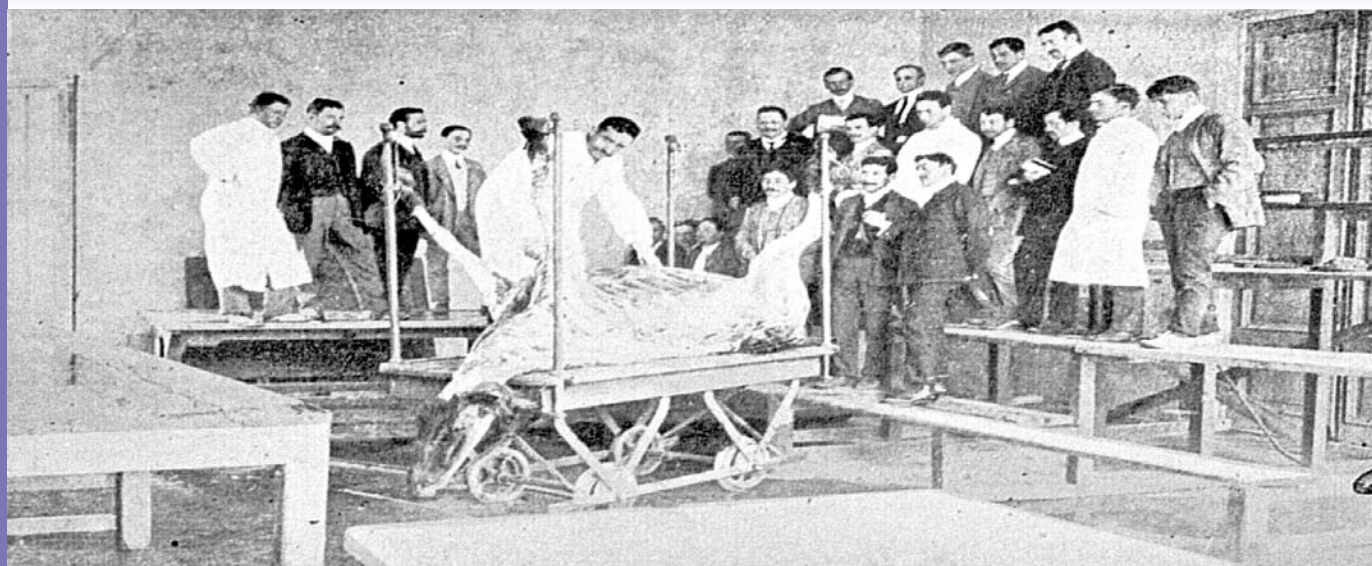


Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias

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 26 n° 2 año 2006*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

# ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 26 n° 2, 2006

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

## Autoridades

### Decano

Dr. Edgardo Nosetto

### Vicedecano

Bac. Reinaldo Fonrouge

### Secretario Académico

Méd.Vet. Enrique Félix Costa

### Secretario de Postgrado

Dra. Pilar Peral García

### Secretario de Extensión Universitaria

Dr. Jorge Romero

### Secretario de Ciencia y Técnica

Ing.Zoot. Fernando Noel Dulout†

### Secretario de Asuntos Estudiantiles

Méd.Vet. Fernando Marino

### Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. María Gabriela Echeverría

## ANALECTA VETERINARIA

### Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

### Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

### Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

### Comité Editorial

#### (Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi

Dr. Pablo E. Martino

Méd.Vet. Enrique Pennimpede

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

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

### Evaluadores de trabajos de Analecta Veterinaria:

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

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

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

ISSN 0365514-8 Versión Impresa

ISSN 1514-2590 Versión Electrónica

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

ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Registro Propiedad Intelectual 77383

**Dirección postal:** CC 296 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

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

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

### **Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA**

Si tiene acceso a INTERNET, puede recuperar la revista electrónicamente y en forma gratuita accediendo a la página en la Web

[www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html](http://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](mailto:analecta@fcv.unlp.edu.ar)

### **Revisión de estilo: Per. Eleonora Rolleri**

#### **Diseño**

Prof.Dr. Nestor Oscar Stanchi

#### **Diseño de Tapa**

Andrea López Osornio (DCV)

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX

([www.latindex.unam.mx](http://www.latindex.unam.mx)),

Ulrich's International Periodicals Directory

([www.ulrichsweb.com](http://www.ulrichsweb.com))

Zoological Records

([www.biosis.org.uk/products\\_services/zrss.html](http://www.biosis.org.uk/products_services/zrss.html))

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

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

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

**Citación de la versión electrónica:** La citación de los artículos aparecidos en la versión electrónica de ANALECTA VETERINARIA (VE) debería seguirse según el siguiente ejemplo:

Costa E.F. y col. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por Hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta vet* (VE) 1998; 18,1/2: 7-13 (7 pantallas). Recuperable de [www.fcv.unlp.edu.ar](http://www.fcv.unlp.edu.ar)

**Citación de la versión CD-ROM:** La citación de los artículos aparecidos en la versión en CD-ROM de ANALECTA VETERINARIA (CD-ROM) debería seguirse según el siguiente ejemplo:

Tittarelli C.M. y col. Efecto de las lluvias sobre la composición mineral de gramíneas y *Lotus glaber mill* del partido de Magdalena. *Analecta vet* (CD-ROM) 2001; 21, 1: 54-57 (4 pantallas).

