y desde el ejercicio de las actividades profesionales con coeficientes de correlación de Spearman que variaron entre -0,06 y 0,13.

Discusión

Los AL*ii* son de gran relevancia para el veterinario dado que por las características propias de su trabajo debe desplazarse largas distancias para atender a sus clientes (Álvarez *et al.* 2007). Estos accidentes pueden causar más frecuentemente lesiones severas y recuperaciones incompletas que los producidos *in labore* (Nienhaus *et al.* 2005). Diferentes estudios han reportado frecuencias disímiles de AL*ii* en la población de veterinarios. Tarabla (2009) reportó una frecuencia de AL*ii* del 39,4% entre los veterinarios que ejercían su labor profesional en la región centro-oeste de la provincia de Santa Fe. Por otro lado, la frecuencia de AL*ii* encontradas en este estudio fue mayor al 9,64% notificada para el total del sector agropecuario en Argentina (Superintendencia de Riesgos del Trabajo 2005).

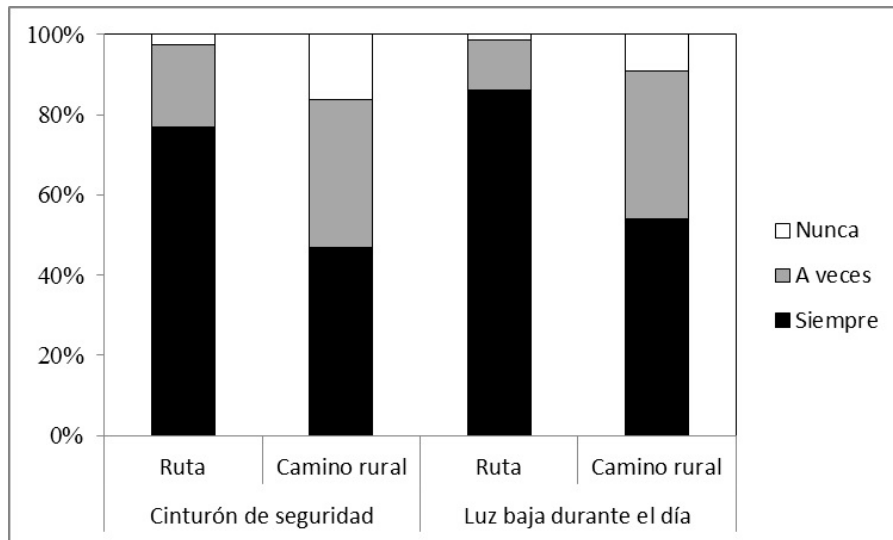


Figura 2: Frecuencia (%) de uso de elementos de protección utilizados en el tránsito *in itinere* por veterinarios rurales, provincia de Santa Fe.

Tabla 1. Coeficientes de correlación de Spearman entre las frecuencias de uso (nunca/ a veces/ siempre) de elementos de protección personal *in itinere* por parte de veterinarios rurales, Santa Fe.

Elemento		Cinturón de seguridad		Luz baja de día	
		Camino rural	Ruta	Ruta	Camino rural
Cinturón de seguridad	Ruta	0,55*	0,33*	0,28*	
	Camino rural	-	0,22*	0,53*	
Luz baja de día	Ruta	-	-	0,43*	

Referencias: *significa que la correlación fue estadísticamente significativa con un nivel de significancia $p < 0,01$

La zona en la cual los veterinarios desempeñan su actividad profesional parece tener una influencia dispar en la presentación de accidentes. En un análisis previo sobre los factores de riesgo asociados a la presentación de accidentes laborales (asociados a la práctica profesional con animales) en veterinarios rurales, la región geográfica no estuvo significativamente asociada, pero sí se observó una relación entre la frecuencia de accidentes laborales y el sexo, la edad y la antigüedad profesional del veterinario accidentado (Signorini *et al.* 2014).

La frecuencia de accidentes vehiculares es directamente proporcional a la distancia recorrida y las horas de manejo (Fritschi *et al.* 2006; Jeyaretnam *et al.* 2000; Martin *et al.* 1983). Es probable que la menor cantidad de rutas pavimentadas y la mayor distancia que se debe recorrer en el norte provincial estén relacionadas con la mayor frecuencia de ALii detectada en los departamentos norteños y el *cluster* de baja tasa detectado en el sur provincial. Un estudio desarrollado en veterinarios del centro-oeste de la provincia mostró que los ALii ocurrieron más frecuentemente durante el tránsito en caminos rurales. Sin embargo, y coincidiendo con los resultados del presente trabajo, fue paradójicamente donde se registró la menor frecuencia de uso de los EPPii (Tarabla 2009).

El uso de EPPii fue inconsistente con el seguimiento de normas de seguridad imprescindibles, aún aquellas de uso legalmente obligatorio como el cinturón de seguridad y la luz baja durante el día en rutas. Si bien los encuestados percibieron que el tránsito en rutas tenía un riesgo mayor del tránsito por caminos rurales, no se observaron correlaciones significativas entre uso de elementos de protección personal y la percepción del riesgo. Esto indica que quienes percibían un alto riesgo y quienes usaban los elementos de protección con mayor frecuencia eran personas diferentes. Esto puede indicar que la percepción de los riesgos no necesariamente está ligada a la toma de medidas preventivas (Ugnia *et al.* 2008). La decisión de usar EPP podría basarse en varios factores, incluyendo normas sociales, experiencias personales, capacitación recibida y costos (DellaValle *et al.* 2012). Obviamente, dadas las limitaciones propias de un diseño transversal, es imposible determinar si una baja percepción de riesgo precede a la decisión de no adoptar una medida preventiva y esta carencia facilita la ocurrencia de un accidente, o bien si la ocurrencia de un evento provoca una percepción más alta de un riesgo y la adopción los recaudos correspondientes. Las relaciones comunicadas son sólo asociaciones observadas, no asociaciones causales, y cualquier combinación temporal de eventos es posible.

La desobediencia de las leyes de tránsito también ha sido notificada en áreas urbanas de la

provincia, donde sólo el 9% de los conductores usaba cinturón de seguridad (Beltramino y Carrera 2007). En concordancia con las líneas de acción desarrolladas en provincias vecinas (Rojas Cabrera 2015), en los últimos años se acentuaron las medidas de control de tránsito en diferentes puntos de circulación vehicular. Sin embargo, estas no alcanzan al tránsito por caminos rurales, por lo que gran parte de la responsabilidad sobre el uso de EPP recae en el propio conductor.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los PICT 10-0989 “Riesgos ocupacionales en Medicina Veterinaria y en otras actividades relacionadas con la ganadería” y 14-1556 “Riesgos ocupacionales en Medicina Veterinaria”, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, República Argentina.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

- Álvarez ET, Peratta D, García Cachau M, Cavagión L, Larrieu E, Ferrán A. Enfermedades y lesiones laborales en Médicos Veterinarios de Argentina. *Cien Vet.* (UNLPam, Argentina) 2007; 9: 49-67.
- Angoules AG, Linder T, Vrentzos G, Papakostidis C, Giannoudis PV. Prevalence and current concepts of management of farmyard injuries. *Injury Int J Care Injured* 2007; 38S, S26-S33.
- Beltramino JC, Carrera E. El respeto a las normas de tránsito en la ciudad de Santa Fe, Argentina. *Rev Panam Salud Púb.* 2007; 22: 141-5.
- DellaValle CT, Hoppin JA, Hines CJ, Andreotti G, Alavanja MCR. Risk-accepting personality and personal protective equipment use within the agricultural health study. *J Agromed.* 2012; 17(3): 264-76.
- Fritschi L, Day L, Shirangi A, Robertson I, Lucas M, Vizard A. Injury in Australian veterinarians. *Occup Med.* 2006; 56: 199-203.
- Hope A, Kelleher C, Holmes L, Hennessy T. Health and safety practices among farmers and other workers: a needs assessment. *Occup Med.* 1999; 49(4): 231-5.
- Jeyaretnam J, Jones H, Phillips M. Disease and injury among veterinarians. *Aust Vet J.* 2000; 78: 623-9.
- Leveau CM. Variaciones espaciales en el patentamiento y la mortalidad de usuarios de motocicletas por lesiones de tránsito en Argentina. *Salud Colectiva* 2013; 9: 353-62.
- Leveau CM, Ubeda C. Muertes por lesiones de tránsito en Argentina: un análisis espacial para el período 2001–2009.

Rev Panam Salud P ub. 2012; 31: 439-42.

Lucas M, Day L, Fritschi L. Serious injuries to Australian veterinarians working with cattle. *Austr Vet J* 2012; 91(1-2): 57-60.

Martin R, Schnurrenberger P, Habtemariam T. Automobile accidents in 111 veterinarians. *Int J Trauma* 1983; 10: 138-45.

Moore DA, Carpenter TE. Spatial analytical methods and geographic information systems: use in health research and epidemiology. *Epidemiol Rev.* 1999; 21: 143-61.

Nienhaus A, Skudlik C, Seidler A. Work-related accidents and occupational diseases in veterinarians and their staff. *Int Arch Occup Environ Health* 2005; 78: 230-38.

OPS. 2015. Causas principales de mortalidad en las Am ericas. http://ais.paho.org/hip/viz/mort_causasprincipales_It_oms.asp. Consultado 26/01/16.

Rojas Cabrera ES. Mortalidad por causas violentas en adolescentes y jóvenes de dos ciudades del Cono Sur: Córdoba (Argentina) y Porto Alegre (Brasil), 1990-2010. *Ci nc Saúde Coletiva* 2005; 20: 29-37.

Schenker MB, Orenstein MR, Samuels SJ. Use of protective equipment among Californian farmers. *Am J Ind Med.* 2002; 42: 455-64.

Signorini ML, Pérez L, Tarabla HD, Molineri AI. Accidentes laborales en veterinarios rurales. *Avances Cien Vet U de Chile* 2014; 29: 36-41.

Superintendencia de Riesgos del Trabajo (SRT). Panorámica de los riesgos laborales en el sector agrario. Superintendencia de Riesgos del Trabajo, 2005; 105 pp.

Tarabla H. Riesgos de trabajo en veterinarios del centro-oeste de la Provincia de Santa Fe, Argentina. *InVet* 2009; 11: 39-47.

Tarabla HD, Warnke O, Marín MA. Accidentes en trabajadores ganaderos en Sarmiento, Santa Fe, Argentina. *Rev. Salud Pública UNC.* 2009; Ed. Especial 5:15.

Ubeda CL, Espitia-Hardeman V, Bhalla K, Borse NN, Abraham JP, Dellinger A, Ferrante D, Peltzer R. National burden of road traffic injuries in Argentina. *Int J Inj Contr Saf Promot.* 2012; 19: 9-18.

Ugnia L, Sequeira G, Tarabla H, Weyers A, Espósito N. Percepción y actitud frente a factores de riesgo ambientales y zoonosis. III Congr. Latinoam. y VI Argentino de Zoonosis, Buenos Aires, 2008; SP 142.

WHO-World Health Organization. 2002. Risk perceptions. Capítulo 3. www.who.int/whr/2002/en/chapter3S.pdf. Consultado 26/01/2016.

Carbunco. Pasado y presente

Anthrax. Past and present

Bernagozzi JA*, Barragán JH, Anselmino F

Cátedra de Inmunología II. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

*Correo electrónico del autor: gberna@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: El presente trabajo es una revisión bibliográfica que abarca el agente etiológico, sus principales características, mecanismos y factores que condicionan la patogenicidad, la patogenia y su utilización en la guerra bacteriológica y en el bioterrorismo a lo largo de la historia.

Palabras clave: *Bacillus anthracis*, factores de patogenicidad, toxinas, patogénesis

Abstract: The present work is a literature review that covers the etiologic agent and its main features, mechanisms and factors that determine the pathogenicity and the pathogeny. It also covers the use of anthrax in bacteriological warfare and bioterrorism throughout history.

Key words: *Bacillus anthracis*, pathogenic factors, toxins, pathogenicity

Introducción

El carbunco, carbunco bacteriano, carbón, grano malo o ántrax es una enfermedad conocida desde la antigüedad que afecta fundamentalmente a animales herbívoros, causando epizootias con grandes pérdidas económicas. Es, además, una zoonosis (Scorpio *et al.* 2006). El *Bacillus anthracis* (Koch 1876) ha sido utilizado desde hace años como arma biológica, dada su facilidad de cultivo, la perdurabilidad de las formas esporuladas y su alta capacidad infectante (Tournier *et al.* 2009). Los antecedentes como tal se remontan a ambas guerras mundiales. Por otra parte, los escapes producidos al medio ambiente en forma accidental, presumiblemente por deficiente manejo de las plantas productoras de estas armas biológicas, han causado grandes pérdidas de vidas humanas (Christopher *et al.* 1997).

A partir de la caída de las torres gemelas en Estados Unidos, en el año 2001, *Bacillus anthracis* ha recobrado protagonismo como microorganismo de elección para actos bioterroristas, superando, inclusive, a otros patógenos, como los virus Ebola o virus de la viruela (*small pox*), que requieren una mayor complejidad de cultivo, manejo y conservación (Riedel 2005).

El ántrax afecta a animales domésticos, salvajes y exóticos. Las especies afectadas incluyen equinos, vacunos, ovinos, caprinos, porcinos, hipopótamos, elefantes, leones, cebras y camélidos (Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle 2005). Generalmente las personas se contagian por contacto con animales infectados, utensilios o productos animales contaminados, presentando tres formas típicas de infección: cutánea, gastrointestinal e inhalatoria, siendo esta última la más peligrosa (Abramova *et al.* 1993; Iglesby *et al.* 2002; Mock y Fouet 2001).

Desde las postrimerías del siglo XIX existe una gran cantidad de trabajos sobre desarrollo de vacunas anticarbuncosas, observándose a partir del mismo momento de la implementación de la vacunación un descenso importante y paulatino de la tasa de infección (Scorpio 2006). Por otra parte, el desarrollo de las vacunas ha experimentado un progreso significativo desde aquella primera a base de células diseñada y elaborada por Louis Pasteur en 1881 (Geison 1995), pasando por la cepa pXO2 negativa desarrollada por Max Sterne en la década de 1930 (Sterne 1937), las vacunas a toxoide (Turnbull *et al.* 1988), las de filtrados de cultivo adsorbidos por hidróxido de aluminio en 1970 (BioThrax: anthrax vaccine adsorbed 2008), hasta las vacunas recombinantes del antígeno protector (PA_r) disponibles, seguramente, en un futuro no lejano. Todos estos procedimientos produjeron un pronunciado refinamiento de las mismas, con un incremento considera-

ble en la seguridad y una disminución de reacciones adversas asociadas a la vacunación, sin disminuir la efectividad. La amenaza de desarrollo de cepas de *Bacillus anthracis* genéticamente modificadas, resistentes a antibióticos o a las vacunas existentes, hace necesario profundizar las investigaciones con el objetivo de encontrar nuevas técnicas que incluyan hibridación en sitios genómicos, proteómicos o en transposones con el fin de desarrollar nuevas vacunas que protejan contra infecciones producidas por variantes muy patógenas.

Historia

La enfermedad fue mencionada por Hipócrates al describir ciertas lesiones cutáneas de la piel y la designó con el nombre de anthrax debido a su aspecto (etimológicamente del griego anthrax: carbón) (Schwartz *et al.* 2009). Esta enfermedad era muy bien conocida en Europa encontrándose citas en la literatura que ubican la descripción entre los años 1491 y 1190 AC. Existen algunas referencias no tan precisas sobre la aparición de casos en China, coincidentes con la sintomatología de carbunco mucho más antiguas (3000 AC). La enfermedad está descrita en el Viejo Testamento (Exodus 9:3) como dos de las diez plagas (5: pestilencias y 6: granos o furúnculos) (Guichard *et al.* 2012).

Uno de los primeros incidentes bien documentados data del año 1500 AC cuando los egipcios describieron "la plaga del furúnculo" ("plague of boils") que afectaba al ganado del faraón (Holmes 2003). Hacia fines del siglo XV, John Bell encuentra la enfermedad en humanos cardadores de lana (History of anthrax through the age). Casimir Davaines, médico francés, describió por primera vez el agente etiológico al observarlo en la sangre de carneros infectados en el año 1850 (Geison 1995; Kauffman, Schaible 2005; Tournier *et al.* 2009). En 1876 Koch lo aisló en estado puro y lo clasificó, denominándolo *Bacillus anthracis* (Carter 1985; Davis *et al.* 1996; Geison 1995). Entre los años 1880 y 1881 se registró, por primera vez, el uso exitoso de una vacuna a base celular. En efecto, Jean-Joseph Henri Toussaint, William Smith Greenfield y Louis Pasteur en Pouilly le-Fort vacunaron, y desafiaron luego con una cepa patógena, a 24 carneros, 1 cabra y 6 vacas (Pasteur *et al.* 1880; Scorpio *et al.* 2006). En 1904, Oskar Bail identificó el factor protector, FP (del inglés, *protector antigen* - PA) en exudados de animales infectados (Bail 1904). Gladstone (1946) aisló el FP en filtrado de cultivos. En la década de 1950, Harry Smith y Keppie (1963) descubrieron la estructura completa de la toxina del *Bacillus anthracis*.

Si bien, como se mencionara previamente, el uso del bacilo como arma biológica data de la primera guerra mundial, en la última década ha cobrado

inusitada relevancia después de la destrucción de las torres gemelas en el año 2001 (Friedlander 2001b). Con posterioridad a ello se utilizaron esporos del bacilo aerolizados en sistemas de aire acondicionado, o contaminando correspondencia, dada la elevada patogenicidad y mortalidad de la forma inhalatoria, pasando la sintomatología prácticamente desapercibida y confundiendo la misma con estados gripales, que hace que cuando se instala el tratamiento si no se está prevenido sobre la posible causa, sea demasiado tarde, provocando una tasa importante de mortalidad/morbilidad. En Estados Unidos, luego del atentado contra las torres gemelas, el correo fue el medio utilizado, siendo responsable, por lo menos, de 22 casos confirmados de ántrax (11 cutáneos y 11 inhalatorios) incluyendo 5 defunciones, en 7 localidades (Jernigan 2001).

Con anterioridad, en 1979, se describieron 96 casos de ántrax en humanos, con un saldo de 68 muertos, debido a un escape accidental de esporos de un laboratorio militar en la localidad de Sverdlosk, en la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (Abramova et al. 1993; Meselson et al. 1994). Sin embargo, la primera comunicación sobre el uso del *Bacillus anthracis* con fines de bioterrorismo data de 1993, cuando Aum Shinrikyo, del culto del fin del mundo, esparció esporos en Tokio, Japón, desde lo alto de un edificio. Aparentemente, no tuvo efectos deletéreos ya que la cepa utilizada era, probablemente, la cepa Sterne, variante atenuada vacunal (Keim et al. 2001; Takahashi et al. 2004).

Agente etiológico

El agente etiológico, *Bacillus anthracis*, pertenece al género *Bacillus*, constituido por bacilos grandes, Gram positivos, de alrededor de 1 a 1,5 µm de ancho por 3 a 10 µm de largo, con capacidad de formar esporos. Estos bacilos crecen de manera óptima en condiciones aeróbicas y no son exigentes desde el punto de vista metabólico, desarrollando perfectamente bien en medios comunes con una temperatura óptima de incubación de 37 °C, pudiendo hacerlo en un rango comprendido entre los 25 y 37 °C.

En tejidos provenientes de animales infectados pueden encontrarse en forma de bacilos aislados o formando cadenas cortas. Las colonias son grandes, rugosas, grisáceas y de bordes irregulares.