### **Impresión**

#### **ANALECTA**

**Pronunciación:** «a-n&l-'ek-t&

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



**Foto de tapa:** Facultad de Veterinaria (clase de anatomía patológica). Principios de siglo XX.

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

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

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

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

Impreso en papel libre de ácido

Printed in acid-free paper

Impreso en Argentina

Printed in Argentina



**Artículos de Investigación  
Research articles**

- PRODUCCION DE ENSILADO DE PESCADO EN BAJA ESCALA PARA USO DE EMPREN-  
DIMIENTOS ARTESANALES.** Fish silage for small producers.  
J Copes, K Pellicer, G del Hoyo, N García Romero. **5-8**
- PHYSIOLOGICAL VARIATIONS OF SERUM ELECTROLYTES (Na, K, Ca, P, Mg, Cu) IN  
FARM-HOUSED *Caiman latirostris* AND *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae).**  
Variaciones fisiológicas de electrolitos séricos (Na, K, Ca, P, Mg, Cu) en *Caiman latirostris*  
y *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae) alojados en criaderos.  
JA Coppo, NB Mussart, NN Barboza, SA Fioranelli, GA Koza, WS Prado. **9-15**

**Comunicaciones breves  
Short communications**

- ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA PRODUCIDA POR *Clostridium piliforme* EN RA-  
TONES N:NHI(S)-nu TRANSPLANTADOS CON LA LÍNEA TUMORAL A 549.** Study of the  
interference produced by *Clostridium piliforme* in nih(s)nu in Mice Transplanted with the  
Tumor Line A549.  
M Ayala, S Milocco, G Principi, J Laborde, M Carriquiriborde, P Cagliada, C Carbone **16-18**
- RINOSCOPIA EN CANINOS.** Canine Rhinoscopy.  
AN Aprea, AL Giordano, HA Baschar, E Bonzo, A Massone. **19-21**
- ATRESIA DE LA VENA PORTA EN UN CANINO. REPORTE DE UN CASO.** Vascular Portal  
Atresia.  
MG Allende, W Acosta, HA Baschar, A Massone, ML Diez, AN del Amo. **22-27**

**Revisiones  
Review**

- ADMINISTRACIÓN TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS: UNA ALTERNATIVA TERAPÉU-  
TICA.** Transdermal Drug Administration: a Therapeutical Alternative.  
NF Villarino, MF Landoni. **28-37**
- FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y CONTROL DE LOS CICLOS ESTRALES EN LA GATA  
DOMÉSTICA.** Reproductive Physiology and Contraception in Queen.  
F Giménez, MC Stornelli, CA Savignone, CM Tittarelli, RL de la Sota, MA Stornelli. **38-43**

**Artículos de Investigación**  
**Research articles**

**VARIACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA SEGÚN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE MICROSOMAS HEPÁTICOS DE AVES.** Lipid Peroxidation Variation According To Fatty Acids Composition Of Hepatic Microsomes Obtained From Poultry Species.  
MC Lozano, B Iglesias, P Leaden, M Marmunti, A Palacios, V Piergiacomi **5-10**

**ALTERACIONES OXIDATIVAS Y DAÑO EN EL ADN EN BOVINOS CON HIPOCUPROSIS.** Oxidative damage and DNA damage in cattle with hypocuprosis.  
Picco SJ, Fazzio LE, Rosa D, Pintos ME<sup>4</sup>, Furnus CC, Dulout FN<sup>†</sup>, Mattioli GA. **11-17**

**ESTUDIO RETROSPECTIVO EN NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS CANINAS: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.** Retrospective Study On Canine Melanocytic Tumors: Epidemiological Aspects.  
Cuitiño MC, Massone AR, Idiart JR. **18-24**

**Comunicaciones breves**  
**Short communications**

**OTOENDOSCOPIAS EN CANINOS Primera Etapa.** Otoendoscopy in dogs.  
Aprea A, Giordano A, Baschar H, Broglia G, Bonzo E **25-28**

**Revisiones**  
**Review**

**FERTILIDAD Y SUPERVIVENCIA DEL SEMEN CANINO CRIOPRESERVADO.** Fertility and survival of canine semen criopreservation.  
MA Stornelli, RL de la Sota **29-38**

**INDUCCIÓN DE CICLOS ESTRALES EN LA PERRA: ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA.** Oestrus induction in the bitch a review  
Stornelli MC, Gimenez F, Tittarelli CM, Savignone CA, de la Sota RL, Stornelli MA **39-45**

## VARIACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA SEGÚN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE MICROSOMAS HEPÁTICOS DE AVES

MC Lozano<sup>1</sup>, B Iglesias<sup>2</sup>, P Leaden<sup>2</sup>, M Marmunti<sup>2</sup>,  
A Palacios<sup>2</sup>, V Piergiacomi<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Becaria JICA. Departamento de Farmacia,  
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

<sup>2</sup>Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata,

<sup>3</sup>Profesional de Apoyo, Cat. Principal, Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia de Buenos Aires (CIC)

**RESUMEN:** En este trabajo se estudió la composición de ácidos grasos de microsomas hepáticos de pato, codorniz y pollo y se analizó su comportamiento durante la peroxidación lipídica. La composición de ácidos grasos varió entre las diferentes especies, los microsomas de pato presentaron mayor contenido de ácidos grasos polinosaturados, principalmente ácidos araquidónico (C20:4 n6) y docosahexahenóico (C22:6 n3), mientras que en codornices y pollos el contenido de ácido palmitoléico (C16:1 n7) y ácido oléico (C18:1 n9) fue significativamente mayor. Se incubaron microsomas hepáticos de las diferentes especies en un sistema no enzimático en presencia de ascorbato-Fe<sup>2+</sup>, solo los microsomas obtenidos de hígado de pato mostraron un incremento en la quimioluminiscencia (emisión lumínica), mientras que el análisis de la composición de ácidos grasos permitió observar correlativamente una disminución significativa de los ácidos grasos polinosaturados. Los resultados muestran una estrecha relación entre la composición microsomal de ácidos grasos (porcentaje de ácidos grasos polinosaturados) y los valores de quimioluminiscencia obtenidos durante la lipoperoxidación in vitro. De las muestras evaluadas solo los microsomas de pato resultan sensibles a la lipoperoxidación, a diferencia de los de pollos y codornices. Estos resultados son similares con los de otros trabajos en los que se informa que las diferentes especies aviares poseen una variada susceptibilidad a tóxicos que tienen la habilidad de generar radicales libres (por ejemplo, la aflatoxina B1).

**PALABRAS CLAVE:** Peroxidación lipídica, Microsomas, Ácidos grasos, Aves, Aflatoxina B1

## LIPID PEROXIDATION VARIATION ACCORDING TO FATTY ACIDS COMPOSITION OF HEPATIC MICROSOMES OBTAINED FROM POULTRY SPECIES

**ABSTRACT:** Studies were done to analyze the fatty acid composition and sensitivity to lipid peroxidation of hepatic microsomes from duck, quail and chicken. Fatty acid profiles differed among species. Duck microsomes had significantly higher content of polyunsaturated fatty acids, especially arachidate (C20:4 n6) and docosahexahenoate (C22:6 n3). Palmitoleate (C16:1 n7) and oleate (C18:1 n9) was significantly higher in quails and ducks. Lipid peroxidation were induced with ascorbate-Fe<sup>2+</sup> and determined by the increase in light emission through chemiluminescence. Only duck membranes were successfully peroxidized. Moreover, duck microsomes decreased its polyunsaturated fatty acids content after lipid peroxidation. The results indicate a close relationship between tissue sensitivity to lipid peroxidation in vitro and polyunsaturated fatty acid concentration. Duck microsomes were very sensitivity to lipid peroxidation in contrast to chicken and quail microsomes. This coincides with the wide in vivo susceptibility reported for substances that have the ability of originating free radicals (for example aflatoxine B1).

**KEY WORDS:** Lipid peroxidation, Microsomes, Fatty acids, poultry, aflatoxine B1

Fecha de recepción: 05/11/05

Fecha de aprobación: 02/02/07

**Dirección para correspondencia:** V Piergiacomi, Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, CC 296 (B1900AVW) Argentina. Tel/Fax: +54-221-4257980

**E-mail:** vpier@fcv.unlp.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

La degeneración oxidativa de los ácidos grasos insaturados presentes en las membranas biológicas puede iniciarse por la presencia de radicales libres y posteriormente continuar con una reacción en cadena que conduce a peroxidación lipídica (1). Aunque la reducción biológica de oxígeno molecular es la principal vía para el desarrollo de radicales libres, éstos pueden también formarse durante el metabolismo de químicos carcinogénicos (2). Recientemente ha sido confirmada la capacidad de la aflatoxina B1 para generar este tipo de reacciones (3). La aflatoxina B1 es una micotoxina fuertemente hepatotóxica producida por los hongos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Estos hongos pueden contaminar alimentos de consumo animal y bajo condiciones ambientales apropiadas producir la mencionada toxina (4). Las aves son especies con una variada susceptibilidad a la aflatoxina B1. Los patos y pavos son altamente susceptibles, los pollos particularmente resistentes y las codornices presentan una susceptibilidad intermedia (5). Es probable que además de la activación metabólica de la aflatoxina B1 (6) existan otros factores que expliquen esta diversa susceptibilidad. Se sabe que la cantidad de ácidos grasos polinosaturados de cadena larga presentes en las membranas biológicas de diferentes especies pueden variar, lo cual las haría más o menos susceptibles a la peroxidación (7). Posiblemente existen diferencias en la peroxidación y perfil de ácidos grasos de membranas biológicas entre diversas especies de aves, lo que haría que la susceptibilidad a agentes prooxidantes, como la aflatoxina B1, varíe *in vivo*. El propósito de este estudio es establecer potenciales diferencias entre aves (patos, codornices y pollos) en la composición de ácidos grasos de membranas microsomales hepáticas, así como la sensibilidad de estas fracciones a la lipoperoxidación *in vitro* iniciada por la adición de ascorbato en presencia de oxígeno e hierro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de microsomas

Se seleccionaron tres aves adultas de cada una de las siguientes especies: pollo de engorde (*Gallus domesticus*), codorniz japonesa (*Coturnix japonica*) y pato (*Cairina moschata*). Luego de sacrificar los animales, por dislocación cervical, se remueven los hígados, se pesan y se cortan en pequeños trozos, se lavan con solución 0,15 M NaCl. La homogeneización se realiza con solución 0,25 M sacarosa, 0,01M Tris HCl pH 7,4. Este procedimiento se lleva a cabo con un homogeneizador Potter Elvehjem. Estos homogeneizados se centrifugan a 3000 rpm 10 min, obteniéndose un *pellet* que contendrá células rotas, núcleos y un sobrenadante que posteriormente se centrifuga a 13.500 rpm 10 min. Se obtiene un *pellet* de

mitocondrias y un sobrenadante postmitocondrial que se aplica a columnas de Sepharosa 4B (buffer de elusión Tris HCl 0,01 M, pH 7,4) para separar material particulado (microsomas) de la fracción soluble (citosol). Las operaciones se realizan a 4 °C.

### Determinación de proteínas

Se determinan según el método descripto por Lowry y col.(10)

### Peroxidación de microsomas

La peroxidación de las membranas se realiza en un sistema *in vitro*, no enzimático a 37 °C con buffer fosfato 0,01M pH 7,4, ascorbato 0,4 mM, volumen final 2 ml, se utilizan microsomas control a los que no se les agrega ascorbato. La emisión lumínica se determina durante 180 minutos. La quimioluminiscencia se mide cada 10 minutos y es registrada como cuentas por minuto (cpm) en un contador de centelleo líquido Packard 1900 TR.

### Separación de lípidos de membrana

Los lípidos de las diferentes muestras se extraen por el método de Folch (cloroformo metanol 2:1 v/v) (11) con BHT 0,01 % como antioxidante.