Los tejidos de los animales afectados, especialmente la sangre, contienen gran cantidad de bacilos y esporos que son liberados al exterior por hemorragias a través de las aberturas naturales, como asimismo por orina, saliva, vómitos, heces, sobre todo con melena, e incluso por leche. La incorrecta eliminación de los cadáveres (cuando permanecen en la superficie, son trasladados o enterrados en condi-

ciones precarias), por no seguir estrictas normas de bioseguridad, provocan una gran contaminación del suelo. Esto origina una alta concentración de esporos en los sitios donde la enfermedad es enzoótica, lo que constituye los denominados campos malditos. Se han descrito casos de contaminación del suelo a través del uso de fertilizantes, sobre todo elaborados a partir de harina de hueso, en la que los esporos sobreviven a los procesos de manufactura (FAO 2001). Sin embargo, la persistencia de los bacilos en el suelo está condicionada por los procesos biológicos que en él se desarrollan, afectando fundamentalmente a la forma vegetativa cuando todavía no ha esporulado. Sufren procesos de competición con las bacterias de la flora telúrica, especialmente con especies del género *Pseudomonas*. Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle (2005) mencionan la capacidad que poseen las aflatoxinas de inhibir el desarrollo de ciertas especies de bacterias del género *Bacillus*. Se ha demostrado que concentraciones de 10 µg/ml son capaces de inhibir el desarrollo de *B. brevis* mientras que concentraciones más altas (15 µg/ml) inhiben el desarrollo de *B. megaterium* y *B. anthracis*.

El suelo es el habitat natural del esporo y principal fuente de contaminación del ganado, siendo el pH ideal superior a 6, ya que los muy ácidos no permiten la supervivencia de los mismos. También se ha encontrado el esporo en suelos áridos y semiáridos de África, Asia y Sudamérica (Salle et al. 2006; Turnbull et al. 2002). Se han descrito casos de carbunco a mediados del siglo XX en Canadá, como consecuencia de la contaminación del suelo con efluentes provenientes de la industria del cuero.

La viabilidad de los esporos no es indefinida, pero una gran cantidad de trabajos demuestra una perdurabilidad apreciable. Pasteur, Roux y Chamberland encontraron formas viables en el suelo luego de 17 años de haber sido enterrado un animal afectado de carbunco (Pasteur et al. 1880). Merchant et al. (1961) citan la aparición de casos de carbunco luego de 25 años de haberse registrado casos en el lugar. Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle (2005) mencionan en su publicación el hallazgo de esporos viables en escobillones, algodón y papel de envolver entre 12 y 41 años después del contacto. Wilson et al. (1964) encontraron esporos viables en una botella con tierra seca luego de 60 años. En huesos provenientes de excavaciones arqueológicas realizadas en el Parque Nacional Kruger de la República de Sudáfrica, fueron encontrados esporos de una data aproximada de 200 años. El Dr. García Carrillo (comunicación personal), a cargo del área de carbunco, en el entonces Centro Panamericano de Zoonosis, mencionaba la estabilidad de esporos de la cepa Sterne 34 F2 en cultivos madres para elaboración de vacunas durante 11 años.

En general, el suelo es reservorio de esporos, desde donde se infectan los animales, siendo el ciclo más frecuente de transmisión animal-suelo-animales, aunque existen otras como a través de paja, estiércol, establos, pesebres y camas. No debe descartarse el contagio por la ingestión de carnes provenientes de animales enfermos o alimentos naturales o balanceados contaminados, sobre todo estos últimos, con harinas de carne o de hueso en su composición, provenientes de animales infectados. La mayor parte de las infecciones se produce por la ingestión o inhalación de esporos provenientes de pastos de terrenos contaminados, los que penetran por abrasiones de la piel y/o mucosas o a través del aparato respiratorio.

Los brotes son más frecuentes en verano, por el hecho de que los pastos son generalmente más cortos, ralos y duros debido a la sequedad del ambiente, y los animales al pastar rozan la tierra con el hocico, lo cual favorece la aparición de abrasiones en la barrera cutáneo-mucosa. Por otra parte, la sequedad ambiente, aumenta la presencia de esporos en el polvo.

Si bien hasta el momento la utilización de *Bacillus anthracis* en la guerra biológica y atentados bioterroristas no ha tenido una tasa significativa de afectados, varias proyecciones permiten caracterizar a este agente etiológico como de gran poder devastador y de alta mortalidad ante nuevos ataques, sobre todo ante la posibilidad de que las organizaciones bioterroristas obtengan cepas resistentes a las vacunas y/o antibióticos, lo que hará necesario la disponibilidad de una mayor cantidad de vacunas efectivas y seguras. La investigación está focalizada en la obtención de vacunas multivalentes con capacidad de neutralización en las diversas etapas del desarrollo de la enfermedad con la intención de minimizar la replicación del bacilo en los tejidos del hospedador y disminuir la capacidad de expresar moléculas tóxicas.

Susceptibilidad de las especies a la infección

Hay notables diferencias de susceptibilidad entre las distintas especies. La cabra es la más sensible y, por ello, es considerada animal centinela. Le siguen los óvidos, excepto el carnero de Argelia que es muy resistente, bóvidos y demás herbívoros (Blood *et al.* 1983). Entre los factores que modifican la susceptibilidad podemos mencionar la eficacia de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares neutrófilos, la presencia de sustancias bactericidas séricas y la efectividad del complemento, habiéndose observado que la deficiencia de la fracción C5 del mismo disminuye la resistencia a la enfermedad. Una dieta alimentaria carente de lisina (aminoácido requerido para una correcta fagocitosis), radiaciones, corticoides, estrés o modificaciones en las condiciones

del hábitat favorecen el desarrollo de la enfermedad. Basta recordar las experiencias de Pasteur que logró producir la enfermedad en las gallinas al sumergir una o ambas patas en agua fría, o en ranas cuya temperatura corporal se elevaba y mantenía a 36-38° C (Walker *et al.* 1967).

En el cerdo se han encontrado bacilos en los linfonódulos submaxilares y mesentéricos sin producción de enfermedad. Se debe puntualizar que, en esta especie, la enfermedad se caracteriza por una marcada tumefacción faríngea y cervical.

En zoológicos se han afectado elefantes, leones, leopardos, pumas y osos, entre otras especies. Los roedores suelen ser resistentes, destacándose el visón aleutiano, que no la padece. En ratas inoculadas con el bacilo, solo se afecta el 14% (Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle 2005).

Los perros y gatos son muy resistentes, sobre todo los adultos, pero una vez afectados suelen morir por edema laríngeo y lesiones asociadas del tracto digestivo. Las aves son muy resistentes, aunque su presencia se ha observado en avestruces y en patos, en heces de águila y en el buche del gorrión inglés. Las aves carroñeras pueden eliminar esporos a través de las heces, a pesar del ácido úrico presente en las mismas (Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle 2005). Los animales poiquilotermos, entre ellos los peces, son muy resistentes.

Variabilidad genética

La gran variabilidad genética de *B. anthracis* depende básicamente de las regiones denominadas VITA. Se conocen, como mínimo, diez serotipos, muchos genotipos y una gran cantidad de subgenotipos (Pavan *et al.* 2011; Read *et al.* 2002, 2003, 2005). Esta variabilidad genética permite identificar al bacilo actuante en un brote y realizar la trazabilidad o modo de diseminación del mismo. Fouet *et al.* (2002) observaron que 50 aislamientos provenientes de animales de Francia correspondían a 8 genotipos distintos, pertenecientes a dos racimos genéticos. El genotipo tipificado como B2 fue prevalente en el sur y el identificado como A1, solo fue hallado en el norte. Realizando el seguimiento del origen del bacilo se determinó que el brote procedía del sur de África. Smith *et al.*, en trabajos realizados en el año 1999, determinaron que las cepas aisladas procedentes del Parque Kruger de la República de Sudáfrica pertenecían a diferentes genotipos, lo que permitió inferir que se asentaron allí desde hace mucho tiempo. El subtipado molecular del *Bacillus anthracis* es muy importante en la determinación, diferenciación e identificación de las diversas cepas, lo que, entre otras ventajas, puede ayudar mucho a la identificación de la procedencia de los esporos utilizados por el bioterrorismo (Smith *et al.* 1999).

Factores asociados a la patogenicidad de *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis se caracteriza por su larga persistencia en el suelo, dada su capacidad de esporular que, si bien no es un factor de patogenicidad directo, está asociado a los procesos de permanencia en el ambiente y a la capacidad de infección (Scorpio et al. 2006). Posee dos factores de patogenicidad principales, ampliamente descritos desde hace años en la literatura: la cápsula, constituida por ácido poli- γ -glutámico (PGA), codificado por un plásmido denominado pXO2 y la toxina específica codificada por otro plásmido termosensible, denominado pXO1 (Pavan et al. 2011). Con posterioridad han sido descritos otros que pasaremos a detallar.

Forma de resistencia: espora

El espora constituye la forma de resistencia de las bacterias, presentando, como característica importante, una alta perdurabilidad en el medio ambiente. Cuando la forma vegetativa de *Bacillus anthracis* toma contacto con el aire, y en particular con el oxígeno, origina la formación de esporos, los que son los responsables de la supervivencia del patógeno por muchos años, soportando inclemencias climáticas y permitiendo la transmisión de la enfermedad a huéspedes susceptibles, incluyendo el hombre (Tournier et al. 2009). Por otra parte, algunos autores también mencionan el hallazgo de formas vegetativas del bacilo en ciertos tipos de suelos.

El espora esférico u oval (Fig. 1), que no deforma el bacilo, mide 0,8 a 1 μm y está formado por

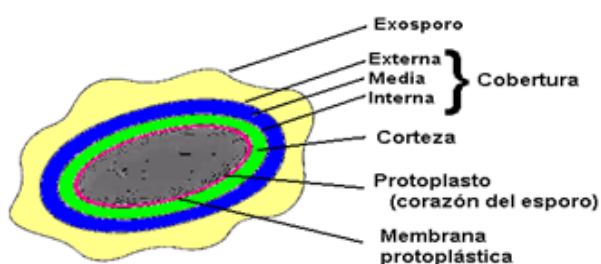


Figura 1. Corte de espora de *B. anthracis*. Protoplasto, corazón del espora o core. Contiene el DNA y todos los elementos necesarios en forma deshidratada con capacidad de dar nacimiento a la nueva célula. Corteza. Finas láminas compuestas de peptidoglicanos, que le dan al espora mucha resistencia a diversos agentes injuriantes. Cobertura. Estructura proteica con capacidad de tamizar y excluir el paso hacia la parte más profunda del espora de algunas enzimas y productos químicos. Exosporo. Estructura más externa del espora en forma de saco. *Bacillus subtilis* no posee esta capa.

varias capas, siendo la más externa el exosporo, seguida hacia el interior de una cobertura con tres capas o estamentos -externa, media e interna- luego la corteza, la membrana protoplástica y el protoplasto o corazón del espora (Moberly et al. 1966).

Cápsula

La cápsula cumple un importante rol en la patogenia de la enfermedad, ya que impide la fagocitosis, protegiendo al bacilo, además, de la acción lítica del complemento (Pavan et al. 2011). Es un factor esencial para la virulencia y responsable de la permanencia del bacilo en el organismo para iniciar su acción patógena.

Ultraestructuralmente, la cápsula del bacilo es una estructura compuesta enteramente por ácido poli-D-glutámico o poli-D- γ -glutamato, pero sólo en la configuración D. La síntesis de la cápsula es dependiente de cuatro proteínas (Cap A, B, C y E) codificadas en un operón denominado pXO2 (Pavan et al. 2011).

Otra proteína codificada por el operón *cap* es la denominada Cap D o Dep A. Entre las funciones específicas de esta proteína podemos mencionar la posibilidad de degradar la cápsula y provocar la liberación de fragmentos de bajo peso molecular, relacionados fuertemente con la virulencia. Además, aparentemente, Cap D es capaz de ligar covalentemente la cápsula a los peptidoglicanos presentes en la pared celular (Candela et al. 2005; Fouet 2009; Richter et al. 2009).

La cápsula está codificada por tres genes situados en el plásmido de 110-kilobases. Es un polímero de ácido poli-D-glutámico que determina la resistencia a la fagocitosis y a la lisis por proteínas catiónicas del suero (Keppie et al. 1963). Una L-aminoácido-transaminasa presente en el *Bacillus anthracis*, y también en el *B. subtilis*, forma L-alanina (y ácido α -cetoglutárico) a partir del ácido pirúvico y del ácido L-glutámico. Luego, por acción de la alaninracemasa, se transforma en D-alanina. Esta D-alanina, conjuntamente con el ácido α -cetoglutárico, a través del accionar de una D-amino-transaminasa, pasa a ácido D-glutamínico que al polimerizarse dará lugar a la formación de la cápsula.

Las propiedades antifagocíticas de la cápsula fueron descritas por Gruber y Futaki en 1907 y, en 1915, Bail las asoció con la virulencia del bacilo. Trabajos realizados por Keppie et al. en 1963 demostraron que cuando se lograba adicionar nuevamente cápsula a aquellas cepas a las cuales se les había eliminado genéticamente la posibilidad de producirlas e identificadas como cepas NP y cepa Sterne, éstas recuperaban la capacidad de inhibir la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares neutrófilos del coba-

yo. De acuerdo con esto, podemos concluir que los anticuerpos anticapsulares favorecen la fagocitosis.

La cápsula también produce el camuflaje del bacilo hacia el sistema inmune, dada la propiedad que tiene de adherir proteínas del hospedador. Durante la década de 1930, los investigadores demostraron que la cápsula es también capaz de unirse a proteínas básicas del suero, como la lisozima, con posibilidad, además, de desactivar péptidos catiónicos con propiedades antibacterianas (Makino *et al.* 1989, 2002; Schneerson *et al.* 2003). Se ha sugerido que los fragmentos de la cápsula pueden unirse a mediadores de la inmunidad innata actuando como inmunomoduladores. También puede unir el complemento, quizás en conjunción con una capa de proteína S, y provocar la inhibición de la actividad antracida normal del suero de caballo y de extractos leucocitarios de cobayos (Harvill *et al.* 2005; Makino *et al.* 2002; Zwartouw y Smith 1956).

Toxina

El esporo de *Bacillus anthracis* es el responsable de su persistencia en el ambiente y de la forma de ingreso al organismo. La cápsula presente en la fase vegetativa impide la eliminación del esporo por parte de las células específicas de la inmunidad innata permitiendo la multiplicación del bacilo. La toxina, finalmente producida por estas células, produce la muerte del individuo y la posterior liberación de los esporos al medio para reiniciar el ciclo (Glomski 2011).

En el año 1954, Smith y Keppie demostraron que el suero extraído de cobayos infectados con *Bacillus anthracis*, esterilizado mediante filtración, y por ende libre de bacterias, cuando se inocula a otro cobayo por vía endovenosa es capaz de producir la muerte del mismo. Este mismo filtrado cuando se inocula por vía subcutánea produce un pronunciado edema. Los mismos autores, más tarde, describieron la presencia de dos metabolitos con capacidades tóxicas diferentes cuando se unen a una proteína central que actúa a modo de receptor (Domínguez Carmona y Domínguez de la Calle 2005; Leppla 1991; Leppla *et al.* 1990; Loving *et al.* 2009; Moayeri y Leppla 2001).

Bacillus anthracis produce una única toxina de estructura proteica codificada por un plásmido termosensible denominado pXO1. Está constituida por tres factores antigénicamente diferentes, codificados por genes plasmídicos distintos y denominados: el antígeno protector, PA, (*protector antigen*) o FP (*factor protector*), el factor edematógeno o FE o EF (*edema factor*) y el factor letal o FL o LF (*lethal factor*) (Moayeri *et al.* 2004; Pavan *et al.* 2011; Tournier *et al.* 2009).

El PA, en realidad, y contrariamente a lo que podemos suponer, no es un factor protector para el

hospedador, sino que precisamente actúa de manera inversa, ya que constituye la llave que permite el ingreso a las células de los otros dos factores cuando se copulan con él. La asociación de este PA con el FL da lugar a la formación de la denominada toxina letal, TL o LT (*lethal toxin*) y cuando se conjuga el PA con el FE se produce la denominada toxina edematógena o TE o ET (*edema toxin*). Esta unión se produce de manera aleatoria.

Una vez descubierta la toxina y establecida su estructura en la década del 60, la investigación entró en un impasse, resurgiendo en la década de los 80 con los avances en biología molecular, sobre todo en el clonado de toxinas y en la purificación de las mismas. En la década del 90, los descubrimientos en la genética de los gérmenes Gram positivos, posibilitó la creación de mutantes isogénicas, conteniendo genes productores de toxinas, surgiendo de los estudios llevados a cabo por Cataldi *et al.* (1990) y por Pezard *et al.* (1991) que el mayor factor de virulencia del *Bacillus anthracis* es la toxina letal (Bergman 2011).

El descubrimiento del mecanismo de muerte por la acción de la toxina sobre macrófagos, y también sobre células eucarióticas, pone en primer plano la función del PA como mecanismo principal de activación. Con posterioridad al ataque terrorista sufrido por Estados Unidos en el año 2001, los estudios sobre la TL crecieron exponencialmente, superando en una relación de 10 a 1 a los realizados sobre la TE. La función de esta toxina prácticamente permaneció ignorada durante dos décadas más.

La toxina del carbunco es similar a la de muchas especies de *Clostridium* (Barth *et al.* 2004). Estas toxinas están formadas por dos componentes esenciales: uno denominado A, con propiedades enzimáticas y de fijación a membranas celulares, y otro denominado B, que no se encuentra ligado al A en solución y que es secretado por la misma bacteria, pero que tiene la particularidad de unirse al A para ejercer su acción deletérea cuando éste se ha activado o modificado.

Los tres componentes de la toxina del ántrax son secretados en forma independiente. Se encuentran libres en las fases líquidas de la sangre, en la linfa y también en los tejidos. La activación sólo se produce cuando la fracción PA se une a su receptor específico en la superficie celular o bien, bajo ciertas condiciones, cuando puede ser clivado en la fase líquida en la que se encuentra (Bradley *et al.* 2001; Scobie *et al.* 2003). Una vez activado el PA une en forma aleatoria sólo uno de los otros dos factores iniciando la acción tóxica específica.

El factor edematógeno (FE) o factor I pesa 89 Kd y fue descubierto por Watson *et al.* (1947) en el edema, en el plasma y en los tejidos. Smith *et al.* (1953) lo extrajeron de sangre de cobayo en la etapa

terminal de la enfermedad (Leppla 1982; Leppla et al. 1996; Smith Keppie 1954). Es un adenilatociclasa calmodulin-Ca²⁺ dependiente, que origina en el citoplasma de la célula blanco la formación de AMPc inhibiendo la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN), aumentando la permeabilidad capilar y dando lugar a la producción de edema (Pavan et al. 2011).

El FE disminuye la inmunidad por varios mecanismos, especialmente inhibiendo la fagocitosis. En 1911, Baily et al. encontraron que la toxina impide la destrucción de la bacteria por parte de los PMN. Este efecto se debe a la inhibición de la quimiotaxis de los PMN (Kashiba et al. 1959; Loving et al. 2009) con supresión del estallido respiratorio en estas células (O'Brien et al. 1985). También inhibe la síntesis de la IL-6 y el TNF (factor de necrosis tumoral) por los monocitos, determinando, consecuentemente, una disminución de la resistencia del hospedador.