Interesterificación y análisis del contenido de ácidos grasos por cromatografía gaseosa computarizada

Los ácidos grasos se transmetilan con F<sub>3</sub>B en metanol a 65 °C por 3 h. Los ésteres de ácidos grasos se analizan en un cromatógrafo de gas (Shimadzu Kyoto, Japón) equipado con una columna (1.80m x 4 mm i.d.) GP 10 % DEGS-PS on 80/100 Supelcoport. Nitrógeno se usa como gas carrier. Las temperaturas del inyector y el detector son mantenidas a 250 °C, la temperatura de la columna a 200 °C. Los picos obtenidos se comparan con los tiempos de retención de los standard. El índice de instauración (UI) fue calculado de acuerdo a:  $UI = \sum (\text{porcentaje de ácido graso})^2$  (número de dobles enlaces).

### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados a través de la prueba *t*-Student para determinar diferencias significativas entre las fracciones microsomales peroxidadas y las no peroxidadas. Igualmente fue desarrollado un ANOVA para reconocer la presencia de diferencias significativas en el perfil de ácidos grasos entre especies.

## RESULTADOS

### Composición de ácidos grasos de microsomas no peroxidados

En los microsomas hepáticos no sometidos a peroxidación *in vitro* de las tres especies de

aves evaluadas, existe una proporción similar de ácidos grasos saturados (42 - 47 %) y de no saturados (53 -56 %) (Tabla 1). Sin embargo, si se analiza el grupo de los ácidos grasos no saturados, puede observarse que el pato posee mayor porcentaje de ácidos polienólicos, mientras que el pollo y la codorniz tienen mayormente ácidos monoenólicos. Así, las membranas microsomales hepáticas de los patos presentan una proporción significativamente mayor de ácidos grasos polinosaturados, en especial C20:4 n6 y C22:6 n3 con respecto a las de codornices y pollos (Figura 1). Por lo tanto el UI de los lípidos de las membranas microsomales de patos es superior en un 34 y 41 % en relación con el de codornices y pollos respectivamente, diferencia con significancia estadística (Figura 2). Como se mencionó otra diferencia significativa observada se aprecia en el porcentaje de ácido mono-insaturados palmitoléico (C16:1 n7) y oléico (C18:1 n9), que fue mayor en las membranas microsomales de codorniz y pollo en relación con las de pato (Figura 3).

### Composición de ácidos grasos en microsomas peroxidados

Una vez sometidos a peroxidación *in vitro* los microsomas hepáticos de pato, se observó que la proporción de ácidos grasos polinosaturados con respecto al control de la misma especie disminuyó en un 54 %. Esta variación significativa ocurrió particularmente por una reducción del 38 y 73 % en la proporción de los ácidos oléico (18:1 n9) y araquidónico (20:4 n6), respectivamente. Así mismo en esta especie, el UI disminuyó un 39 % en los microsomas de los animales sometidos a peroxidación con respecto a los microsomas control (Tabla 1). En las muestras evaluadas de pollos y codornices no se observaron diferencias significativas en la proporción de ácidos grasos entre los microsomas control y los que fueron peroxidados.

### Quimioluminiscencia

La diferencia en la peroxidación de las membranas microsomales de pato fue estadísticamente significativa al comparar las muestras control y las incubadas en presencia de ascorbato. La emisión luminica fue 3,5 veces superior en los microsomas peroxidados de los patos, mientras que en los de codornices y pollos no se presentaron variaciones importantes en la quimioluminiscencia entre las muestras control y las peroxidadas (Figura 4).

## DISCUSIÓN

Esta investigación evaluó la susceptibilidad a la peroxidación lipídica presente en las membranas microsomales hepáticas de pato, codorniz y pollo; así como el perfil de ácidos grasos de estas fracciones y su variación debida a la peroxidación

inducida por ascorbato y Fe<sup>++</sup>.

A pesar de que la composición de ácidos grasos insaturados de los microsomas hepáticos control de las aves evaluadas en este estudio fue similar, se observaron diferencias en el contenido de los ácidos grasos polinosaturados entre especies. Los patos presentaron 2 y 2,8 veces mayor contenido de estos ácidos que pollos y codornices, respectivamente. Esto obedece a la presencia de un mayor contenido de ácido araquidónico (C20:4 n6) y docosahexanoico (C22:6 n3) en las membranas microsomales de los patos. A pesar de no ser regla general (10), algunos estudios han demostrado que el grado de insaturaciones presentes en los fosfolípidos de membrana determina el nivel de lipoperoxidación de las mismas (11). Los resultados de la presente investigación respaldan esta hipótesis ya que un contenido significativamente mayor de ácidos grasos polinosaturados presente en las membranas microsomales hepáticas de patos, en relación con codornices y pollos, está acompañado por una mayor emisión luminica de los microsomas control con respecto a los sometidos a peroxidación. En concordancia con estos hallazgos, en los microsomas de pollo y codorniz, se observa un mayor contenido de ácidos monoinsaturados, menos susceptibles de ser peroxidados.

Adicionalmente, se observa una disminución significativa en el contenido de ácidos grasos polinosaturados de los microsomas peroxidados con respecto a los control, lo cual se relaciona directamente con la lipoperoxidación observada en esta especie. Hallazgos similares han sido reportados por Gutierrez *et al.* (12) quienes también demuestran una disminución en el contenido de C20:4 n6 y C22:6 n3 en membranas hepáticas de pato peroxidadas, con respecto a las no peroxidadas.

En las membranas biológicas de diferentes especies de aves se ha reportado un alto porcentaje en el contenido de C18:1 n9 (12,13), igualmente predominante en los microsomas hepáticos aquí evaluados. Sin embargo, existe un contenido significativamente menor de este ácido graso en los microsomas de patos. La presencia predominante de este ácido graso mono-insaturado en las fracciones hepáticas de codornices y pollos puede contribuir con la ausencia de lipoperoxidación registrada en los microsomas de estas especies, situación opuesta a lo ocurrido con los patos.

Las especies reactivas de oxígeno con capacidad de inducir la lipoperoxidación, son en su mayoría originadas a partir de la reducción de oxígeno molecular (14), sin embargo, durante el metabolismo de ciertos xenobióticos, pueden originarse estos productos (15). Por lo tanto, los resultados de esta investigación podrían reflejar la acción de sustancias tóxicas con capacidad de provocar estrés oxidativo.



Tabla 1. Composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas hepáticos de pato, pollo y codorniz.

Ácidos grasos	Pato		Pollo		Codorniz	
	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado	Control	Peroxidado
C16:0	27,29±1,26	30,93±2,11	32,30±0,69	31,94±1,88	28,37±1,47	28,07±2,07
C16:1 n7	2,23±0,3	1,65±1,21	6,03±1,28	5,98±0,86	5,07±1,19	5,08±0,72
C18:0	19,56±2,25	24,44±5,35	13,83±1,28	14,67±2,00	14,02±2,62	15,18±3,43
C18:1 n9	26,05±1,96	31,48±2,45	36,30±1,16	38,35±3,66	43,09±4,19	43,81±5,05
C18:2 n6	8,01±0,94	5,00±1,09*	6,22±0,94	5,52±1,62	5,3±1,43	5,29±0,64
C18:3 n3	0,35±0,18	0,63±0,32	0,57±0,29	0,28±0,33	0,20±0,28	0,14±0,15
C20:4 n6	11,66±1,97	3,17±1,39*	2,39±1,06	2,39±0,32	1,90±0,17	1,43±0,23
C22:6 n3	4,86±0,62	2,7±1,89	2,35±1,34	0,87±0,62	0,72±0,35	0,87±0,39
Saturados	46,85±2,87	55,36±4,85	46,13±1,41	46,62±3,86	42,39±3,70	43,25±5,44
Monocilénicos	28,28±2,02	33,13±3,49	42,34±2,17	44,32±4,49	48,16±3,67	48,88±5,62
Polinsaturados	24,88±1,82	11,5±1,72*	11,53±1,41	9,06±2,72	8,12±1,99	7,74±0,29
Total de no saturados	53,16±2,87	44,63±4,86	53,87±1,41	53,39±3,86	56,28±5,57	56,63±5,6
Saturados/No saturados	0,89±0,09	1,27±0,23	0,86±0,05	0,88±0,14	0,77±0,15	0,78±0,17
UI	121,15±9,28	73,91±10,12*	80,16±5,40	70,99±6,72	71,29±9,2	70,87±4,79

Los datos muestran el porcentaje del contenido total de ácidos grasos, expresados como el promedio ± D.S. de 3 individuos. Las diferencias significativas entre el grupo control y el peroxidado de cada una de las especies estudiadas se indica por \* (P<0.05).

Se ha reconocido que la aflatoxina B1, toxina ante la cual las especies presentan una variada susceptibilidad *in vivo*, es capaz de ocasionar la formación de lipoperóxidos (3, 16, 17). En esta investigación se observa que los microsomas hepáticos de pato, especie altamente sensible a la aflatoxina B1, tienen una mayor tendencia a ser lipoperoxidados en relación con los de pollo y codorniz, especies con mayor resistencia a la mencionada toxina.

Es posible que el diferente perfil de ácidos grasos de las especies y su capacidad de ser peroxidados sea un elemento clave en determinar la susceptibilidad a sustancias tóxicas que, como la aflatoxina B1, tienen la capacidad de generar estrés oxidativo. En futuras investigaciones, deberían ser evaluados otros mecanismos de protección contra radicales libres presentes en

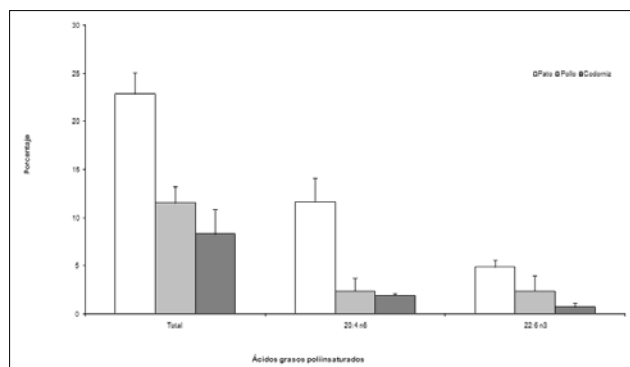
diferentes especies de aves que puedan estar contribuyendo con la variada susceptibilidad a la lipoperoxidación. Igualmente, podrían emplearse reconocidas sustancias tóxicas generadoras de radicales libres para inducir la lipoperoxidación de membranas y de esta manera elucidar con mayor certeza el mecanismo de acción de este tipo de químicos.

## AGRADECIMIENTOS

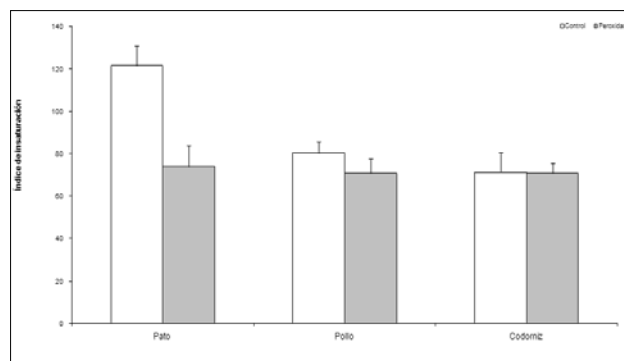
Este trabajo fue parcialmente financiado por la Agencia Internacional de Cooperación del Japón (JICA).