El factor letal, FL o LF o factor III es el principal responsable de la virulencia. La molécula tiene una masa de 90 Kd. Es una proteasa dependiente del zinc, una metaloenzima, activable por mitógenos, con capacidad destructiva de los macrófagos (Moayeri y Leppla 2009). El FL tiene cuatro dominios funcionalmente activos situados correlativamente en la estructura primaria de la proteína, siendo el dominio I el que determina la unión al PA.

El antígeno protector, PA, o factor II, fue descubierto en 1904 por Bail. Tiene una masa de 83 Kd, con una estructura heptamérica. Es inmunogénico y los anticuerpos específicos tienen la capacidad de proteger a la rata y al cobayo previamente inmunizado con vacuna específica de la inoculación de esporos, pero si se les aplica a estos animales toxina preformada, no los protegen de la muerte.

Cuando Pasteur elaboró su primera vacuna y sometió los cultivos a temperaturas de 42,5 °C, eliminó unos 10 plásmidos (Wright et al. 1998) que son los que intervienen en la producción de PA y FL. Como consecuencia de ello, logró una disminución de la patogenicidad, creyendo erróneamente, en ese entonces, que se había producido una "atenuación" del bacilo. El tiempo de permanencia a esas temperaturas, denominadas "disgenésicas", permitía obtener cepas con una mayor o menor patogenicidad, siendo esta disminución concordante con la cantidad de formas vegetativas que perdían la posibilidad de producir toxinas.

Según los conceptos actuales, no se trataba de una verdadera atenuación de la cepa, sino que, en realidad, convivían formas virulentas con otras que habían perdido su capacidad tóxica. Según la relación entre ellas, se obtenían cepas más o menos "atenuadas" (Mikesell et al. 1983).

Otros factores de virulencia

Sideróforos: bacilibactina y petrobactina

Se considera que la biosíntesis de sideróforos es un requerimiento adicional para la virulencia. Los principales sideróforos son la bacilibactina, antes denominada antrabactina, y la petrobactina, antes antraquelina (Cendrowski et al. 2004). Algunas otras bacterias del género también producen bacilibactina, por lo que su sola presencia no es indicativa de patogenicidad. La petrobactina sería el único sideróforo necesario para la virulencia y el crecimiento de *B. anthracis* (Cendrowski et al. 2004). La petrobactina evade a la siderocalina del sistema inmune innato. En el caso de *B. anthracis*, la bacilibactina se une a la siderocalina o su complejo con hierro, pero no sucede lo mismo con la petrobactina, debido a que la diferencia del patrón de hidroxilación de ésta provoca un gran cambio conformacional que impide su inserción en el bolsillo de la siderocalina. Esta diferencia estructural en un sideróforo es inusual y permite a la petrobactina libre o unida al hierro escapar sigilosamente del sistema inmune innato del hospedador. Actualmente se está investigando sobre el bloqueo de esta petrobactina, con la intención de limitar o impedir la replicación en el momento de la infección (Cendrowski et al. 2004).

Capa S o S-layer (surface layer)

Es una capa que rodea la pared de las células vegetativas. Se especula que cumple una función importante en la interacción microorganismo/medio ambiente (Mesnage et al. 1997). Podría tratarse de una capa de protección frente a mecanismos de respuesta del hospedador o actuar como tamiz, permitiendo el ingreso a la bacteria solamente de ciertas moléculas de bajo peso molecular. También se cree que facilita la unión de la bacteria a moléculas presentes en la célula del hospedador, aumentando su adherencia a los macrófagos. Contiene dos proteínas sintetizadas secuencialmente SAP (*surface array protein*) y EA1 (*extractable antigen 1*) en forma independiente de la fase de crecimiento.

En los últimos años del siglo pasado se describió una adhesina BslA (*B. anthracis* S-layer protein A) que media la adherencia del bacilo en su forma vegetativa a la célula hospedadora y se propone como un factor de virulencia. Según experiencias realizadas en cobayos, contribuye a la patogenicidad, ya que exacerba la DL50 (Mesnage et al. 1997).

Lipoproteína MntA

Es una lipoproteína de membrana y se comporta como factor de virulencia. La delección de esta proteína provoca dificultades en el crecimiento, sensibilidad al estrés oxidativo y una disminución de la DL50 en

cobayos. Es fuertemente antigénica pero no induce protección (Gat *et al.* 2005).

Además de los factores ya mencionados, *Bacillus anthracis* posee varios genes capaces de codificar distintas proteínas con capacidad de contribuir a la virulencia o a la sobrevivencia en ratones y cobayos utilizados como modelos. Algunos de ellos son proteasas específicas, con capacidad de producir daño en el hospedador, contribuyendo directamente al proceso infeccioso. Otras enzimas que modifican la estructura de la pared celular pueden promover evasión de la respuesta inmune innata. Otros factores no son virulentos *per se*, pero pueden promover la germinación del esporo, facilitar la adquisición de nuevos nutrientes, aumentar la resistencia al estrés oxidativo o estallido respiratorio de las células endocíticas o coordinar una respuesta global de estrés durante la replicación en el hospedador (Chitlaru *et al.* 2007).

Sintetasa de óxido nítrico del *Bacillus anthracis*: baNOS

Los resultados surgidos en recientes experiencias realizadas con una cepa virulenta de *Bacillus anthracis*, pero delecionada en los genes responsables de la producción de toxina letal y edematógena, han demostrado que además de estos dos factores, la bacteria cuenta con otros mecanismos de patogenicidad (Heninger *et al.* 2006).

Heninger *et al.* 2006 demostraron que la TL y la TE no son necesarias para la patogenicidad de la cepa AMES luego de la inhalación de la misma (Chand *et al.* 2009; Levy *et al.* 2012; Lovchik *et al.* 2012).

La cepa AMES fue aislada de un animal muerto de carbunco en Sarita, Texas, en 1981 y utilizada por el bioterrorismo en el año 2001 para contaminar cartas y encomiendas dirigidas a senadores de EE.UU. De acuerdo con las experiencias realizadas, la toxicidad sería independiente de la TL y estaría determinada por la sintetasa de óxido nítrico que el bacilo posee, denominada baNOS (Crane *et al.* 2010; Sudhamsu y Crane 2009).

A semejanza de lo que sucede en las células de los mamíferos, el *B. anthracis* tiene la capacidad de generar óxido nítrico (ON) a partir de la arginina (Tizard 2009). En las células del hospedador el ON, y otras especies reactivas derivadas del *reactive oxygen species* (ROS), participan de numerosos eventos biológicos como glicólisis, crecimiento celular, señales de transducción, respuesta a estrés y mantenimiento de la homeostasis (Tizard 2009). El ON puede reaccionar con el ión superóxido (O_2^-) generando un compuesto agresivo y de alta toxicidad denominado peroxinitrito ($ONOO^-$) que juega un rol importante en los procesos inflamatorios. El peroxinitrito se forma durante

las sepsis, procesos inflamatorios, exotoxicidad e isquemias con reperfusión de los tejidos, condiciones todas en las que se incrementa la producción de ON y superóxido, participando en la expresión patológica de estos procesos (Pacher *et al.* 2007).

Los peroxinitritos participan en la nitratación de residuos de tirosina (3-nitrotirosina) dando como resultado la modulación de actividades catalíticas de señales celulares y de la reorganización del citoesqueleto (Chung *et al.* 2013; Habib y Ali 2011).

El baNOS juega un rol esencial en la virulencia del *Bacillus anthracis* en los primeros estadios de la enfermedad, involucrando interacciones de la bacteria con macrófagos y, posteriormente, afecta también a células no fagocíticas del hospedador. Uno de estos mecanismos confiere protección al *B. anthracis* contra moléculas reactivas producidas dentro del macrófago del hospedador, previniendo el daño que estas moléculas oxidativas pueden producir al DNA bacteriano (Crane *et al.* 2010; Shudamsu y Crane 2009).

Recientes informes dan cuenta que la S-nitrosilación de proteínas mitocondriales derivados del accionar del ON generado a partir de la ba-NOS, determina una reducción de la bioenergía del macrófago, ocasionando la muerte de esta célula. Se demostró, además, que las células bacterianas delecionadas en los genes con capacidad de producir este ba-NOS resultan muchísimo más atenuadas cuando se inoculan al ratón (Shatalin *et al.* 2008).

Patogénesis

Existen tres formas características de la enfermedad de acuerdo con la puerta de entrada. En la forma cutánea el ingreso de los esporos se produce a través de heridas o abrasiones en la piel o mucosas. En el hombre, es la más de común de todas. En la forma inhalatoria los esporos ingresan a través del aparato respiratorio y en la digestiva, lo hacen por ingestión de los mismos (Wu 2009). Luego de la introducción en el huésped susceptible, los esporos pueden pasar a la forma vegetativa y multiplicarse localmente o bien ser ingeridos por macrófagos residentes y transportados al linfonódulo local o regional donde se multiplican, para luego diseminarse a través de la sangre y linfa por todo el organismo.

El primer mecanismo de patogenicidad corresponde a la cápsula, que por sus propiedades antifagocíticas no permite la destrucción por endocitosis de la forma vegetativa y posibilita que el bacilo se multiplique fácilmente para luego liberar el segundo factor de patogenicidad, la toxina. *Bacillus anthracis* produce, una grave septicemia y, en conjunto con la posterior liberación de las toxinas edematógena y letal, provoca luego un shock séptico seguido de muerte.

Carbunco cutáneo

Los esporos son introducidos a través de la piel, generalmente en sitios donde la misma presenta soluciones de continuidad. En este sitio comienza la germinación del espora y produce necrosis localizada y edematización de los tejidos blandos. El paso de espora a forma germinativa demora alrededor de 1 a 3 horas y es necesario un daño tisular con disminución de la tensión de oxígeno para el inicio del proceso (Bischof 2007). Por otra parte, los macrófagos fagocitan esporos, los que son así trasladados a los linfonódulos locales y regionales. Durante el trayecto, el espora germina, pasa a forma vegetativa y en los linfonódulos provoca linfadenopatía y linfangitis. Como consecuencia de ello se produce septicemia y comienza la liberación de toxina. Sin embargo, un buen tratamiento antibiótico aplicado a tiempo puede detener el proceso de liberación de la toxina al eliminar las formas vegetativas.

Carbunco inhalatorio

El modelo clásico inhalatorio fue descrito por primera vez por Ross en la década de 1950 y, posteriormente, por Abramova (1993) y Hanna (1998). Los esporos ingresan al organismo por inhalación y dado su pequeño tamaño, menor a 5 µm, no puede ser eliminados por los mecanismos de defensa de la tráquea, los bronquios y los bronquiolos, alcanzando así los alvéolos. Allí ubicados, los esporos necesitan ser fagocitados por los macrófagos alveolares para iniciar la germinación, ya que la tensión de oxígeno del alvéolo impide la misma. También es factible que, a través de mecanismos de la inmunidad innata, como la proteína fijadora de manosa, puedan adosarse no sólo a macrófagos sino también a las células epiteliales del pulmón (Russel 2008). Dentro de las células los esporos encuentran las condiciones ideales de microanaerobiosis que permite que germinen y pasen a células vegetativas y luego abandonen las células para volcarse al sistema linfático. Pueden producir inflamación hemorrágica de los linfonódulos mediastinales (Abramova 1993) y provocar la formación de edema pulmonar por bloqueo linfático y derrames pleurales con presencia de *Bacillus anthracis* o fracciones del mismo (Guarner 2003). La neumonía focal, hemorrágica y necrotizante suele presentarse, pero de manera poco frecuente (Abramova 1993). La septicemia y la liberación de toxinas provocan la muerte del animal por shock séptico. También se han descrito meningitis hemorrágicas como consecuencia de la diseminación hematogena.

Entre las 6 y las 18 horas postinfección, los macrófagos que transportan los esporos se encuentran en el seno subcapsular del linfonódulo. Aquí es donde los esporos germinan y el bacilo prolifera, produciendo las cadenas que lo distinguen y difundiendo a través del sistema circulatorio. A las 24 horas se produce

una multiplicación masiva del bacilo, encontrándose formas vegetativas en sangre y más raramente en el pulmón.

Además del ingreso a través de los macrófagos pulmonares, existe la posibilidad de que los esporos puedan ingresar al organismo a través de la mucosa del tracto respiratorio superior, lo que se ha comprobado en roedores (Rayamajhi et al. 2012). No está claro si esto ocurre solo en roedores o también en otras especies.

La denominada BclA, *Bacillus colagen-like protein* de *B. anthracis*, simula el C1q del componente del complemento y tiene la propiedad de adherir los esporos al macrófago mediante los receptores de membrana específicos para fracciones del complemento (Bozue et al. 2007). BclA pesa 21 kD, tiene una secuencia rica en prolina, es similar al colágeno y es miembro de la familia del TNF, plegado en espiral. La selectividad sobre la célula parece ser importante para provocar la muerte del animal y para lograr una amplia multiplicación del bacilo, dando lugar a una mayor producción de esporos, lo que favorece una mayor diseminación de los mismos (Bozue et al. 2007). La proteína BclA es un antígeno inmunodominante del espora y, en consecuencia, es un futuro blanco para la elaboración de vacunas o para estrategias terapéuticas, lo que se conoce o denomina técnicamente como señuelo. Un hecho interesante es que los carbohidratos del BclA son también inmunogénicos.

El receptor específico de la fracción C3 del complemento, también denominado Mac-1 o CD11b/CD18, es considerado sitio de unión específico de los esporos de ántrax.

Carbunco digestivo

Se produce por la ingestión de esporos de *Bacillus anthracis* aunque hace poco más de una década se comprobó la posibilidad de infección por la ingesta de formas vegetativas presentes en animales. Aparentemente, la infección por formas vegetativas requiere la incorporación de una mayor cantidad de bacterias en comparación con la dosis mínima de esporos requeridos (Inglesby 2002). Se han determinado dos formas distintas de infección: una es la orofaríngea, a través de úlceras o soluciones de continuidad, con adenopatía regional y edema localizado. Otra es la denominada abdominal, en la que la puerta de entrada está localizada en la última porción del intestino delgado y el ciego. En estos casos se verifica la aparición de lesiones intestinales con edema de la pared, exudado en la cavidad abdominal y compromiso de los linfonódulos regionales. Finalmente se producen septicemia y muerte.

Rol de la toxina de *Bacillus anthracis* en la patogénesis

La toxina es una clásica A-B toxina. Ambas fracciones son secretadas por la célula bacteriana en forma separada y no se encuentran unidas (Collier y Young 2003; Duverger *et al.* 2006; Moayeri *et al.* 2004; Mock y Fouet 2001). El precursor PA pesa 83 kD, es secretado por el bacilo y debe ser activado proteolíticamente fuera de ella por tripsina, por una proteasa no identificada del suero o por proteasas ubicadas en la superficie celular (furinas o *furinas like*) que reconocen ciertas secuencias (164RKKR167) en el PA83kD.

La prolongada residencia del precursor PA en las superficies de las células optimiza la adhesión de FE y FL, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (Bradley *et al.* 2001; Collier y Young 2003; Duverger *et al.* 2006; Moayeri *et al.* 2004; Mock y Fouet 2001). Después de la proteólisis, el PA, ya sea en solución o adherido a la célula, pierde una fracción de unos 20 kD, dando lugar a la formación del PA63, modificando su estructura y generando una configuración compuesta por homoheptámeros hidrofóbicos. Esta nueva forma, cuando se encuentra en vesículas con un pH inferior a 7, adquiere la capacidad de formar canales en la membrana de la célula, los que son rápidamente obstruidos por bloqueadores específicos (Moayeri *et al.* 2011). El FL y el FE poseen, como terminal, un heptapéptido que se integra con el PA63, existiendo una competitividad entre ambos, que determina la unión en forma aleatoria de sólo uno de ellos. El PA activado puede asociarse con más de 3 moléculas de FL o FE. El proceso finaliza con la liberación en el citosol de las moléculas tóxicas neoformadas (Moayeri *et al.* 2011).

La estructura y los mecanismos de acción de la toxina han sido intensamente estudiados. Está compuesta, como ya hemos expresado, por tres factores denominados PA, FE, y FL (Loving *et al.* 2009). Estos tres factores son codificados por el plásmido, liberando, aparentemente, en primera instancia, el PA y luego los otros dos. El PA tiene la particularidad de unirse a tres tipos de receptores específicos localizados sobre la membrana celular del hospedador y denominados:

- TEM8, marcador tumoral del endotelio 8 o también denominado ANTXR1 (Bradley *et al.* 2001).

- CMG2, proteína 2 de la morfogénesis celular o también ANTXR2 (Liu *et al.* 2010; Scobie *et al.* 2003).

- Beta1 integrina, recientemente descrita, con propiedades de cumplir funciones de receptor (Ingram *et al.* 2013; Martchenko *et al.* 2010).

La unión del PA a estos receptores da origen a la activación del mismo, finalizando con la unión aleatoria a los otros factores y la traslocación al citosol para ejercer su acción específica.

Ambos marcadores, ANTXR1 y ANTXR2, son

expresados fuertemente en las células epiteliales de pulmón, piel e intestino, sitios de entrada del *B. anthracis* al organismo (Bonuccelli *et al.* 2005; Scobie *et al.* 2012; Xu *et al.* 2012).

Estos receptores cumplen otras funciones asociadas con la unión de proteínas componentes de la matriz extracelular y se especula, además, que intervienen en la regulación de la interacción con diversos componentes de la misma, incluyendo la adhesión, migración, distribución del colágeno y angiogénesis (Hotchkiss *et al.* 2012; Young *et al.* 2012).

La función de los receptores tiene un significado muy importante en el proceso patológico. Se ha observado que líneas celulares que han perdido sus receptores ANTXR1/2 resultan resistentes cuando se las enfrenta con toxina purificada, mientras que células que sobreexpresan dichos receptores incrementan la susceptibilidad a la toxina letal y presentan rápida apoptosis (Banks *et al.* 2005; Salles *et al.* 2006). Esto mismo ha sido observado *in vivo* durante la infección con el bacilo. Los ratones que han sido transfundidos con mutantes de macrófagos que han perdido la capacidad de expresión de los receptores ANTXR1/2 han sido capaces de resistir cierta dosis de esporos de *B. anthracis*, mientras que aquellos que fueron retransfundidos con macrófagos con capacidad de expresión de dichos receptores murieron como consecuencia de la acción de los esporos inoculados (Cote *et al.* 2008).

Si bien el rol que cumplen los receptores está claro en los procesos de la enfermedad, como asimismo las consecuencias inmunorregulatorias que produce la liberación de las toxinas, es muy poco lo que se conoce acerca de la expresión de los receptores por parte de los leucocitos (Fukao 2004).

Recientemente se ha demostrado que el PA se une primariamente a las células NKT (*natural killer T cells*) preferentemente antes de hacerlo a las células NK (*natural killer cells* o células naturalmente asesinas) o a los linfocitos T. También está claro que, si se enfrentan macrófagos *in vitro* a la TE, se produce en estas células un aumento del mRNA y, consecuentemente, una mayor expresión de los receptores ANTXR, mientras que en ratones a los que se les instila, por vía intranasal, esporos de *B. anthracis* cepa Sterne (cepa vacunal), se produce una regulación negativa del mRNA y, por lo tanto, menor expresión de receptores en los macrófagos pulmonares (Maldonado-Arocho 2006). Por otra parte, se han establecido otros mecanismos de activación del PA, mediante enzimas plasmáticas, sin necesidad de unirse, en primera instancia, al receptor de membrana.

Las toxinas del carbunco representan el típico ejemplo de toxinas que generan inmunosupresión. La TL inhibe la activación de numerosas células inmunes, inclusive polimorfonucleares neutrófilos, monocitos,

macrófagos, CD (células dendríticas), LT (linfocitos T) y LB (linfocitos B). Induce apoptosis de macrófagos por acción del TNF a través de la vía p38 y modifica la maduración de las CD alterando los mecanismos de muerte inducidos por caspasas, siendo estas células incapaces de iniciar el mecanismo de apoptosis, quizás por alteración de las funciones de ciertas familias de mitocondrias, como las denominadas, precisamente, mitocondrias inhibidoras de apoptosis. La TE también produce la disfunción del monocito y de la CD, pero sólo en cooperación con TL.

Los efectos de la toxina comienzan a manifestarse dentro del fagosoma que ingirió el bacilo para, posteriormente, a través de la TL y la TE, determinar el curso de la enfermedad. Se pueden describir tres fases principales:

- 1.- Una fase de invasión en la puerta de entrada, en la que la toxina ejerce sus efectos a corta distancia.
- 2.- Una fase de proliferación de la bacteria en los órganos linfáticos secundarios, con efectos deletéreos localizados principalmente sobre las células inmunes.
- 3.- Una fase de difusión terminal caracterizada por elevado nivel de toxina circulando en la sangre, con acción a larga distancia sobre numerosos órganos, que culmina con la muerte.

Durante las primeras fases la toxina actúa como antiinflamatoria, bloqueando el reclutamiento de células inflamatorias y, en consecuencia, inhibiendo ambos

mecanismos de la inmunidad (innata y adaptativa) alterando la capacidad del hospedador de mantener la homeostasis. Más tarde, cuando las toxinas son liberadas en grandes cantidades en la sangre, alteran primariamente la función de las células endoteliales, provocan su destrucción e inducen shock, coagulación intravascular diseminada, incoagulabilidad de la sangre por agotamiento de los factores responsables de la coagulación y, finalmente, disfunción cardíaca, con elevadas morbilidad y mortalidad (Firoved 2005; Gordon et al. 1988; Warfel et al. 2005).

Los antibióticos utilizados para el tratamiento pueden llegar a eliminar las bacterias, pero si éstas ya han liberado suficiente cantidad de toxinas, la muerte es inevitable.

Una vez ligado al receptor celular, una proteasa de la superficie celular que contiene furina C-terminal divide el PA en dos fragmentos (Molloy et al. 1992). La activación del PA es esencial en la génesis de la enfermedad.

Como las células furina-deficientes conservan alguna sensibilidad al PA, es evidente que hay otras proteasas celulares capaces de activar a las toxinas. El fragmento carboxi-terminal, el PA₆₃, se heptameriza, es decir, forma agregados de siete moléculas. Los heptámeros tienen gran afinidad para los dominios N-terminales homólogos del FL y del FE, a los que liga enseguida en forma aleatoria, constituyendo el receptor específico para el FE o el FL.

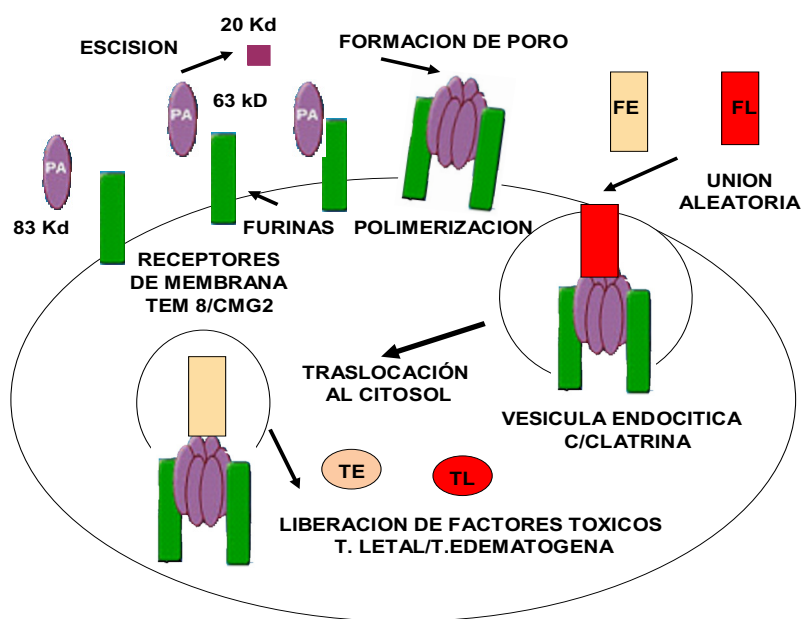


Figura 2. Esquema clásico de la formación de las toxinas e internalización al citosol. El PA se une a su receptor específico. Por acción enzimática de las furinas se libera una fracción de 20Kd. El PA, ahora de 63 Kd, se polimeriza y da lugar a la formación de un poro donde se unirán, en forma aleatoria, el FE o el FL. Endocitosis a través de vesículas recubiertas con clatrina. Traslocación al citosol y liberación de la toxina letal provocando muerte celular, temprana o retardada, y de la toxina edematogena, provocando edema e inhibición de fagocitosis.

Los complejos resultantes de (PA₆₃)₇ que se hallan unidos a sus receptores específicos en la membrana celular y que han fijado al FE o al FL mediante una unión de tipo hidrofóbica, introducen el mismo a la célula, por un proceso de endocitosis, formando primariamente un endosoma ácido que contiene las toxinas (Koehler and Collier 1991). El pH ácido del endosoma modifica la conformación del heptámero recientemente formado (PA₆₃)₇, y, como consecuencia de ello, se encuentra ahora insertado en la pared del endosoma provocando la formación de un poro en la membrana del mencionado endosoma. A través de dicho poro se produce la internalización al citosol de todo el complejo que acaba de formarse mediante la unión al PA de las fracciones FE o FL, la que se produce, como ya hemos mencionado, en forma aleatoria. La unión da origen a la formación de las toxinas letal y/o edematógena y a la liberación de las mismas dentro de la célula donde actúan sobre blancos o targets moleculares específicos para cada una de ellas (Blaustein et al. 1989; Benson et al. 1998; Elliot et al. 2000; Milne et al. 1995; Petosa et al. 1997).

Mecanismo de activación de las toxinas

La activación de las toxinas es esencial para el comienzo de la enfermedad. Se ha demostrado que células furino-deficientes muestran una cierta sensibilidad a la toxina, lo que permite suponer que el proceso de activación del PA se produce también mediante proteasas celulares diferentes a las furinas, aún cuando se halle circulando libremente en el plasma sanguíneo. Este proceso de activación también fue observado en otras toxinas, como la diftérica o la de *Pseudomonas*, todas pertenecientes, por su forma de activarse, al grupo de las denominadas A-B toxinas (Collier y Young 2003; Duverger et al. 2006; Moayeri et al. 2004; Mock y Fouet 2001).

También se ha especulado que, bajo ciertas circunstancias, el PA se une primariamente a los otros dos factores y una vez formado el complejo, una proteasa sérica escinde el PA, con posterior unión de este complejo activado al receptor del macrófago (Bradley et al. 2001; Scobie et al. 2003).

La TL es una metaloproteasa asociada al Zn con capacidad para inhibir las señales de transducción afectando al sistema de la activación de mitógenos por la quinasa de proteínas (MAPK, *mitogen activated protein kinase*). Actúa en el extremo N-terminal donde elimina la secuencia necesaria para activar a la MAP quinasa (MAPK) y anula el sistema de señalización que llega al núcleo a través de p38 (P-38 MAP quinasa), ERK (*extracellular-signal-regulated kinases*) y JNK (*c-jun N-terminal protein kinase*).

Quizás sea éste el mecanismo por el cual la TL tiene, además, la capacidad de impedir el crecimiento

de tumores y la angiogénesis, probablemente inhibiendo o interfiriendo las vías MAPKK-1 y MAPKK-2 (Duesbery et al. 1998).

La TL determina la lisis de los macrófagos por alterar la proteólisis que produce la familia de las proteinquinasas activadas MAPKK 1 y 2, claves en la transducción de señales (Guichard et al. 2012). Cortan a las mismas cerca de su extremo amino terminal impidiendo la fosforilación y la activación de las mismas. En la lisis no intervienen los mecanismos de apoptosis.

La adición de inhibidores de la fosfolipasa A2 (PLA2) no permite el desarrollo de la citotoxicidad ejercida por la TL, actuando en forma dosis-dependiente. Por lo tanto, la fosfolipasa A2 y la proteinquinasa son enzimas que intervienen en el mecanismo de activación de la toxina letal, determinando citotoxicidad sobre los macrófagos (Guichard et al. 2012).

Las células primariamente afectadas en la patogénesis del carbunco son los macrófagos (Friedlander et al. 1986, Hanna et al. 1993). Concentraciones pequeñas de toxina letal fragmentan el MAPKK-3, inhibiendo la liberación, pero no la producción, de ON y de TNF- α , mediadores de la inflamación (Pellizzari et al. 1999), de modo que inicialmente en la infección se reduce o retrasa la respuesta inmune. Posteriormente, a las pocas horas, cuando se alcanzan niveles altos de toxina letal, lisan el macrófago, liberando bruscamente niveles altos de ON y de TNF- α , lo que explicaría que poco antes de la muerte se presenta el shock séptico.

El complejo PA-FE es una adenilciclase Ca²⁺-calmodulina dependiente, que aumenta el cAMP el cual incrementa la permeabilidad vascular y causa edema (mecanismo similar al de la toxina colérica termolábil, con la diferencia que ésta causa diarrea). La asociación de la TE con la TL es sinérgica, aumentando la toxicidad.

Ambas toxinas son capaces de interferir, modificar o suprimir funciones de múltiples células como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos, afectando tanto la inmunidad innata como la adaptativa (Brossier et al. 2000; Duesbery et al. 1998, 2001; Firoved 2005; Friedlander 1986, 2001; Gordon et al. 1988; Koehler and Collier 1991; Maldonado-Arocho et al. 2006; Mollooy et al. 1992; Shin et al. 1999; Warfel et al. 2005).

Se ha comprobado que concentraciones inferiores a 1 μ g/ml de la asociación de PA+FE o PA+FL, inoculadas en animales de experimentación, suprimen la formación de iones superóxido en los neutrófilos estimulados por N-formilmietionil-leucil-fenilalanina, lipopolisacáridos o muramil-dipéptido (Wright et al 1988). Por otra parte, este fenómeno no se observa cuando se inyecta cada componente en forma independiente.

La acción sinérgica entre la TL y la TE determina un importante aumento del AMPc de los PMN, lo que

inhibe la fagocitosis medida por la inducción de la respuesta inmunoluminiscente y mediante microscopía de fase. También es muy manifiesta la acción del macrófago en el desarrollo de la enfermedad ya que, si experimentalmente se eliminan los mismos, el animal se vuelve insensible a la toxina letal. Se ha demostrado, asimismo, que en un mismo individuo coexisten poblaciones de células dendríticas y macrófagos resistentes a la toxina y otras sensibles a la misma. La insensibilidad al *B. anthracis* observada en ciertas razas dentro de algunas especies, es muy probable que esté relacionada con la resistencia de sus macrófagos a la acción de las toxinas del bacilo (Welkos y Friedlander 1988). Quizás estas poblaciones de CD y/o macrófagos insensibles a la toxina tengan relación con los mecanismos inmunitarios posvacunales.

Signos clínicos

El período de incubación es variable, dependiendo de la puerta de entrada y de la dosis infectante. Generalmente es de alrededor de 3 a 7 días, con una fluctuación entre 1 y 14 días (Dominguez Carmona y Dominguez de la Calle 2005).

La enfermedad en casi todas las especies se presenta en forma sobreeaguda. El animal se encuentra realizando su vida normal y en pocas horas aparece muerto. La forma aguda presenta cuadros febriles con temperaturas superiores a 40-41°C, taquicardia, taquipnea, hematuria y hemorragias por las aberturas naturales.

La forma cutánea puede presentar un período de incubación más prolongado con necrosis local y edema, el que puede generalizarse. En equinos ha sido descrita este tipo de infección como consecuencia del uso de arneses provenientes de animales muertos de carbunco y que al lesionar la piel permiten el ingreso de los esporos y la aparición de la enfermedad.

Los porcinos, caninos, gatos y carnívoros salvajes pueden presentar frecuentemente lesiones faríngeas con compromiso de amígdalas y linfonódulos retrofaríngeos y con exudado serofibrinoso. La forma entérica presenta úlceras edematosas y hemorrágicas con compromiso de los linfonódulos mesentéricos. La forma sobreeaguda, más rara en estas especies, se caracteriza por septicemia y muerte (FAO 2001).

Conclusiones

En tanto y en cuanto los productores y los organismos de control nacional y/o provinciales no fiscalicen de manera eficiente el cumplimiento de las leyes vigentes adecuadamente, esta zoonosis se mantendrá en forma endémica. La intervención de la autoridad competente en los focos activos, la eliminación eficiente de los cadáveres y la vacunación obligatoria,

son las únicas herramientas para su control. Para el control de la enfermedad es necesario cumplir con las siguientes premisas:

Vacunación obligatoria de las especies susceptibles

Prohibición de desollar animales muertos súbitamente

Eliminación de cadáveres en forma adecuada

Introducción de la figura del veterinario responsable sanitario

Capacitación del personal involucrado en tareas de riesgo sanitario de los establecimientos ganaderos.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

Abramova FA, Grimberg LM, Yampolskaya OV, Walker DH. Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlosk outbreak of 1979. Proc Natl Acad Sci. USA. 1993; 90:2291-4.

Bail O. Research into natural and artificial anthrax immunity. German Zentralb, Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankh. 1904; 47:270-2.

Bail O. Veränderung der Bakterien in Tierkörper. Ueber die Korrelation zwischen Kapselbildung, Sporenbildung und Infektiosität des Milzbrandbazillus. Zentralbl Bakt Paras Infekt Krankh. I. Orig. 1915; 75:159-73.

Banks DJ, Barnajian M, Maldonado-Arocho FJ, Sánchez AM, Bradley KA. Anthrax toxin receptor 2 mediates *Bacillus anthracis* killing of macrophages following spore challenge. Cell Microbiol. 2005;7:1173-85.

Barth H, Aktories K, Popoff KR, Stiles BG. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 2004; 68(3):373-402.

Benson EL, Huynh PD, Finkelstein A, Collier RJ. Identification of residues protective antigen channel. Biochemistry. 1998; 37:3941-8.

Bergman NH. 2011. *Bacillus anthracis* and Anthrax. Hoboken, New Jersey. Wiley Blackwell.

Bischof TS, Hahn BL, Sohnle PG. Characteristics of spore germination in a mouse model of cutaneous anthrax. J Infect Dis. 2007; 195(6):888-94.

BioTrax (anthrax vaccine adsorbed) emergent BioSolutions. www.fda.gov/downloads/Biologics Blood Vaccines/Approved/Products/ucm124496.pdf.2008:1-16.

Blaustein O, Koehler TM, Collier RJ, Finkelstein A. Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers. Proc Natl Acad Sci. USA. 1989; 86:2209-13.

Blood DC, Henderson JA, Radostits OM. 1983. Medicina

- Veterinaria. 5° Ed. México D. F. Editorial Sudamericana.
- Bonuccelli G, Sotgia, F, Frank, PG. ATR/TEM8 is highly expressed in epithelial cells lining *Bacillus anthracis* three sites of entry: implications for the pathogenesis of anthrax infection. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 288. C 1402–10.
- Bozue J, Moody KL, Cote CK. *Bacillus anthracis* spores of the BclA mutant exhibit increased adherence to epithelial cells, fibroblast, and endothelial cell but not to macrophages. *Infect Immun*. 2007; 75(9):4498-505.
- Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 2001; 4:225-9.
- Brossier F, Weber Levy M, Mock M, Sirard, JC. Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect. Immun*. 2000; 68:778-816.
- Candela E, Fouet A. *Bacillus anthracis* Cap D, belonging to the gamma-glutamyl-transpeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol Microbiol*. 2005; 57:716-7.
- Candela T, Mock M, Fouet A. Cap E, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *J Bacteriol*. 2005; 187:7765-72.
- Carter, KC. Koch's postulates in relation to the work of Jacob Henle and Edwin Klebs. *Med Hist*. 1985; 29:353-74.
- Cataldi A, Labruyere E, Mock M. Construction and characterization of a protective antigen-deficient *Bacillus anthracis* strain. *Mol. Microbiol*. 1990; 4, 1111-7.
- Cendrowski S, MacArthur W, Hanna P. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol Microbiol*. 2004; 51:407-17.
- Chand HS, Drysdale M, Lovchik J, Koehler TM, Lipscomb MF, Lyons CR. Discriminating virulence mechanisms among *Bacillus anthracis* strains by using a murine subcutaneous infection model. *Infect Immun*. 2009; 77:429-35.
- Chitlaru T, Gat O, Grosfeld H, Inbar I, Gozlan Y, Shafferman A. Identification of *in vivo*-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome. *Infect Immun*. 2007; 75:2841-52.
- Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM. Jr. Biological warfare. A historical perspective. *JAMA*. 1997; 278:412-7.
- Chung MC, Narayanan A, Popova TG, Kashanchi F, Bailey CL, Popov SG. *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide induces protein S-nitrosylation contributing to macrophage death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 430:125-30.
- Collier RJ, Young JA. Anthrax toxin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003; 19:45-70.
- Cote CK, Di Mezzo TL, Banks DJ, France B, Bradley KA, Welkos, SL. Early interactions between fully virulent *Bacillus anthracis* and macrophages that influence the balance between spore clearance and development of a lethal infection. *Microbes Infect*. 2008; 10:613–9.
- Crane BR, Sudhamsu J, Patel BA. Bacterial nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Biochem*. 2010; 79:445-70.
- Davis B, Dulbecco R, Herman N, Eisen H, Ginsberg H, 1996. *Tratado de Microbiología*. 4a Ed. Barcelona. Salvat Editores.
- Domínguez Carmona M, Domínguez de la Calle M. El *Bacillus anthracis* como agresivo. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. <http://www.ranf.com>
- Duesbery NS. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science*. 1998; 280:734-7.
- Duesbery N. Suppression of a mediated transformation and inhibition of tumor growth and angiogenesis by anthrax lethal factor, a proteolytic inhibitor of mul. *Acad Sci. USA*. 2001; 98:4089-94.
- Duverger A, Jackson RJ, van Ginkel FW, Fisher R., Tafaro A, Leppla SH, Fujihashi K, Kiyono H, McGhee JR, Boyaka PN. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. *J of Immunol*. 2006; 176:1776-83.
- Elliot JL, Mogridge J, Collier RJ. A quantitative study of the interaction of *Bacillus anthracis* edema factor and lethal factor with activated protective antigen. *Biochemistry*. 2000; 39:6706-13.
- FAO. Harina de hueso <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0112sp.htm>. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. Enfoques/2001. El carbunco en los animales. Perdurabilidad en el suelo.
- Firoved AM. *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mouse. *Am J Pathol*. 2005; 167:1309-20.
- Friedlander AM. Macrophages are sensitive and resistant to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *J Biol Chem*. 1986; 261:7123-6.
- Friedlander AM. Anthrax: clinical features, pathogenesis, and potential biological warfare threat. *Curr Clin Top Infect Dis*. 2001; 20:335-49.
- Friedlander AM. Tackling anthrax. *Nature*. 2001b; 414: 160.
- Fouet A, Mesnage SV. *Bacillus anthracis* cell envelope components. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002; 271:87-113.
- Fouet A. The surface of *Bacillus anthracis*. *Mol. Aspects Med*. 2009; 30:374-85.
- Fukao T. Immune system paralysis by anthrax lethal toxin: the roles of innate and adaptive immunity. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4:166-70.
- Gat O, Mendelson I, Chitlaru T, Ariel N, Altboun Z, Levy H, Weiss S, Grosfeld H, Cohen S, Shafferman A. The solute-binding component of a putative Mn(II) ABC transporter (MntA) is a novel *Bacillus anthracis* virulence determinant. *Mol Microbiol*. 2005; 58:533-41.
- Geison GL. *The private science of Louis Pasteur*. 1995. Princeton, NJ. Princeton University Press.
- Gladstone GP. Immunity to anthrax: protective antigen present in cell-free cultures filtrates. *Br J Exp Pathol*. 1946; 27:394-418.
- Glomski IJ. *Bacillus anthracis* dissemination through host. En: Bergman NH. 2011. *Bacillus anthracis* and Anthrax. Hoboken, New Jersey. Wiley Blackwell, cap.12.
- Gordon VM, Leppla SH, Hewlitt EL. Inhibitor of receptor mediated endocytosis blocks the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not that of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun*. 1988; 56:1066-9.
- Gruber M, Futaki K. Ueber die Resistenz gegen Milzbrand und ueber die Herkunft der milzbrandfeindlichen Stoffe. *Med Wschr*. 1907; 54:249.