## BIBLIOGRAFÍA

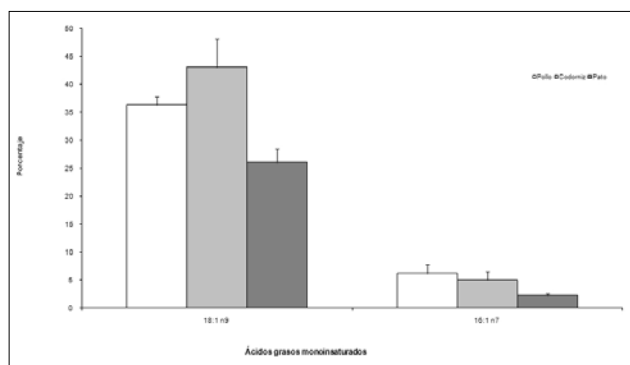
1. Minoti G, Aust SD. Redox cycling iron and lipid peroxidation. *Lipids*. 1992; 27: 219-226.



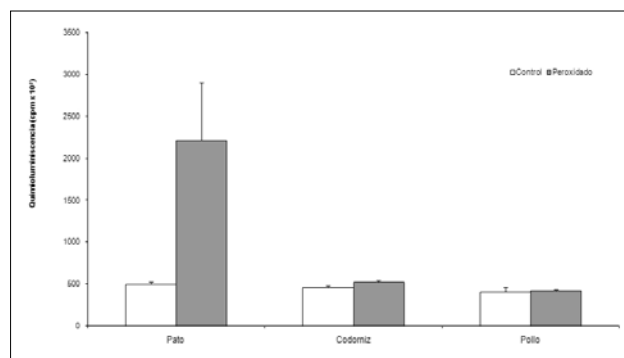
**Figura 1.** Composición de ácidos grasos poliinsaturados de microsomas hepáticos control de diferentes aves. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.S. de tres individuos. Las diferencias estadísticamente significativas entre las aves están indicadas por diferentes letras ( $P < 0.05$ ).



**Figura 2.** Índice de insaturación (UI) de los lípidos de membranas microsomales hepáticas peroxidadas y no peroxidadas de diferentes aves. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.S. de tres individuos. Las diferencias estadísticamente significativas entre las membranas control y las peroxidadas se indican por \* y las presentes entre los microsomas control de pato, pollo y codorniz se indican por letras diferentes ( $P < 0,05$ ).



**Figura 3.** Composición de ácidos grasos monoinsaturados de microsomas hepáticos control de diferentes aves. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.S. de tres individuos. Las diferencias estadísticamente significativas entre las aves están indicadas por diferentes letras ( $P < 0.05$ ).



**Figura 4.** Peroxidación lipídica de microsomas hepáticos de diferentes aves. La quimioluminiscencia fue determinada durante un período de 180 minutos y registrada como cuentas por minuto (cpm) cada 10 minutos. La suma del total de quimioluminiscencia fue usada para calcular cpm/mg de proteína. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  D.S. de tres individuos. Las diferencias estadísticamente significativas entre el control y los peroxidados están indicadas por \* ( $P < 0,05$ ).

2. Pitot H, Dragan Y. Chemical carcinogenesis. En: Cassarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons, Ed. Klaassen C.D. Mc Graw Hill. USA. 2001; p 241-319.

3. Towner RA, Qian SY, Kadiiska MB, Mason RP. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. Free Radical Biol Med. 2003; 35:1330-1340.

4. Hussein SH, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology. 2001;167:101-134.

5. Leeson S, Diaz GJ, Summers JD. Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins.. University Books, Guelph, Ontario. 1995; p 249-280.

6. Guengerich FP, Johnson WW, Shimada T, Ueng YF, Yamazaki H, Langouet S. Activation and detoxication of aflatoxin B1. Mutat Res. 1998; 402:121-128.

7. Gutiérrez AM, Reboredo GR, Arcemis CJ, Catalá A. Non enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria isolated from liver and heart of pigeon and rat. Int J Biochem Cell Biol. 2000; 32:79-79.

8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Fandall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
9. Folch J, Lees N, Sloane Stanley GA. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226:497-509.
10. Rosa D, Catalá A. Fatty acids profiles and non enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from bovine liver, kidney, lung and heart. *Arch Physiol Biochem.* 1998; 106:33-37.
11. Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry.* 1994; 33:4449-4453.
12. Gutiérrez AM, Reboredo GR, Catalá A. Fatty acids profiles and lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from liver, heart and brain of *Cairina moschata*. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34:605-612.
13. Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Ledo F, Gredilla R, Barja G. Herat fatty acid unsaturation and lipid peroxidation and aging rate are lower in the canary and parakeet than in the mouse. *Age Clin Exp Res.* 1999; 11:44-49.
14. Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1362:116-127.
15. Josephy PD. *Molecular Toxicology.* Oxford University Press. New York. 1997; p 336.
16. Shen HM, Ong CN, Shi CY. Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B<sub>1</sub>-induced cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicology.* 1995; 99:115-

## ALTERACIONES OXIDATIVAS Y DAÑO EN EL ADN EN BOVINOS CON HIPOCUPROSIS

Picco SJ<sup>1</sup>, Fazzio LE<sup>2</sup>, Rosa D<sup>3</sup>, Pintos ME<sup>4</sup>, Furnus CC<sup>1</sup>,  
Dulout FN<sup>1†</sup>, Mattioli GA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA);

<sup>2</sup>Cátedra de Clínica de Grandes Animales; <sup>3</sup>Cátedra de Fisiología;

<sup>4</sup>Laboratorio Central de Análisis Clínicos.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

**RESUMEN:** La hipocuprosis bovina es una de las principales enfermedades nutricionales que afectan al ganado en pastoreo. Observaciones preliminares realizadas en bovinos hipocuprosos sugieren que el daño en la molécula de ADN podría ser una de las primeras consecuencias de la enfermedad. Dicho efecto podría verse relacionado con una disminución de la capacidad orgánica antioxidante. El presente trabajo pretende establecer la existencia y precocidad de aparición del daño en el ADN (medido mediante el empleo del ensayo cometa), y su vinculación con la capacidad orgánica antioxidante, valorada a través de la actividad Cu/Zn-superoxido dismutasa y a través del índice de peroxidación (IP) y composición de ácidos grasos de eritrocitos Cu-deficientes. Los resultados obtenidos demuestran un alto grado de asociación entre cupremia y daño en el ADN, concomitantes con un incremento en el porcentaje de ácidos grasos saturados en glóbulos rojos, indicando una alteración oxidativa. La misma no sería causada por la Cu/Zn-Superoxido dismutasa dada la lentitud en su afectación. En conclusión, la deficiencia de Cu provoca la producción precoz de daño en la molécula de ADN, participando probablemente en la génesis de dicho daño la alteración de la capacidad orgánica antioxidante, la cual no estaría directamente relacionada con la actividad SOD.

**PALABRAS CLAVES:** alteraciones oxidativas; daño en el ADN; hipocuprosis bovina

## OXIDATIVE DAMAGE AND DNA DAMAGE IN CATTLE WITH HYPOCUPROSIS

**ABSTRACT:** Hypocuprosis is the most widespread mineral deficiency affecting grazing cattle. Preliminary reports suggest that DNA damage is one of the most precocious consequences of copper deficiency. This effect might be related to a decrease in the organic antioxidant capacity. The present study was carried out to establish the existence and speed of DNA damage measured by the comet assay. Besides, its relation to the organic antioxidant capacity (measured by the activity of Cu/Zn-superoxide dismutase), the peroxidative index and fatty acid composition of erythrocytes were investigated. The results showed a high correlation between cupremia and DNA damage, with an increase in the saturated fatty acid composition of erythrocytes, suggesting the oxidative origin of the damage. However, the activity of Cu/Zn superoxide dismutase may not directly related to oxidative damage because a low diminishing. In conclusion, copper deficiency give rise to a precocious DNA damage, related to an alteration in the antioxidant capacity, which was not directly associated to a SOD activity.

**PALABRAS CLAVES:** oxidatives alterations; DNA damage; bovine hypocuprosis.

Fecha de recepción: 11/07/06

Fecha de aprobación: 02/02/07

**Dirección para correspondencia:** Sebastián J. Picco, Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA). C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

**E-mail:** spicco@fcv.unlp.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

La hipocuprosis bovina es una de las principales enfermedades nutricionales que afectan al ganado en pastoreo en Argentina y en el mundo. Por su alta incidencia es considerada la segunda deficiencia mineral en importancia a nivel mundial (1). En Argentina ha sido reportada entre otras en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Chaco, Formosa y Entre Ríos (2), pero es sin dudas en la cuenca deprimida del Río Salado (Provincia de Buenos Aires) donde adquiere mayor importancia, afectando normalmente a más del 50% de los bovinos adultos criados en pastoreo y hasta el 70% de los terneros (3).

Dentro del organismo el cobre (Cu) se halla asociado a enzimas, las cuales están involucradas en numerosos procesos biológicos vinculados con el crecimiento y desarrollo, reproducción y con la respuesta inmune (3, 4). Durante la deficiencia se produce la alteración del funcionamiento de estas enzimas (también denominadas cuproenzimas), fenómeno que se vincula directamente con la aparición de los signos clínicos y subclínicos de la enfermedad, entre los cuales los más comunes son la despigmentación del pelo, anemia, fracturas espontáneas, degeneración miocárdica, hipomielinización de la medula espinal, menor performance reproductiva, alteraciones inmunológicas y menores ganancias de peso (2, 5).

Una de las consecuencias recientemente reportadas y estudiadas es la producción de daño en el ADN durante la deficiencia de cobre. Dichos trabajos incluyen desde observaciones realizadas en cultivos de células deprivadas de Cu, hasta ensayos en animales de laboratorio e incluso en animales bajo condiciones de deficiencia natural (6, 7, 8, 9, 10, 11). El principal argumento utilizado para justificar este fenómeno ha sido la potencial alteración de las defensas antioxidantes naturales, producto de una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes mayores [como la Cu/Zn-superoxido dismutasa (Cu/Zn-SOD)] y de enzimas antioxidantes menores [ceruloplasmina (Cp)], concomitantes con un efecto prooxidante derivado de la alteración de la función de la enzima de la cadena respiratoria citocromo c-oxidasa (CCO) (12). Dicho argumento ha sido ratificado en numerosas ocasiones por el hallazgo de disminuciones en la actividad de las citadas enzimas, así como por la observación de lesiones oxidativas reportadas en diferentes trabajos (12,13,14,15,16).

Observaciones preliminares realizadas en bovinos en pastoreo durante el desarrollo de la deficiencia de Cu sugieren que el daño en la molécula de ADN podría ser una de las primeras consecuencias de la enfermedad (10), la cual se presentaría con antelación a la aparición de los signos clínicos y productivos de la enfermedad. Por otra parte, existen evidencias de que dicho

efecto podría verse relacionado con una disminución de la capacidad orgánica antioxidante durante el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es establecer la existencia de daño en el ADN en bovinos Cu-deficientes, la precocidad de aparición de dicha alteración y su vinculación con la capacidad orgánica antioxidante, valorada a través de la actividad Cu/Zn-superoxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) y a través del índice de peroxidación (IP) y composición de ácidos grasos de eritrocitos Cu-deficientes.

## MATERIALES Y METODOS

Para establecer la asociación existente entre daño en el ADN y la deficiencia de Cu, así como su posible origen se realizaron tres tipos de ensayos: a) ensayo A: Determinación de daño en la molécula de ADN y asociación con niveles de cupremia. b) ensayo B: determinación de la actividad de la enzima Cu/Zn-superoxido dismutasa durante el desarrollo de la carencia y c) ensayo C: Determinación de alteraciones oxidativas.