- Guarner J, Jernigan JA, Shieh WJ. Pathology and pathogenesis of bioterrorism-related inhalational anthrax. *Am J Pathol.* 2003; 163(2):701-9.
- Huichard A, Nizet V, Bier E. New insights into the biological effects of anthrax toxins: linking cellular to organismal responses. *Microbes Infect.* 2012; 14(2):97-118.
- Habib S, Ali, A. Biochemistry of nitric oxide. *Ind J Clin Biochem.* 2011; 26:3-17.
- Hanna P. Anthrax pathogenesis and host response. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998; 225:13-35.
- Harvill ET, Lee G, Grippe VK, Merkel TJ. Complements depletion renders C57BL/6 mice sensitive to the *Bacillus anthracis* Sterne strain. *Infect Immun.* 2005; 73:4420-22.
- Heninger S, Drysdale M, Lovchik J, Hutt J, Lipscomb MF, Koehler TM. Toxin-deficient mutants of *Bacillus anthracis* are lethal in a murine model for pulmonary anthrax. *Infect Immun.* 2006; 74:6067-74.
- Holmes C. Spores, plagues and history: the history of anthrax. Texas Department of States Health Services. 2003. TX: Durban House.
- Hotchkiss KA, Basile CM, Spring SC, Bonuccelli G, Lisanti MP, Terman B. I. TEM8 expression stimulates endothelial cell adhesion and migration by regulating cell-matrix interactions on collagen. *Exp Cell Res.* 2005; 305:133-44.
- Inglesby TV, O'Toole T, Henderson DA. For the Working Group on Civilian Biodefense. Anthrax as a biological weapon: updated recommendations for management. *JAMA.* 2002; 287(17):2236-52.
- Ingram RJ, Harris A, Ascough S, Metan G, Doganay M, Ballie L, Williamson ED, Dyson H, Robinson JH, Sriskandan S, Altmann DM. Exposure to anthrax toxin alters human leucocyte expression of anthrax toxin receptor 1. *Clin Exp Immunol.* 2013; 173:84-91.
- Jernigan DB, Raghunathan PL, Bell BP, Brechner R, Bresnitz EA, Butler JC, Cetron M, Cohen M, Doyle T, Fisher M. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:1019-28.
- Kashiba S, Morishima T, Kato T, Shima M, Amano T. Leucotoxic substance produced by *Bacillus anthracis*. *Biken.* 1959; J.2:97-104.
- Keim P, Smith KL, Keys C, Takahashi H, Kurata, T, Kaufmann A. Molecular investigation of the Aum Shinrikyo anthrax release in Kameido, Japan. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:4566-7.
- Keppie J, Harris-Smith PW, Smith H. The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. IX. Its aggressins and their mode of action. *Br J Exp Pathol.* 1963; 44:446-53.
- Koch R. Die aetiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. Beiträge zur biologie der planzen. 1876; 2:277-310.
- Koehler TM, Collier RJ. Anthrax toxin protective antigen: low pH induced hydrophobicity and channel formation in liposomes.
- Krauis PJ and Molscrip. A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Crystallogr.* 1991; 24:946-50.
- Leppla SH, Firedlander AF, Singh Y. A model of anthrax toxic action at the cellular level. *Salisbury Medical Bulletin.* 1990; 68 (suppl):41.
- Leppla SH. The anthrax toxin complex. En: Alouf, JE, Freer JH, ed. Sourcebook of bacterial protein toxins. 1991. London. Academic Press.
- Leppla SH, Klimpel KR, Singh Y. Interaction of anthrax toxin with mammalian cells. *Salisbury Medical Bulletin* 1996; 87 (suppl):91.
- Leppla SH. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cAMP concentrations in eukariotic cells. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1982; 79:3162-6.
- Levy H, Weiss S, Altboum Z, Schlomovitz J, Glinert I, Sittner A. Differential contribution of *Bacillus anthracis* toxins to pathogenicity in two animal models. *Infect Immun.* 2012; 80:2623-31.
- Levy H, Weiss S, Altboum Z, Schlomovitz J, Rothschild N, Glinert I. The effect of deletion of the edema factor on *Bacillus anthracis* pathogenicity in guinea pigs and rabbits. *Microb Pathog.* 2012; 52:55-60.
- Loving CL, Khurana T, Osorio M, Lee GM, Kelly VK, Stibitz S, Merke TJ. Role of anthrax toxins in dissemination, disease progression, and induction of protective adaptive immunity in the mouse aerosol challenge model. *Infect Immun.* 2009; 77(1):255. DOI: 10.1128/IAI.00633-08.
- Liu S. Anthrax toxin targeting of myeloid cells through the CMG2 receptor is essential for establishment of *Bacillus anthracis* infections in mice. *Cell Host Microbe.* 2010; 8:455-62.
- Lovchik JA, Drysdale M, Koehler TM, Hutt JA, Lyons CR. Expression of either lethal toxin or edema toxin by *Bacillus anthracis* is sufficient for virulence in a rabbit model of inhalational anthrax. *Infect Immun.* 2012; 80:2414-25.
- Makino S, Uchida J, Terakado N. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 1989; 171:722-30.
- Makino S, Watarai M, Cheun HI. Effect of the lower molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. 2002; 186:227-33.
- Maldonado-Arocho FJ, Fulcher JA, Lee B, Bradley KA. Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte-derived cells. *Mol Microbiol.* 2006; 61: 324-37.
- Martchenko M, Jeong SY, Cohen SN. Heterodimeric integrin complexes containing beta 1-integrin promote internalization and lethality of anthrax toxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:15583.
- Merchant IA, Packer RA. 1961. *Bacteriología veterinaria*. 2ª ed. Zaragoza. Acribia.
- Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, Langmuir A, Popova I, Shelokov A, Yampolskaya O. The Sverdlosk anthrax outbreak of 1979. *Science* 1994; 266:1202-8.
- Mesnager S, Tosi-Couture E, Mock M, Gounon P, Fouet A. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that is the major cell-associated antigen. *Mol Microbiol.* 1997; 23:1147-55.
- Mikesell P, Ivins BE, Ristroph JD, Dreier TM. Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infect Immun.* 1983; 39:371-6.
- Milne JC, Blanke SR, Hanna PC, Collier RJ. Protective antigen-binding domain of anthrax lethal factor mediates translocation of a heterologous protein fused to its amino-

- or-carboxy-terminus. *Mol Microbiol.* 1995;15:661-6.
- Moayeri M, Leppla S. Anthrax toxin. En: Bergman NH (Ed) 2011. *Bacillus anthracis* and Anthrax. Hoboken, New Jersey. Wiley Blackwell, cap.8
- Moayeri M, Leppla S. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Current opinion in Microbiology.* 2004; 7:19-24.
- Moayeri M, Leppla SH. Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol Aspects Med.* 2009; 30:439-55.
- Moayeri M, Sastalla I, Leppla SH. Anthrax and the inflammasome. *Microbes Inf.* 2011; 14:392-400.
- Mock M, Fouet A. Anthrax. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55:644-7.
- Molloy SS. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem.* 1992; 267:16396-402.
- O'Brien J, Friedlander A, Dreier T, Ezzell J, Leppla S. Effects of anthrax toxin components on human neutrophils. *Infect Immun.* 1985; 47:306-10.
- Pasteur L, Roux E, Charbeland C. Sur l'étiologie du charbon, *C.R.Acad Sci. (Paris)*, 1880; 91:86-94.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):315-24.
- Pavan ME, Pettinari MJ, Cairó F, Pavan E, Cataldi AA. *Bacillus anthracis*: una mirada molecular a un patógeno célebre. *Revista Argentina de Microbiología* 2011; 43:294-310.

Hemipenile prolapse and hemipenectomy in a leopard gecko (*Eublepharis macularius*)

Prolapso de hemipene y hemipenectomía en un gecko leopardo (*Eublepharis macularius*)

Lescano J^{1*}, Quevedo M¹

¹Sección Fauna Silvestre,
Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

*Correo electrónico del autor: xtianlescano@gmail.com

Abstract: Copulatory organ prolapse is a condition more frequently observed in chelonians and ophidians than in lizards. Most common causes are infections, forced separation during mating and inflammation associated to the use of probes for sex determination. Moreover, many other predisposing factors are described (hypocalcaemia, urolithiasis, etc.), but aetiological diagnosis is rarely achieved. A four years old leopard gecko (*Eublepharis macularius*) was received presenting unilateral hemipenile prolapse. Medical therapy was performed using 50 % dextrose baths and prednisone (2 mg/kg) during 24 hours, but it was unsuccessful. Due to the fact that the prolapsed hemipenis showed signs of necrosis, surgical resection was performed. The patient was anaesthetized using the combination ketamine (5 mg/kg), dexmedetomidine (0.1 mg/kg), and midazolam (1 mg/kg); also, lidocaine (4 mg/kg) was administered for local block, whereas atipamezole (0.5 mg/kg) was used for antagonizing dexmedetomidine. The used anaesthetic protocol allowed an adequate surgical management. Hemipenectomy solved the problem without any observed complication.

Key words: Gekkonidae, lizard, paraphimosis, surgery

Resumen: El prolapso del órgano copulatorio es una afección más frecuentemente observada en quelonios y ofidios que en saurios. Las causas más comunes son infecciones, separación forzada durante la cópula e inflamación asociada al uso de sondas para determinación del sexo. Además, se han descrito muchos otros factores asociados (hipocalcemia, urolitiasis), pero rara vez se logra llegar al diagnóstico etiológico. Un gecko leopardo (*Eublepharis macularius*) de cuatro años de edad fue recibido presentando prolapso unilateral de hemipene. Se realizó tratamiento médico usando baños en dextrosa 50 % y prednisona (2 mg/kg) durante 24 horas, pero éste no fue exitoso. Debido a que el hemipene prolapsado presentó signos de necrosis, se realizó la resección quirúrgica. El paciente fue anestesiado empleando la combinación ketamina (5 mg/kg), dexmedetomidina (0,1 mg/kg) y midazolam (1 mg/kg). Además, se administró lidocaína (4 mg/kg) como bloqueo local y se usó atipamezol para antagonizar la dexmedetomidina. El protocolo anestésico empleado permitió el manejo quirúrgico adecuado. La hemipenectomía resolvió el problema sin observarse complicación alguna.

Palabras clave: Gekkonidae, saurio, parafimosis, cirugía

Introduction

Exotic reptiles are becoming into less uncommon pets (Rataj *et al.* 2011). Among them, the leopard gecko (*Eublepharis macularius*) is a species that, after decades of commercial spread, is currently well established in captivity. It is relatively popular and it can be found in pet stores, zoos, and breeding facilities (Bonke *et al.* 2011; Deming *et al.* 2008).

Lizards possess a pair of extraclacal copulatory organs named hemipenes, which are disposed inside a sac located at the base of the tail and caudally directed from the cloaca (Funk 2002; Girling 2003; Silva *et al.* 2013). These organs do not perform urinary function (as reptiles lack of penile urethra) and only one hemipenis is used during mating at a time (Barten 2005). During copulation, hemipenis is filled with blood and a groove is formed on its dorsal surface; through such groove spermatic fluid and spermatozoa drain from the cloaca (Girling 2003).

Hemipenile prolapse occurs when the copulatory organ remains everted during a prolonged period. In those cases, hemipenis will tend to desiccation and necrosis if it is not rapidly relocated (Podhade and Harné 2014). If hemipenis presents normal coloration and necrosis is not evident, relocation is suggested. For that purpose, the organ must be rinsed using cold chlorhexidine 0.5% or sodium chloride solution (Podhade and Harné 2014; Silva *et al.* 2013;) aiming to decrease contamination. Furthermore, as hemipenis is usually oedematous due to exposure and friction to substrate, hypertonic solution (e.g. dextrose 50 %) or glicerine should be used to facilitate its relocation (Bennett and Mader 2005; Silva *et al.* 2013). If hemipenis cannot be relocated, incisions must be performed at each side of the sac in order to make its opening

wider, then the hemipenis is introduced and sutures are placed to close incisions avoiding it everts again (Bennett and Mader 2005; Nisbet *et al.* 2011). On the contrary, if hemipenis is severely damaged or shows signs of necrosis, amputation is the treatment of choice (Bennett and Mader 2005; Silva *et al.* 2013). It should be noted that such procedure will not affect urination or reproduction (as one functional hemipenis will remain within the animal) (Bennett and Mader 2005; Silva *et al.* 2013). The aim of this article is to describe the successful surgical management of hemipenile prolapse in a leopard gecko (*Eublepharis macularius*).

Case report

A four years old male leopard gecko (*Eublepharis macularius*) was presented to the Wild and Exotic Animals Clinic, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. The animal was kept in a vivarium with sand as substrate, and under humidity and temperature conditions according to recommended range (Kramer 2002; McBride and Hernández-Divers 2004). Three days before presentation, the animal had been placed in a terrarium with a female leopard gecko in order to breed. One day before presentation, the owner noticed the animal had a swelling near the cloaca. At physical examination the animal weighed 70 g, and showed good body condition (3/5). Moreover, left hemipenis was found everted and oedematous. Medical therapy using prednisone (2 mg/kg PO q/24 h) (prednisona, Laboratorios Portugal, Perú) (Carpenter *et al.* 2014) and rinsing using dextrose 50 % were performed. Next day, swelling had not decreased and hemipenis started showing signs of necrosis (Figure 1). Hence, surgical removal of affected hemipenis was suggested.



Figure 1. Leopard gecko (*Eublepharis macularius*) presenting eversion of left hemipenis showing evidence of necrosis.

The animal was anaesthetized using the combination ketamine (5 mg/kg) (Imalgene®, Merial, France), dexmedetomidine (0.1 mg/kg) (Dexdomitor®, Orion Pharma, Finland), and midazolam (1 mg/kg) (Dormonid®, Roche, Switzerland), administered intracoelomically (Schumacher and Mans 2014). Recumbency (from drugs administration to sternal recumbency) (Figure 2a), sedation (from drugs administration to absence of resistance to dorsal recumbency), and surgery start (from drugs administration to the absence of response to stimuli) times respectively were 1, 5, and 10 minutes. Surgical antisepsis was performed using chlorhexidine 5% (Bennett and Mader 2005). Lidocaine (4 mg/kg) (Otarvas Q, Perú) was administered at the base of affected hemipenis for local anaesthesia (Silva *et al.* 2013; Carpenter *et al.* 2014) (Figure 2b). Transfixion ligature was placed at the base of hemipenis using polyglycolic acid 5/0 (Vicryl PGA, Ethicon, USA) aiming to avoid haemorrhage (Figure 2c) (Funk 2002). Then, hemipenis was resected and its containing sac was closed (Figure 2d). Surgery was performed during about 20 minutes; at the end the animal received 0.5 mg/kg of atipamezole (Antisedan®, Orion, Finland) and fluid therapy using Jarchow solution (20 ml/kg ICe) (Norton 2005). Five minutes after atipamezole administration, the animal recovered sternal position and remained resting during

about two hours in a warmed room (at 30 °C). Post-surgical therapy was composed by tramadol (10 mg/kg PO q/24 h) (Tramadol®, John Martin, Argentina) and enrofloxacin (5 mg/kg PO q/12 h) (Floxaviar®, Genfar, Colombia) (Carpenter *et al.* 2014) during one week. Moreover, wound was cleaned using 0.5% chlorhexidine twice a day during two weeks. No complication was observed in wound healing and animal was found in good condition during a routine check three months after surgery.

Discussion

To the authors' knowledge, this article reports a case of hemipenis prolapse and its surgical management in a leopard gecko for the first time in Perú, and even in South America. Moreover, the use of the anaesthetic combination ketamine-dexmedetomidine-midazolam is reported for the first time in a leopard gecko; its use has only been recorded in spiny-tailed lizard (*Uromastyx sp.*), bearded dragon (*Pogona vitticeps*), and blue iguana (*Cyclura lewis*) (Schumacher and Mans 2014). Descriptions of anaesthetic combinations used in Leopard geckos are very scarce and poorly detailed; hence, comparisons among protocols are difficult. The induction and recovery times described in this article (10 and 120 minutes,

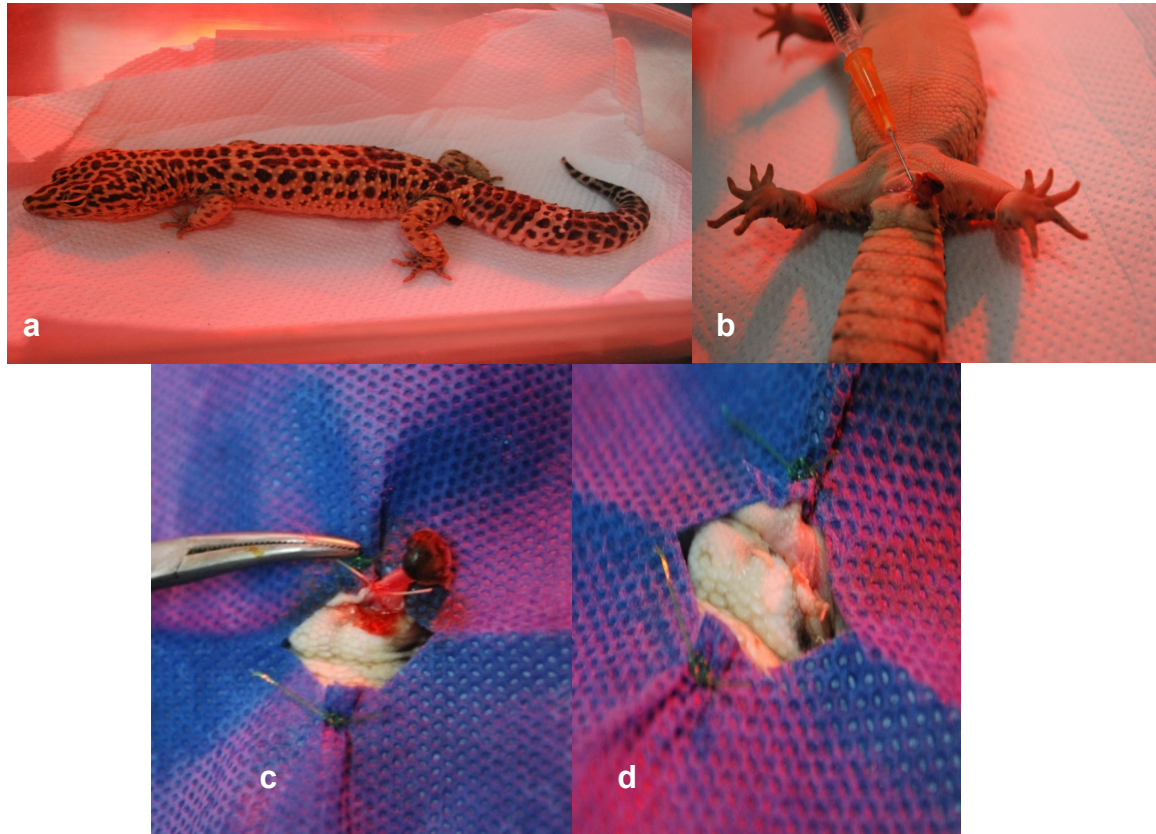


Figure 2. Hemipenectomy in a leopard gecko (*Eublepharis macularius*). (a) Anaesthetic induction (note the animal is in sternal recumbency). (b) Local anaesthesia in affected hemipenis. (c) Transfixing suture is placed at the base of hemipenis (d) Hemipenis resection and closure of the corresponding sac.

respectively) were longer than those described by Hall and Lewbart (2006) using isoflurane (5 and 30 minutes, respectively). This is an expected finding, as inhalant drugs are known to produce recovery times shorter than injectable ones (Bouts and Gasthuys 2002). However, it should be noted that in these studies geckos underwent different kind of procedures (hemipenis resection and percutaneous oocentesis, respectively) involving different anaesthetic depth and time; consequently, direct comparison must be carefully examined and might be questionable.

Copulatory organ prolapse is more commonly observed in chelonians than in snakes and lizards (Ramos *et al.* 2009; Silva *et al.* 2013). During the literature review performed for preparing this article, reports of hemipenis or penis prolapse were found only for snakes (*Bothrops sinularis*, *Daboia russelii*) and chelonians (*Geochelone carbonaria*, *Trachemys scripta elegans*) (Nisbet *et al.* 2011; Podhade and Harne 2014; Ramos *et al.* 2009; Silva *et al.* 2013). The most common causes for this condition are infection, forced separation during mating, and inflammation due to trauma when using probes for sex determination (Bennett and Mader 2005). However, other associated causes are trauma of hemipenes retractor muscle of cloacal sphincter, intestinal parasites, urolithiasis, hypocalcemia, diarrhoea, constipation, foreign body obstruction, prolonged sexual activity, neurological dysfunction, and general weakness (Nisbet *et al.* 2011; Podhade and Harne 2014; Silva *et al.* 2013). In most cases, aetiologic diagnosis is not achieved (Nisbet *et al.* 2011). In the presented case, the most likely cause would be prolonged sexual activity as the patient remained during about 72 hours in a same enclosure with a sexually receptive female gecko. Despite scientific literature about reproductive management of reptiles is scarce and there is no standardized protocols, LaDage *et al.* (2008) used 10 minutes intervals during four hours in a research about mating and fertility in *E. macularius*. This hypothetic cause is supported by anamnesis and physical examination of patient, by which it was not possible to find any other predisposing factor. However, other factors (e.g. parasites, hypocalcemia) could not be specifically ruled out as they were not assessed.

Medical treatment was unsuccessful probably because prolapsed hemipenis was severely oedematous. This might have occurred because the hemipenis was exposed to substrate (sand) during 24 to 72 hours. On the other hand, surgical approach was successful and the animal did not present any surgical or post-surgical complication. Funk (2002) described amputation as one of the most frequently surgical procedures performed in hemipenis. The same author mentions prolapse is the most common reason for hemipenile amputation, whereas trauma and infection

are less frequent. The anaesthetic combination used in this case provided adequate duration and quality of induction, anaesthesia, and recovery periods, allowing the performance of hemipenis resection.

Conclusions

The successful surgical management of hemipenile prolapse in *Eublepharis macularius* is presented in detail. Also, the safe use of the anaesthetic combination ketamine-dexmedetomidine-midazolam in *E. macularius* is described for the first time; however, further research is required in order to assess and standardize such protocol in this species.

Acknowledgements

The authors acknowledge Gerson Silva for his help during the performance of surgery described in this article.

Conflict of interests

The authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria; educational grants; participation in speakers' bureaus; membership, employment, consultancies, stock ownership, or other equity interest; and expert testimony or patent-licensing arrangements), or non-financial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

References

- Bennett RA, Mader DR. Cloacal prolapse. In: Mader DR, 2005. Reptile medicine and surgery. 2nd Ed. St. Louis, Missouri, USA; Saunders Elsevier, pp. 751-5.
- Bonke R, Böhme W, Opiela K, Rödder D. A remarkable case of cannibalism in juvenile Leopard Geckos, *Eublepharis macularius* (Blyth, 1854) (Squamata: Eublepharidae). Herpetol Notes. 2011;4:211-2.
- Bouts T, Gasthuys F. Anesthesia in reptiles: inhalation anesthesia. Vlaams Diergen Tijds 2002; 71:195-201.
- Carpenter JW, Klaphake E, Gibbons PM. Reptile formulary and laboratory normals. In: Mader DR, Divers SJ, 2014. Current therapy in reptile medicine and surgery. St. Louis, Missouri, USA; Elsevier Saunders, pp. 382-410.
- Deming C, Greiner E, Uhl EW. Prevalence of *Cryptosporidium* infection and characteristics of oocyst shedding in a breeding colony of leopard geckos (*Eublepharis macularius*). J Zoo Wild Med. 2008;39(4):600-7.
- Funk RS. Lizard reproductive medicine and surgery. Vet Clin Exot Anim. 2002;5(3):579-613.
- Girling S. Basic reptile and amphibian anatomy and physiology. In: Girling S, 2003. Veterinary nursing of exotic pets. Oxford, UK; Blackwell Publishing, pp. 105-26.

Hall AJ, Lewbart GA. Treatment of dystocia in a leopard gecko (*Eublepharis macularius*) by percutaneous ovocentesis. *Vet Rec.* 2006;158:737-9.

LaDage LD, Gutzke WHN, Simmons RA, Ferkin MH. Multiple mating increases fecundity, fertility and relative clutch mass in the female leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *Ethol.* 2008;114:512-20.

Mc Bride M, Hernández-Divers SJ. Nursing care of lizards. *Vet Clin Exot Anim.* 2004;7(2):375-96.

Nisbet HO, Yardimci C, Özak A, Sirin YS. Penile prolapse in a red eared slider (*Trachemys scripta elegans*). *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2011;17(1):151-3.

Norton TM. Chelonian emergency and critical care. *Semin Avian Exot Pet.* 2005;14(2):106-30.

Podhade DN, Harne R. Surgical intervention in prolapsed rescued Russell Viper (*Daboia russelii*). *JWR.* 2014;2(2):9-10.

Ramos RM, Vale DF, Hanawo MEOC, Ferreira FS, Luz MJ, Oliveira ALA. Penectomia em caso de prolapso peniano em Jabuti-piranga (*Geochelone carbonaria*) – Relato de caso. *JBCA.* 2009;2(3):166-74.

Schumacher J, Mans C. Anesthesia. In: Mader DR, Divers SJ, 2014. *Current therapy in reptile medicine and surgery.* St. Luis, Missouri, USA; Elsevier Saunders, pp. 134-53.

Rataj AV, Lindtner-Knific R, Vlahović K, Mavri U, Dovč A. Parasites in pet reptiles. *Acta Vet Scand.* 2011;53:33.

Silva KB, Muñiz-da-Silva DF, Silva KMP, Garcia VC, Santos SMA. Hemipenicectomia em Jararaca-Ilhoa (*Bothrops insularis*) – Relato de caso. *Vet e Zootec.* 2013;20(3):9-14.

**Primera Jornada de
Tecnologías de la Información
y la Comunicación (TIC) en la
Facultad**

6 de marzo de 2016

**Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata**

Resúmenes de trabajos presentados

Experiencia en el uso de la Plataforma Moodle en dos cursos del primer año de la carrera de Medicina Veterinaria: Biología Celular y del Desarrollo e Histología

Alvarado Pinedo MF, González, NV, Flamini AM
Cátedra de Histología y Embriología Veterinaria.
FCV, UNLP.

fiorella.alvaradopinedo@gmail.com

El uso y acceso a Internet es cada día más popular en nuestros tiempos. Sin embargo, la aplicación de este tipo de soporte tecnológico en la educación universitaria no ha sido tan promovido como se esperaría. La Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP no escapa a esta realidad, en donde la modalidad de sus cursos de grado se basa en actividades presenciales obligatorias (APO). Sin embargo, desde el año 2009 esta unidad académica implementó el uso de aulas virtuales, tanto en el grado como en el posgrado, ampliando paulatinamente el criterio didáctico-institucional de las cátedras, para reconvertir su diseño de instrucción tradicional al paradigma electrónico basado en la Internet. En el primer año de esta carrera los cursos llegan a superar ampliamente matrículas de 700 estudiantes, resultando inadecuada la relación docente-estudiante y la comunicación de cualquier información imprevista. En este escenario, se implementaron varias de las herramientas que proponía la Plataforma Moodle-2 durante el año 2015 en los cursos de Biología Celular y del Desarrollo (BCyD) y de Histología, lográndose una activa participación de los estudiantes. Entre los recursos compartidos se puede destacar que las guías de estudio/actividades tuvieron 4.839 vistas en BCyD y 4.374 en Histología; se compartieron tres videos de nuestra autoría para complementar la APO de sistema linfático que presentaron 32.126 vistas. Entre las actividades realizadas, el foro de novedades tuvo 4.396 vistas en BCyD y 30.261 en Histología. El glosario con términos histológicos fue visitado 3.194 veces. Además, en BCyD se implementó la resolución de cuestionarios de autoevaluación que estaban disponibles para todos los estudiantes, como método de recuperación de las APO. De la misma participaron 443 estudiantes y se registraron 20.828 vistas. Basados en nuestra experiencia, consideramos que el uso de esta plataforma educativa complementa las APO, lo que motiva a los estudiantes a mejorar la construcción autónoma de los conocimientos de estos cursos.

Uso de las redes sociales y de la plataforma Moodle para la implementación de un curso virtual para favorecer la retención de los alumnos de 1º año

Coll Cárdenas F, Olivera D, Piergiacomí V, Sánchez L, Alvarez MC, Laporte G, Marmunti M, Gavazza M, Palomo S, Savignone C, Fernández Blanco M, González Etchande B

Departamento de Ciencias Básicas. FCV, UNLP.

fcollcardenas@fcv.unlp.edu.ar

Con el fin de adaptarse a las necesidades del estudiante actual, las prácticas universitarias han debido flexibilizarse, intentando formar puentes que integren las tecnologías de la información y de la comunicación (TIC), las redes sociales y las enseñanzas educativas. Comenzar la Facultad implica cambios en los ingresantes para lo que se requiere un tiempo de adaptación y transformación, reorganización personal, familiar y social; es ingresar a una organización y cultura especial, que se va conociendo y aprendiendo en forma gradual. Los objetivos de este trabajo fueron: i) facilitar la comprensión de temas no totalmente aprehendidos durante la cursada presencial; ii) alcanzar una mayor audiencia de estudiantes iii) facilitar la contención de los alumnos desaprobados; iv) favorecer la retención. Durante el segundo cuatrimestre de 2014, se implementó un curso virtual de apoyo, basado en consultas online a tutores, ejercicios resueltos y material didáctico para los estudiantes que habían sido desaprobados en el Área Básica del Conocimiento, asignatura del 1er año de la Carrera (Plan 506), utilizándose la plataforma Moodle y la red social Facebook. En este curso interdisciplinar, los diferentes tutores fueron interpelados en función de su temática, con la finalidad de poder evacuar las dudas y consultas con una mayor experiencia, interrelacionando el saber y, de esta manera, evitar el conocimiento fragmentado. De un total de 333 alumnos desaprobados, el 45,04 % (150) realizó consultas virtuales durante los meses que duró el curso. La mayor parte de las consultas de tipo temático se realizaron durante los meses de agosto a septiembre, correspondiendo con la mayor cantidad de alumnos aprobados (72). Se observó una muy buena aceptación por parte de los actores, pudiéndose inferir que el uso de las TIC representa un escenario cada vez más frecuente de intercambio con nuestros estudiantes, que puede ser muy beneficioso en nuestra tarea académica.

El audiovisual como herramienta pedagógica de integración en el curso de Economía General y Sociología

de la Arena G, Dumrauf S, Ateiro C, Fontana P, Urquiaga M, Saenz A, Alday JM, Perez Escalá S

Cátedra de Economía Agraria. FCV, UNLP.

garena@fcv.unlp.edu.ar

El aprendizaje no es un proceso lineal, ni constituye una respuesta automática por parte de los alumnos frente a los estímulos dictados en los contenidos por parte de los docentes. Teorías cognoscitivistas-constructivistas parten de la concepción: el hombre aprende en una relación de permanente intercambio con la realidad, que es asimilada y transformada por sus estructuras cognitivas. Desde este marco teórico se dicta el curso de Economía General y Sociología, situado dentro del ciclo de formación general, en el segundo año de la carrera de Medicina Veterinaria. En este marco, como ejercicio de síntesis final, los estudiantes realizan un trabajo audiovisual grupal integrador. El video tiene por objetivo que los estudiantes puedan apropiarse, movilizar e investigar contenidos vistos en clases (disponibles previamente en la plataforma Moodle). El seguimiento es pautado por diferentes momentos de entregas de avances, con orientaciones en cuanto a metodologías, lectura de bibliografía específica, intercambiando discusiones vía foros o mail con docentes y devoluciones durante el cuatrimestre, previo a la puesta en común final en plenario. Esta experiencia fue llevada a cabo en dos cursos sucesivos. Las temáticas abordadas en los videos se orientan hacia problemáticas vinculadas a la profesión, situada socialmente. Los grupos realizan en general trabajos de investigación que incluyen búsquedas bibliográficas, encuestas, entrevistas, filmaciones en lugares específicos, con gran creatividad e involucramiento. Interactúan fuertemente creando grupos de Facebook y WhatsApp. Se observó que los estudiantes profundizaron el vínculo, el compromiso y la interacción entre sus propios compañeros y docentes. En la encuesta final del curso, aumentaron los comentarios positivos en cuanto a la relevancia del curso para indagar y conocer la realidad y la relevancia del rol del veterinario en la resolución de los problemas de la sociedad. En síntesis, la experiencia permite concluir que la propuesta logra generar un diálogo de saberes entre teorías y el contexto real, con una dinámica participativa y de discusión, construyendo nuevos conocimientos y fomentando el espíritu crítico de los estudiantes.

Microbiología Especial en un entorno virtual de enseñanza y aprendizaje

Gatti EM, Linzitto OR

Cátedra de Microbiología Especial.
Carrera de Microbiología Clínica e Industrial. FCV, UNLP.

mgatti@fcv.unlp.edu.ar

El curso de Microbiología Especial, de carácter anual y modalidad presencial, pertenece al primer ciclo del de la Carrera de Microbiología Clínica e Industrial (Plan de estudios 2003, dos ciclos). Organizada en cinco bloques, cuenta con material de estudio confeccionado y organizado por los docentes de la misma, además de bibliografía obligatoria y de consulta vinculada a las normas y disposiciones nacionales e internacionales vigentes en salud. En función de la factibilidad de uso de los recursos tecnológicos institucionales para la creación de espacios virtuales de enseñanza y aprendizaje (EVEA), a partir del año 2013, la Cátedra incorporó material propio y proveniente de la Web en la plataforma Moodle, con el fin de favorecer la disponibilidad y comprensión de los temas correspondientes a los contenidos mínimos del material escrito planificado, así como para brindar información complementaria motivadora y de actualidad. Debido a la condición especial de ingreso a la mencionada carrera, que requiere de un título previo con orientación biológica (Médico, Veterinario, Biólogo, Odontólogo, Bioquímico, etc.), el recurso tecnológico virtual implementado permite la adecuación anual de la información en función de la heterogeneidad en la formación académica de los profesionales asistentes. También permite la profundización y actualización de aspectos prácticos de diagnóstico, en especial cuando el comportamiento epidemiológico de los agentes que se estudian dejaban limitado solo a aspectos teóricos, los encuentros presenciales de laboratorio, debido al riesgo biológico de su manipuleo. Por otra parte, la disponibilidad actual de capacitación institucional desde el espacio pedagógico e informático, facilitan el rol del docente como mediador en la construcción del conocimiento, con el desafío de atravesar las estrategias tradicionales de educación con el uso colaborativo, interactivo y motivador de las TIC, complementando los procesos de enseñanza y aprendizaje presenciales.

De las “Tecnologías de la Información y la Comunicación” a las “Tecnologías del Aprendizaje y el Conocimiento” en Microbiología Veterinaria

Gatti EM, Moredo FA, Stanchi NO

Cátedra de Microbiología. Carrera de Medicina Veterinaria. FCV, UNLP.

nestorstanchi@gmail.com

Desde el año 2009, con la implementación en la FCV, UNLP de la WAC, (plataforma generada por la Facultad de Informática) y posteriormente Moodle, recurso libre en constante actualización instalado en el servidor de la FCV, los cursos de Microbiología I y II han hecho uso de espacios creados a fin de mantener actualizados y a disposición de sus estudiantes: programa, cronograma, bibliografía, contenidos, presentaciones, integrantes y novedades semanales con utilización del módulo recurso que admite la presentación de ilimitado contenido digital, MS-Word®, PowerPoint®, Excel®, Flash®, vídeo, sonidos, etc. Tal versatilidad hizo posible que las clases teóricas expositivas a cargo de un docente, estuvieran en formato digital y a disposición “asincrónica” en el Aula Virtual (para la resolución de actividades) como cambio metodológico principal e innovador en sus inicios. Desde la perspectiva del aprendizaje constructivista, autodirigido y colaborativo y con el fin de acompañar a los estudiantes en su proceso de construcción del conocimiento, los materiales didácticos digitales de distintos formatos integrados a las prácticas docentes han ido evolucionando en función de las posibilidades de los recursos institucionales y la capacitación docente. La investigación sobre estrategias de aprendizaje enfocada en el campo del denominado aprendizaje estratégico pone énfasis en la planificación, el diseño y el empleo de objetivos de enseñanza con preguntas insertadas, ilustraciones, modos de respuesta, organizadores anticipados, redes semánticas, mapas conceptuales y esquemas de estructuración, que se han adoptado con el propósito de dotar a los estudiantes de estrategias efectivas para el aprendizaje significativo e independiente de las prácticas microbiológicas. Esto se confirmó en las encuestas de opinión 2015 a estudiantes y docentes de los cursos mencionados. Frente a la masividad de los cursos y a las nuevas posibilidades de acceso SIU de “todos los mediadores activos” al espacio del Aula Virtual, hasta el momento con restricción docente al responsable del espacio y al coordinador del curso, se podrá gestionar la interacción grupal docente/estudiante (antes circunscripta al correo electrónico), mediante los módulos tarea, foro, consulta, cuestionario, etc, contribuyendo a la mejora del ambiente virtual de aprendizaje y conocimiento.

Las TICs aplicadas al Curso de Microscopía Electrónica aplicada a la Investigación y el Diagnóstico

Jurado S, Peralta R, Faisal F, Queirel T

Servicio de Microscopía Electrónica. FCV, UNLP.

sjurado@fcv.unlp.edu.ar

En la actualidad, el uso de las TIC en la educación superior constituye una herramienta poderosa en el proceso de enseñanza-aprendizaje. Su utilización permite incrementar la diversidad de recursos didácticos aplicables a la enseñanza de los contenidos de cualquier asignatura. En ese sentido, se adaptaron los contenidos de un curso electivo presencial al formato semipresencial utilizando la plataforma Moodle, como espacio virtual para su dictado. El curso de Microscopía Electrónica aplicada a la Investigación y el Diagnóstico tiene una duración de 50 horas y sus contenidos se encuentran planificados en 6 unidades temáticas. Se implementó una AVO (actividad virtual obligatoria) por cada unidad temática, organizada de la siguiente manera: introducción, objetivos, desarrollo del tema con indicaciones y lecturas para su estudio, tiempo estimado de lectura, desarrollo de la actividad y videos didácticos introductorios de diseño propio y seleccionados de la Web. Se implementaron actividades de autoevaluación con la finalidad de que el alumno pueda integrar y afianzar los conocimientos adquiridos a lo largo del curso. Al mismo tiempo, se utilizó el foro para favorecer el aprendizaje colaborativo y la comunicación entre los participantes. En general, los alumnos que participaron de la modalidad semipresencial coincidieron en que los recursos didácticos fueron los apropiados para abordar los contenidos y que la experiencia les resultó innovadora. Concluimos que plantear la enseñanza de cualquier asignatura con la utilización de estas tecnologías constituye un gran desafío, pues implica la realización de una cuidadosa selección y organización de los contenidos curriculares que serán la clave del proceso de aprendizaje vinculado a las TIC. Por lo tanto, para que la incorporación de las TIC en los procesos de enseñanza-aprendizaje sea exitosa, es fundamental implementar programas de capacitación docente en esta área.

Uso de TIC en un curso de grado de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP

Kienast M, Saborido M, Acerbi F, Fusca A
Curso de Producción Equina. FCV, UNLP.

mkienast@fcv.unlp.edu.ar

El uso de las Tecnologías de la Información y Comunicación (TIC) en la enseñanza universitaria constituye una innovación que tiene por objetivo la mejora en los procesos de enseñanza-aprendizaje. El presente trabajo se implementó durante el año 2015 en el dictado del curso de Producción Equina, correspondiente al quinto año de la carrera de Medicina Veterinaria de la UNLP. Dado el elevado número de alumnos, se complicaba canalizar en las horas presenciales en el aula y de consulta sus necesidades reales e incluso la posibilidad de realizar viajes de estudio para la observación de temas de interés. Debido a esta realidad, debimos desarrollar una propuesta de uso de la plataforma virtual (Moodle). En el espacio correspondiente a nuestro curso, se incorporó un transparente virtual a través de un programa de libre acceso de Internet (Lino it), con el fin de crear un canal de comunicación extra al aula donde se colocaba la información administrativa básica y además se compartían materiales audiovisuales de apoyo a las actividades desarrolladas en clase, incluyendo algunas páginas Web de interés. Comprobamos que los alumnos lo consultaban, ya que, por ejemplo, cumplían con premisas solo allí pautadas, como la confección de una lista de alumnos interesados en realizar una práctica optativa propuesta. Promover el uso de la plataforma virtual de la Facultad, poniendo a disposición materiales seleccionados, da la posibilidad de acceder a temas que no se pueden tratar en las horas presenciales, e incluso una comunicación extra y más personal con los alumnos. Todo esto genera expectativas en el futuro uso de la aplicación.

La simulación en la enseñanza de la inmunología veterinaria aplicada

de la Sota P¹, Astudillo G², Pardini Lais¹, Malbrán M³, Mórtoles E¹

¹Inmunología Veterinaria FCV UNLP. ²Facultad de Exactas y Naturales UNLPam. ³Facultad de Informática. UNLP.

pdelasota@fcv.unlp.edu.ar

En las Ciencias Veterinarias, y específicamente en Inmunología Veterinaria aplicada, la enseñanza orientada a la práctica cobra un rol primordial y es aplicación substancial de la teoría. Este proyecto tuvo como objetivo la caracterización y el diseño de un simulador hipermedia como soporte en los procesos educativos para favorecer la toma de decisiones y como recurso para sustituir o apoyar los procesos de enseñanza en el laboratorio de inmunodiagnóstico. Los destinatarios fueron alumnos de quinto año del curso de Inmunología Animal Aplicada. La metodología empleada constó de tres secciones: a) Decisiones relativas al contenido: en este punto se realizaron consultas de bibliografía técnico-científica sobre la enfermedad tomada como ejemplo. b) Decisiones relativas al diseño: dividido en cuatro actividades: diagnóstico presuntivo de la enfermedad; toma de muestra; pruebas diagnósticas y resultados e interpretación. El alumno elegía diferentes alternativas debido a que el diseño era flexible en términos de grados de libertad, y trabajaba información secuencial, sin perder de vista el objetivo, que era el desarrollo de la técnica de inmunodiagnóstico. c) Decisiones relativas a la aplicación: aplicación piloto a una muestra de voluntarios y revisión del prototipo según las observaciones recogidas. Estudiantes, graduados y docentes consultados luego de la presentación del simulador, manifestaron en una apreciación inicial el significativo impacto potencial que tiene dicho proyecto, considerándolo pertinente y atractivo. Las estimaciones futuras y ampliadas del impacto inicial, se realizarán mediante la elaboración de un cuestionario estructurado y cerrado. Como conclusión preliminar, podemos afirmar que la implementación de este recurso en la enseñanza de la Inmunología Animal Aplicada debería ser considerada, no sólo como un elemento que sustituya a las prácticas en el laboratorio, sino como un andamiaje para los estudiantes con sus pares y docentes y como apoyo a la enseñanza. De esta forma, se pretende promover y facilitar las competencias profesionales, la comprensión crítica y el desarrollo de habilidades cognitivas y valorativas.

Aplicación del aprendizaje semipresencial (b-Learning): experiencia para el dictado de cursos optativos

Giacoboni G¹, Sguazza H¹, López C²

¹Departamento de Microbiología. FCV, UNLP, ²Cátedra de Salud Pública. FCV, UBA.

giacoboni@fcv.unlp.edu.ar

El aprendizaje semipresencial (b-Learning) se refiere a la combinación del trabajo presencial (en aula) y del trabajo en línea (combinando Internet y medios digitales). En el marco del proyecto “La educación a distancia (e-Learning) como modelo alternativo para el dictado de cursos optativos o electivos” se instauró la modalidad en el segundo cuatrimestre del año 2015 en el curso “Algunos modelos de patogenicidad bacteriana implicados en la Salud Pública”. El mismo constó de 8 clases virtuales y 3 presenciales de prácticas de laboratorio. Las clases virtuales que se subieron a la plataforma Moodle cada 7 días ofrecieron material elaborado por los docentes. Asimismo, se utilizaron varios de los recursos y actividades que ofrece la plataforma Moodle. Como canal de comunicación asincrónica cada clase ofreció un foro de consulta y debate de los temas y el correo interno de la plataforma como apoyo a consultas individuales. Complementaron a este curso una página Facebook y un Blog con información adicional. La realización del trabajo final integrador con exposición oral frente a sus compañeros sigue siendo la evaluación relevante, si bien se promedia con cada una de las actividades pautadas en la semana (obligatorias para conservar la condición de alumno regular). Se realizaron 3 encuestas. Al iniciar el curso, para conocer experiencias previas y percepción acerca de la metodología virtual; a mitad del curso, con la finalidad de conocer las dificultades que se presentaron durante el trayecto y en la finalización del curso para recabar información respecto a las prácticas de laboratorio y concepto general de la modalidad experimentada. Con esta experiencia, comprobamos que la semipresencialidad es una opción aceptada y con gran compromiso por parte del alumno, que le ofrece autonomía e independencia en el estudio y que lo prepara para enfrentarse a la clase presencial de laboratorio con los conceptos más elaborados para enfrentar a la práctica.

Apoyo del aula virtual en el dictado de cursos presenciales electivos/optativos

Giacoboni G¹, Sguazza H¹, López C²

¹Departamento de Microbiología. FCV UNLP, ²Cátedra de Salud Pública. FCV, UBA.

giacoboni@fcv.unlp.edu.ar

Los cursos electivos forman parte del plan actual de estudio en la carrera de medicina veterinaria de nuestra Facultad. Su dictado en 40 horas necesita de objetivos y contenidos precisos. Los entornos virtuales de aprendizaje pueden tener un rol dentro de la educación presencial como la aplicación del b-Learning que combina e-Learning con enseñanza presencial. A partir del 2011, se propuso el dictado de un curso electivo con modalidad b-Learning: “Algunos modelos de patogenicidad bacteriana implicados en la Salud Pública”, enfocando la función del laboratorio dentro del marco de “Una Salud”. Se facilitó a través del aula virtual Moodle, documentos tales como: textos explicativos, clases virtuales, artículos científicos, enlaces, videos y cuestionarios. El material fue puesto a disposición del estudiante una semana antes de la realización del encuentro presencial. Un foro de consultas y correspondencia dentro del aula permitió canalizar las dudas. A través de la elaboración y entrega de consignas establecidas para cada tema, se realizó la evaluación continua, motivando al autoaprendizaje y la autoevaluación. La aprobación del curso consistió en la elaboración de un trabajo final integrador grupal (con un máximo de 4 alumnos) elegido por ellos mismos, en el que pudieran aplicar los conceptos y conocimientos adquiridos en el curso a partir de los “modelos de patogenicidad bacteriana”, con tutoría durante su elaboración. La presentación del mismo fue una clase expositiva con 50 minutos de disponibilidad y Power Point® frente a sus compañeros. El 100% de los estudiantes que participaron cumplieron las actividades en el tiempo establecido, logrando cumplir con los requisitos necesarios para la aprobación del curso. La realización de una serie de actividades a través del aula virtual permitió una mayor autonomía, integrar conocimientos y facilitó el aprendizaje de los conceptos necesarios para el desarrollo correcto de las prácticas en el laboratorio, representando esta modalidad una alternativa didáctica posible.

Soporte aula virtual Moodle: experiencia para el dictado del curso electivo Programa de Prerrequisitos y Bases para implementar Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP)

Pellicer K, Aliverti F, Barbero R, Bigeon G, Brusa V, de la Torre J, Lasta G, Leaden P, Ortega E, Salum L, Copes J

Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. FCV, UNLP.

pellicerk@fcv.unlp.edu.ar

La utilización de las nuevas tecnologías como herramientas de apoyo para la educación brindan un fortalecimiento del trabajo en red y la construcción colaborativa, además de generar recursos humanos capacitados. Nuestro curso electivo se desarrolla en el primer cuatrimestre con una carga horaria de 40 horas de las cuales, 24 abordan clases teóricas y 16 involucran actividades prácticas. Estas últimas incluyen visitas al comedor universitario para la observación de procesos y desarrollo del trabajo final, el cual consta de la elaboración y redacción de un procedimiento con 5 horas destinadas a la exposición y evaluación de dichos trabajos. Los estudiantes cuentan también con un viaje opcional. El curso se desarrolla en el aula de informática, donde cada alumno dispone de una computadora para el desarrollo del trabajo final con acceso al aula virtual Moodle. La información general, programa y cronograma de actividades, bibliografía, mensajería y evaluación del curso se realiza a través del entorno virtual Moodle. Los docentes realizan un intercambio en tiempo real con los estudiantes a fin de apoyar y reorientar el trabajo final para la recuperación/adquisición de los saberes, y así fortalecer el logro de las habilidades y destrezas necesarias para el ejercicio profesional. Actualmente, la evaluación del curso consiste en la culminación del trabajo final integrador desarrollado en clase como propuesta a una problemática detectada en las visitas a planta. Se encuentra en proceso de elaboración una autoevaluación para que el estudiante la realice mediante la utilización de la herramienta Moodle. Consideramos que el curso electivo, satisface las demandas de los futuros profesionales vinculados al área. Esta propuesta gira en torno a la participación del estudiante desde la práctica, utilizando como complemento escenarios virtuales con resultados altamente satisfactorios para su desenvolvimiento en la práctica profesional.

Microscopía virtual como recurso didáctico en actividades presenciales

Santelices Iglesias OA, Wright C, Grandinetti JAB, Migliorisi AL, Paulovich FB, Saturno PD, Nishida F, Granero Agüero JM, Fontana C, Scenna GS, Sisti MS, Camiña AE, Portiansky EL

Cátedra de Patología General. FCV, UNLP.

asantelices@fcv.unlp.edu.ar

El elevado número de estudiantes que asisten a las actividades presenciales obligatorias (APO) y a los repases del curso de Patología General, en la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional de La Plata, y la escasa disponibilidad de aulas con microscopios ópticos, dificultan la observación de los escasos cortes histopatológicos disponibles. Para afrontar estos inconvenientes se recurrió a la microscopía virtual, que permite la visualización de imágenes de microscopía, escaneadas mediante una platina motorizada, por medio de sistemas informáticos. Las imágenes fueron almacenadas en las computadoras de la FCV con acceso público, y visualizadas con el software libre Olyvia (Olympus). Esta técnica subsanó las limitaciones planteadas, ya que se implementó su uso en las APO del curso 2015, en conjunto con la utilización de microscopios tradicionales. Además, se sumó una autoevaluación por cada APO, diseñada en la plataforma Moodle, a partir de capturas de sectores de las imágenes virtuales, conteniendo preguntas relacionados con aspectos morfológicos. Los estudiantes debían resolverlas sustentados en la exploración de las imágenes virtuales y las referencias que estas contienen. Las autoevaluaciones permanecieron disponibles para su acceso remoto, como material de estudio. La encuesta realizada reveló que la mayoría de los estudiantes consideró la visualización de imágenes virtuales muy similar a la observación con el microscopio óptico, muy esclarecedora y complementaria al mismo; el material era de buena calidad y adecuado a los contenidos de las APO; la observación de las imágenes fue útil para la resolución de la autoevaluación, la que también pudieron resolver desde su domicilio; el tiempo destinado fue suficiente gracias a la ayuda de los docentes y la cantidad de computadoras disponibles fue adecuada. La experiencia resultó positiva ya que la diversificación de las actividades permitió atender a un gran número de estudiantes con un significativo grado de satisfacción.

Incorporación e impacto de nuevas herramientas de comunicación en el curso de Inmunobiología Animal Básica

Gos ML, Venturini MC, Campero LM, Rambeaud M, Pardini L, Dellarupe A, Bernstein M, Samus S, Miceli G, Larsen A, Serena S, Panei J, Mórtoła E

Inmunobiología Animal Básica. FCV, UNLP.

mortola@fcv.unlp.edu.ar

El curso de Inmunobiología Animal Básica se encuentra ubicado en el segundo año de la Carrera de Medicina Veterinaria, UNLP. Con el fin de cambiar el modelo tradicional de aprendizaje “acumulativo” y de actualizar el sistema de comunicación con los estudiantes, desde el año 2015 incorporamos presentaciones Power Point® con audio, relatadas por los docentes del curso, como material didáctico que se coloca en la plataforma virtual Moodle. Al considerar esta herramienta necesaria para resolver el cuestionario y la evaluación que se desarrolla en el taller de cada actividad, nos propusimos determinar su impacto en el desempeño de los estudiantes. Se analizaron 252 encuestas anónimas de opinión que representaron al 67 % del total de los estudiantes. El 92 % indicó que las clases grabadas fueron utilizadas como material de estudio “siempre” o “la mayoría de las veces”. Consultados sobre la dificultad para acceder a las clases grabadas, el 38 % no manifestó tener inconvenientes; sólo el 7 % no pudo acceder a las mismas y el 55 % “a veces” tuvo dificultades. Consultados sobre cómo resolvieron este problema, manifestaron que lo hicieron a través de la consulta con docentes y compañeros (39 %), consultando bibliografía (27 %) y tratando de resolver los problemas técnicos (34 %). Consideramos que esta herramienta incorporada al proceso de enseñanza facilitó la construcción de su propio conocimiento a los estudiantes y, sumado a otros recursos didácticos, al aumento significativo (del 41 al 59 %) del número de alumnos que promocionaron con respecto al año anterior. Proponemos adecuar esta metodología con otras tecnologías de comunicación para favorecer el acceso a todos los estudiantes y de esa manera lograr una mayor difusión de la temática de inmunología animal, cuyos contenidos van cambiando constantemente y de la que hay pocos libros en castellano actualizados.

Curso de posgrado de Cardiología Clínica: Electrocardiografía y arritmias en pequeños animales *online*

Tórtora CM, Batista P, Arias DO

Servicio de Cardiología. FCV, UNLP.

mtortora@fcv.unlp.edu.ar

El objetivo de nuestro curso es capacitar a los médicos veterinarios en la comprensión de la electrofisiología cardíaca y de los fundamentos de la electrocardiografía. Asimismo, se propone entrenarlos en el reconocimiento, interpretación y manejo médico de las arritmias cardíacas de más frecuente presentación en pequeños animales. Para el dictado del curso se utiliza la plataforma Moodle. Los alumnos ingresan al aula virtual donde se muestran todas las actividades propuestas para el curso, como las clases Power Point® elaboradas y grabadas por los propios docentes, material de lectura en formato PDF, videos y planillas de datos. Las actividades prácticas se realizan con el material correspondiente al archivo propio del Laboratorio de Cardiología. Estas actividades prácticas pueden discutirse en un Foro abierto en el que el docente actúa como moderador. La evaluación final consta de la resolución de un caso problema debiendo el estudiante abordarlo de manera integral con todos los temas del curso.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

Política editorial y generalidades

Las opiniones expresadas por los autores que contribuyen con *Analecta Veterinaria* no reflejan, necesariamente, las opiniones de este medio ni de las entidades que lo auspician ni de nuestra institución. Asimismo, *Analecta Veterinaria* agradece el auspicio de las distintas empresas que la respaldan, pero deja establecido que dichas empresas no participan de las decisiones editoriales y su apoyo no genera obligaciones comerciales.

Analecta Veterinaria autoriza la reproducción de sus artículos con fines académicos, con la única condición de la mención de la fuente cuando corresponda. El uso de nombres comerciales destinados a la identificación de productos en el contexto de los artículos presentados no implica respaldo directo o indirecto ni promoción de dichos productos por parte de la revista. Los editores de *Analecta Veterinaria* tienen en consideración el tratamiento ético de los animales de experimentación y se reservan el derecho de no publicar trabajos que no cumplan esta premisa. Los autores deberán poder certificar la aprobación de su proyecto de investigación por parte del comité de ética de su unidad académica, o consignar según qué normas nacionales o internacionales realizaron sus trabajos. Todos los autores ceden a *Analecta Veterinaria* los derechos de autor, se hacen responsables de los datos y el contenido, dejan constancia de que han participado activamente en el proceso de la investigación y/o la confección del trabajo, declaran eventual conflicto de intereses, mencionan los soportes financieros y explicitan la aprobación por los comités institucionales y autoridades regulatorias que correspondan a cada caso. No se asume responsabilidad editorial por la exactitud de las referencias. Es responsabilidad exclusiva de los autores asegurarse el permiso para citar datos no publicados. Eventualmente, los editores podrán requerir a los autores información probatoria. Idiomas. *Analecta Veterinaria* acepta artículos en español o en inglés para su publicación. Los resúmenes de los artículos se publicarán en español y en inglés. Originalidad. La información contenida en el trabajo no deberá ser enviada a más de una revista o medio de comunicación al mismo tiempo y debe ser original. El envío de un artículo publicado en otro sitio por otro autor (plagio) o por el mismo autor (publicación duplicada) se considera falta ética grave que invalida su publicación en *Analecta Veterinaria*.

Tipos de trabajo para publicación. Se aceptan: artículos de investigación, comunicaciones cortas, descripciones de casos, informes técnicos y revisiones bibliográficas (ver definiciones y características de cada tipo de trabajo). Los editores decidirán la prioridad de publicación de los trabajos. Otro tipo de contenidos, como por ejemplo resúmenes de comunicaciones en reuniones científicas, serán editados como parte de un suplemento. Los organizadores de las mencionadas reuniones deberán adecuar los resúmenes a las instrucciones que se encuentran en el punto 1.3.

Analecta Veterinaria adhiere a lo propuesto por el consenso de Vancouver del International Committee of Medical Journal Editors con respecto a asuntos de índole general como, por ejemplo, la definición de la autoría, las responsabilidades de los editores y las causas que obran

como posible conflicto de intereses. En relación con otros aspectos, como el formato y el estilo de preparación del original, incluyendo las referencias bibliográficas, *Analecta Veterinaria* establece un conjunto de normas que se detallan en el apartado Instrucciones para la preparación del trabajo para publicación. Todas las dudas que se susciten podrán ser consultadas por correo electrónico a:

analecta@fcv.unlp.edu.ar

Instrucciones para la preparación del trabajo

Definición. El original para publicación comprende un documento principal y otros archivos.

1- Documento principal: se trata de un archivo que contiene la página de presentación, las secciones del trabajo (que varían según su tipo), los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses, las referencias bibliográficas y las leyendas para las figuras. Este documento podrá tener algunos de los siguientes formatos: doc, docx o rtf.

2- Otros archivos: tablas, figuras, material complementario.

Características generales

Los artículos escritos en inglés deberán seguir la gramática propia del inglés británico. Se aceptan otras variantes del idioma inglés, siempre que se respeten de manera uniforme en todo el trabajo. Las unidades de medida se expresarán según el Sistema Internacional de Medidas (documento disponible para su descarga en la página web de la facultad: <http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta>). Las abreviaturas deberán ser aclaradas la primera vez que el término se mencione, pero no será necesaria su utilización si el término se menciona menos de cinco veces. Si el trabajo requiere el uso de numerosas abreviaturas (más de diez) deberá generarse una lista que se incluirá luego de los resúmenes. Ciertas siglas o acrónimos y abreviaturas (ATP, DNA, ELISA, OMS, PBS, Dr., N°, entre otras) no requieren aclaración.

Para la denominación de enzimas, bacterias y virus, así como para el empleo de términos anatómicos, se seguirán las recomendaciones de las nóminas y consensos vigentes para la especialidad correspondiente. Los productos comerciales deberán ser identificados mediante el símbolo de marca registrada consignando, además, los nombres genéricos de los componentes principales. Si la mención se efectúa en el apartado Materiales y Métodos deberán consignarse, además, el nombre y la dirección del fabricante (ciudad, país). Los nombres científicos de categoría genérica o inferior se escribirán en cursivas.

1- Documento principal

1.1. Formato general del documento (común a todo tipo de trabajos)

El documento se configurará en hoja A4, con márgenes de 3 cm por lado, como mínimo, y 1,5 de interlineado. El texto deberá alinearse en los márgenes izquierdo y derecho (texto justificado). Se utilizará el tipo de fuente Arial de 12 puntos. Las páginas deberán estar numeradas, utilizando números arábigos en su ángulo inferior derecho.

Asimismo, las líneas deberán estar numeradas a lo largo de todo el documento de manera consecutiva, comen-

zando en la primera página o página de presentación. El uso de guiones automáticos de separación de palabras en sílabas estará permitido exclusivamente para los resúmenes de congresos.

1.2. Otras características comunes a todo tipo de trabajos

1.2.1. Primera página o página de presentación: contendrá el título del trabajo en dos idiomas, los autores y sus respectivas filiaciones o lugares de trabajo, la dirección electrónica de todos los autores, los datos completos del autor de contacto y el título abreviado. De ser necesario, la página de presentación podrá sobrepasar una página de extensión.

1.2.2. Páginas segunda y tercera: contendrán los resúmenes y las palabras clave.

1.2.3. Páginas sucesivas: contendrán el texto (organizado en secciones), los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses, las referencias bibliográficas y las leyendas para las figuras.

1.2.1 Primera página: página de presentación

-Título del trabajo. Se escribirá con la inicial en mayúscula (tipo oración) y en negrita, centrado, con fuente Arial y tamaño de fuente 14. Será conciso pero suficientemente informativo. No contendrá abreviaturas. Se dejará un espacio de interlineado y luego se consignará el título en inglés (o en español, si el artículo estuviera escrito en inglés), con las mismas características tipográficas.

-Nombres de los autores. Se dejará un espacio después del título en el segundo idioma. Se escribirá primero el apellido y luego las iniciales de los nombres. Se continuará listando el resto de los autores, separándolos entre sí por comas. Se colocarán números con formato de superíndice para indicar, más adelante, la filiación institucional.

-Filiación institucional/lugar de trabajo. Se consignará a renglón seguido de los apellidos de los autores. En primer término, se deberá indicar la unidad de investigación (Cátedra, grupo de trabajo, Laboratorio, Instituto, etc.). Luego, la Facultad u otra institución de la que depende y la Universidad u organismo superior. En caso de tratarse de un profesional de actividad en el ámbito privado se consignará "Profesional independiente".

El autor de contacto será identificado con un asterisco.

-Título abreviado. Se escribirá en el mismo idioma que el trabajo, luego de la filiación institucional, dejando un espacio. Consistirá en un título corto, de 45 caracteres o menos, incluyendo espacios.

-Datos personales.

Por debajo del título abreviado se consignarán todos los datos correspondientes al autor de contacto: nombre completo, dirección postal laboral y electrónica y teléfono. Sólo la dirección de correo electrónico será visible a los lectores en la versión publicada.

Las direcciones de correo electrónico del resto de los autores deberán ser incluidas, aunque estas no serán publicadas en el artículo.

Ejemplo de primera página

Título completo en idioma del trabajo

Título en segundo idioma (inglés/español)

Autor AA1, Autor BB1, 2, Autor CC3, Autor DD4*

1. Cátedra, Departamento, Facultad, Universidad; 2. Laboratorio, CONICET/CIC; 3. Profesional independiente;

4. Laboratorio, INTA. *Correo de contacto: dd@mail.com

Título abreviado

Datos del autor de contacto (*)

Nombre completo

Dirección postal laboral

Dirección electrónica laboral

Teléfono

Correo electrónico de los autores

Autor AA: aa@mail.com

Autor BB: bb@mail.com

Autor CC: cc@mail.com

1.2.2. Páginas segunda y tercera

La segunda página contendrá el resumen del trabajo en el idioma en que fue redactado, bajo el subtítulo de RESUMEN y, por debajo, dejando un espacio, se deberán incluir las palabras clave en el mismo idioma, bajo el subtítulo PALABRAS CLAVE. En la siguiente página (tercera), se redactará el resumen en el segundo idioma (en inglés se subtitulará como ABSTRACT). Dejado un espacio, se consignarán las palabras clave con el subtítulo KEY WORDS.

-Características de los resúmenes. En ellos deben constar los objetivos y principales resultados, desarrollados en 250 palabras o menos. Se sugiere evitar acrónimos, siglas y abreviaturas. No estarán divididos en secciones ni contendrán referencias.

-Palabras clave. Son palabras o expresiones adicionales que facilitan la recuperación del documento. Para una mayor utilidad en la búsqueda dentro de los sistemas de indización, se sugiere la utilización de términos no incluidos ni en el título ni en el resumen. Se permiten hasta cinco por idioma.

1.2.3. Páginas sucesivas

a-Texto. Organizado en secciones. Estas estarán encabezadas por subtítulos en mayúsculas, sin punto final. El texto contendrá las entradas para todas las tablas, figuras, referencias bibliográficas y material complementario. A continuación del texto se listarán las referencias bibliográficas.

b- Referencias bibliográficas

Cantidad. Se establece un máximo de treinta referencias para los artículos de investigación y quince para las comunicaciones cortas, descripciones de casos e informes técnicos. Para las revisiones bibliográficas se establece un mínimo de cuarenta referencias.

Formato de las citas en el texto. Se consignará, entre paréntesis y en color de fuente azul, el apellido del primer autor (seguido de la expresión *et al.* si se trata de más de dos autores) y el año de publicación. Si el artículo tiene sólo dos autores, se consignarán ambos, separados por la letra y. Si la construcción así lo requiere podrá colocarse la cita a mitad de la oración.

... puede persistir el infiltrado de linfocitos (Deeg *et al.* 2002).

También se puede expresar de la siguiente manera: "Según Deeg *et al.* (2002), puede persistir el infiltrado de linfocitos".

Si la misma afirmación se sustenta en más de una cita bibliográfica, estas deberán estar separadas por medio de un punto y coma. La incorporación de las citas entre paréntesis será alfabética. Si se incluyeran dos o más referencias del mismo primer autor, las fechas de publicación deberán estar separadas por comas, en orden cronológico

ascendente.

... en las células apoptóticas se produce la externalización de la fosfatidilserina de la

membrana (Fadok *et al.* 1992; Savill 1993, 1997; Willie 1997).

Si se incluyeran dos o más referencias del mismo primer autor y del mismo año, se

identificarán con letras:

... inducido por las células macrofágicas (Jones *et al.* 2009a, 2009b)

Formato de las citas en la lista de referencias (al final del texto).

El orden será alfabético.

Artículos en publicaciones periódicas. Se citará la nómina completa de autores y sus iniciales. Luego del punto y seguido, se introducirá el título del trabajo con mayúsculas y minúsculas (tipo oración), sin comillas ni negritas. A continuación, el título abreviado de la revista según consta en el servicio *PubMed*. Luego, el año, volumen, número y páginas, en ese orden, sin espacios luego de los signos de puntuación, según el formato que se muestra a continuación:

Deeg CA, Ehrenhofer M, Thurau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res.* 2002;75(2):127-33.

Si se trata de una publicación anticipada disponible en línea, deberá consignarse (corresponde a las publicaciones que figuran como Epubahead of print).

Libros. Se citará el o los autores, el año de publicación, el título y la edición (si no es la primera). Luego, la ciudad de la publicación y el nombre de la editorial, separados por punto y coma.

Gilbert SF, 2006. *Biología del desarrollo*. 7° Ed. reimp. Buenos Aires; Médica Panamericana.

Capítulos de libros. La cita constará de: autor/es del capítulo, título del capítulo. En: autor del libro, año de publicación. Luego el título del libro, la edición (si no es la primera). Ciudad de publicación: nombre de la editorial, páginas inicial y final del capítulo.

García V, Ochoa L, Quiroga MF y Pasquinelli V. Aspectos celulares y moleculares de la respuesta inmune frente a las micobacterias. En: Rabinovich GA, 2004. *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica*. Buenos Aires; Médica Panamericana, pp. 217-27.

Libros electrónicos de acceso libre en internet. Autor, año de publicación. Título [libro electrónico/e-book]. Lugar de publicación (si se conoce): editor. Disponible en: (URL) [fecha de acceso].

En caso de dudas acerca de cómo citar otro tipo de material (estándares internacionales, leyes, publicaciones parciales en e-books de congresos, patentes, informes de organizaciones) comunicarse con la revista.

c- Agradecimientos

Los autores pueden agradecer a individuos que han realizado aportes significativos diferentes a los de los coautores. En este apartado deberá consignarse, además, la fuente de financiamiento del trabajo.

d- Declaración de conflicto de intereses

Bajo el subtítulo **Conflicto de Intereses** se consignarán las relaciones financieras o personales con organi-

zaciones o personas que pueden influenciar o sesgar los resultados del trabajo, o declararán que no existen conflicto de intereses.

Ejemplo:

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

1.2.4. Formando parte del documento principal, pero en hoja aparte (página siguiente a los puntos c y d) se consignarán las leyendas para las figuras. Las tablas se enviarán en hoja aparte en un archivo con el título y las referencias correspondientes, que deberán seguir los mismos criterios tipográficos.

1.3 Tipos de trabajos

-Artículos de investigación: son informes completos de investigaciones originales o de meta-análisis. Constan de las siguientes secciones: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión y Conclusiones.

-Comunicaciones cortas: se trata de informes originales que se caracterizan por ser acotados en extensión o envergadura, o que en razón de su novedad requieren comunicación inmediata como anticipo de otra más exhaustiva. Constan de las mismas secciones que los artículos de investigación. No podrán tener más de 4 páginas de texto ni más de 3 figuras.

-Revisiones bibliográficas: son revisiones narrativas dirigidas a la actualización de un tema relevante y que incluyen la discusión crítica del estado del conocimiento. Constan de: Introducción, Subtítulos (los que resulten apropiados al tema en cuestión) y Discusión y Conclusiones.

-Descripción de casos: se trata de casos con aspectos inusuales que provean información significativa y original. Este concepto incluye la presentación o progreso poco habitual de una enfermedad, efectos colaterales o adversos no informados durante tratamientos o planes de vacunación, entre otros. Constan de Introducción, Presentación del Caso (con los subtítulos que requiera el tipo de caso) y Discusión y Conclusiones. Deberá incluir hallazgos relevantes, tanto positivos como negativos, que surjan de los exámenes realizados, la interpretación de los resultados y su discusión con referencias a los artículos citados.

-Informes técnicos: descripción y análisis de técnicas novedosas en los ámbitos de la investigación, el diagnóstico o el tratamiento quirúrgico. Constan de Introducción, Descripción Metodológica y Discusión y Conclusiones. En este y otros tipos de trabajo que así lo requieran, la descripción metodológica puede enriquecerse mediante videos de alta calidad.

Formato de resúmenes de presentaciones en reuniones científicas. Instrucciones para sus organizadores.

La presentación deberá realizarse en hoja A4, con un ancho de 8 cm, sin recuadrar, con tipografía Arial 9 pt e interlineado sencillo. La redacción deberá ordenarse como se describe a continuación.

Primer renglón: Título del trabajo, proyecto, beca o tesis, en negrita, sin abreviaturas, en tipografía mayúscula/minúscula.

Segundo renglón: Apellido completo e iniciales de los autores en tipografía mayúscula/minúscula.

Tercer renglón: Lugar de trabajo de los autores.

Cuarto renglón: en blanco.

Del quinto renglón en adelante se escribirá el texto.

No deberá superar las 250 palabras y se organizará en Introducción, Objetivo/s, Metodología, Resultados y Conclusiones, aunque los títulos de estas secciones no deben aparecer. Para aquellos autores que presentan su plan de trabajo, deberá reemplazarse la sección de Resultados y Conclusiones por la de Resultados Esperados. Los resúmenes no pueden incluir gráficos ni imágenes, pero puede contener valores numéricos de los resultados encontrados. Se debe minimizar el uso de abreviaturas; en caso de ser utilizadas, deberán aclararse la primera vez que se citen y estar de acuerdo con el sistema internacional de unidades (SI).

2. Otros archivos

Figuras. Se consideran figuras que ilustran el trabajo tanto a las fotografías como a los dibujos lineales y esquemas. Deberán ser numeradas correlativamente con números arábigos y citadas en el texto en el orden que corresponda. En caso de tratarse de fotografías, estas no podrán incluir rostros de personas que no sean autores, o animales con marcas específicas que permitan reconocerlos, excepto que se posea consentimiento por escrito de los propietarios involucrados. Es responsabilidad de los autores obtener permiso de los poseedores de la propiedad intelectual para reproducir figuras o tablas que han sido publicadas en otro sitio. Las ilustraciones deben tener un contraste adecuado. Deberán ser enviadas en formato TIFF. Las figuras escaneadas deberán tener una resolución de 300 dpi (para imágenes fotográficas macro o microscópicas) o de 600 a 1200 dpi (para dibujos lineales). El tamaño de letras y números incluidos en las figuras deberá ser el adecuado para que conserve la legibilidad, aún luego de la reducción de tamaño. Las leyendas para las figuras deberán constituir una descripción precisa del contenido de las figuras y mencionar las técnicas cuyos resultados allí se muestran.

Tablas. Las tablas se diseñarán usando la función correspondiente del procesador de texto o de las planillas de cálculo. Deben ser de estructura sencilla, sin sombreados y sin divisiones entre las filas o las columnas.

Material complementario

Podrán remitirse otros tipos de archivos, como videos o hipervínculos, cuya pertinencia y calidad será evaluada por el Comité Editorial. Este material no será considerado si no se envía según el formato que aquí se detalla: peso máximo de 20 MB cada uno, formato reproducible mediante herramientas y programas gratuitos (PDF, SWF, MP4, MOV, XLS, XLSX). Los datos del material complementario (nombre del archivo, formato y extensión, título de los datos presentados y descripción de los datos) constarán en el apartado LEYENDAS PARA LAS FIGURAS.

Envío del original, proceso de revisión y comunicación con los autores.

Se encuentra disponible para su descarga una lista de comprobación que podrá ser utilizada por los autores para revisar algunas cuestiones formales del trabajo antes de su envío.

El autor de contacto debe remitir el trabajo con el conocimiento de que todos los autores han leído y aprobado el trabajo y están de acuerdo con el envío a *Analecta Veterinaria* y es responsable por esa situación. La remisión del trabajo, así como toda la comunicación subsecuente entre editores y autores, se realizará por correo electrónico. Es un requisito que las direcciones activas de correo electrónico de todos los autores figuren en la página de presentación, así como la dirección completa del autor de contacto formal (quien remite el trabajo).

El envío se realizará al Sr Director de *Analecta Veterinaria* a la siguiente dirección de correo:

analecta@fcv.unlp.edu.ar

En el cuerpo del mensaje se solicita consignar: título del trabajo, autores y direcciones de correo electrónico de todos los autores. En ese mensaje es bienvenida la inclusión de nombres de evaluadores potenciales, que en ningún caso podrán haber sido coautores de ningún autor, al menos en los últimos cinco años, ni miembros actuales de la misma institución que ellos. Estos datos son recibidos en calidad de sugerencia y no generan ningún compromiso para el comité editorial. Si el envío consiste en numerosos archivos (tres o más) se enviarán comprimidos con la extensión .rar. Todos los autores recibirán un mensaje de confirmación de la recepción correcta de todos los archivos.

Revisión. El comité editorial evaluará primero la pertinencia de la recepción del trabajo, según se adecue o no a las áreas del conocimiento que alcanza la revista. En caso de corresponder, el comité verificará que se cumplan las siguientes premisas: calidad de contenido para ser remitida a los miembros del comité científico, corrección gramatical del idioma del trabajo y adecuación a las normas editoriales. Los originales que no cumplan con las normas editoriales serán devueltos a los autores para ser reordenados de acuerdo con ellas.

Todos los artículos serán sometidos a una revisión anónima por pares: tanto los nombres de los autores como de los revisores se conservan en el anonimato. El comité editorial seleccionará para esa función a, por lo menos, dos evaluadores con conocimiento de la especialidad e informará a los autores acerca de los resultados de la evaluación y los pasos a seguir en consecuencia. Los autores deberán responder los comentarios y sugerencias de los revisores punto por punto, en un documento aparte, titulado: "Respuestas al Editor".

Los trabajos que sean reenviados más de una vez, o después de los cuatro meses de la decisión inicial, serán considerados como un nuevo envío.

La obra de los autores se pondrá a disposición del público para que haga de ella un uso justo y respetuoso de los derechos de autor, cumpliendo las condiciones de la licencia de uso *Creative Commons* CC BY-NC-ND. Este tipo de licencia permite a otros descargar la obra y compartirla, siempre y cuando se de crédito a los autores, pero no permite cambiarlas de forma alguna ni usarlas comercialmente.

Correo postal:

Sr. Director

Revista ANALECTA VETERINARIA

CC 296 (B1900AVW) La Plata

ARGENTINA