*Establecimiento y animales:* para el desarrollo de los diferentes ensayos se utilizaron bovinos de rodeo general (ensayo A) y el rodeo de bovinos de carne de la Estación Experimental "Chascomus" (Gobierno de la Provincia de Buenos Aires) (ensayos B y C). En este último caso, se seleccionaran al azar 60 terneros, los que se dividieron en:

Lote A: integrado por 30 animales identificados con doble caravana, que se utilizaron para el estudio de las consecuencias de la enfermedad (grupo de estudio) y Lote B (grupo control): integrado por los restantes 30 animales, los cuales se identificaron con doble caravana y se los suplemento regularmente con sales de Cu por vía parenteral (1 mg de Cu-Ca EDTA por kpv).

*Muestras:* En todos los casos se obtuvieron muestras de sangre por punción yugular, las que se recolectaron en tubos previamente heparinizados o tratados con EDTA según la determinación a realizar. En el caso del ensayo B los muestreos se realizaron a partir de los 3 meses de edad y hasta el destete (7 meses) cada 45 días.

### Diseño experimental

Ensayo A: muestras de sangre de 304 animales pertenecientes a diferentes establecimientos ganaderos (n= 10) fueron utilizadas para establecer la concentración plasmática de Cu (cupremia) y el nivel de daño en el ADN mediante el empleo de la electroforesis en gel de células aisladas (ensayo cometa, versión alcalina).

Ensayo B: en 10 animales de cada lote se realizó la determinación de actividad Cu/Zn-SOD cada 45 días, así como la concentración plasmática de Cu.

Ensayo C: se obtuvieron muestras de san-

gre de 10 animales pertenecientes al lote A y 10 del lote B. Dichas muestras se utilizaron para determinar la frecuencia de células con daño en el ADN, el índice de peroxidación eritrocitaria y la composición de ácidos grasos eritrocitaria.

#### **Determinación de cobre en plasma:**

La sangre fue centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm hasta la obtención de plasma. Una alícuota de plasma homogeneizada (1 ml) se desproteinizó en cantidades iguales con ácido tricloroacético al 10 % (peso/volumen). La muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y en el sobrenadante se midió la concentración de Cu en plasma por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), empleando la técnica descrita por Pipper y Higgins (17) en un equipo modelo GBC 902, con llama de aire y acetileno, tipo oxidativa y a 324.7 nm de longitud de onda. Se preparó una curva de calibración de tres puntos (25, 50 y 100 µg/dl), empleando una mezcla de agua desionizada y ácido tricloroacético al 10% en partes iguales como blanco y diluyente de los estándares.

#### **Determinación de la actividad Superóxido dismutasa eritrocitaria (SODe):**

Se tomaron muestras de sangre utilizando Na<sub>2</sub>EDTA como anticoagulante. Una alícuota de 0,5 ml. fue centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm, el plasma y la porción superior de los elementos formes fueron retirados. El pellet de glóbulos rojos (GR) remanentes fue lavado 4 veces con 3 ml de una solución de NaCl al 0,9 %, centrifugando por 10 minutos a 3000 rpm luego de cada lavado. Los GR lavados fueron lisados mediante el agregado de agua desionizada helada. El lisado de GR fue diluido 50 veces con buffer fosfato (pH 7; 0,01 mol/l) y la actividad de la enzima fue medido usando un Kit comercial (RAN-SOD, by RANDOX Laboratories). Los resultados fueron expresados en unidades internacionales por mililitro (UI/ml).

#### **Determinación de quimioluminiscencia (QL) en glóbulos rojos:**

La muestra de sangre fue centrifugada por 10 minutos a 1000 g y a 4 °C. El plasma y la porción superior de elementos formes fueron descartados. Los GR remanentes fueron lavados 3 veces en una solución salina bufferada (PBS 5mM pH 7,4; 150 mM NaCl). El estudio se realizó mediante un sistema *in vitro*, dependiendo de t-butyl hidroperóxido (tBH) (8 mM), en buffer 0,05 M fosfato pH 7,4 a 37 °C. De cada muestra se midió hemoglobina y se estandarizó al 1,5 %. El proceso fue cuantificado por emisión lumínica (18) en un contador de centelleo líquido Packard 1900 TR. La quimioluminiscencia fue determinada durante 60 minutos y cuantificada en cuentas

por minuto (cpm) cada 5 minutos. En todos los casos se realizó en forma simultánea un blanco sin tBH que fue considerado como nativo de cada una de las muestras.

**Determinación de la composición de ácidos grasos de glóbulos rojos:** Los lípidos de las membranas tanto nativas como peroxidadas en las distintas condiciones experimentales se extrajeron por el método de Folch y col. (19), con BHT al 0,01 % como antioxidante. Los ácidos grasos de las membranas se transmetilaron con trifluoruro de boro al 10% en metanol a 60 °C durante una hora y los esteres metílicos se analizaron en un cromatógrafo gaseoso GC-14 (Shimadzu). Los picos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de estándares de ácidos grasos.

#### **Determinación de daño en el ADN en leucocitos mediante el "ensayo cometa":**

La determinación del daño en el ADN en leucocitos se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto por Picco (20) con pequeñas modificaciones. Una alícuota de 15 ml de cada muestra de sangre se separó inmediatamente después de la extracción y se almacenó en completa oscuridad y a 4 °C hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el Laboratorio los 15 ml de sangre se mezclaron con 75 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5 %, y se sembraron en un portaobjetos cubierto con agarosa de punto de fusión normal al 0,5 %. Se realizaron dos preparados por donante. Las células se lisaron con solución detergente (EDTA 100 mM, ClNa 2,5 M, Tris 10 mM, Triton X-100 al 1 % y DMSO al 10%) durante al menos 1 hora y se almacenaron hasta la electroforesis. Antes de la electroforesis, los preparados se equilibraron en solución alcalina (EDTA 1mM, OHNa 300 mM, pH>13) durante 20 minutos para la desespiralización del ADN. La electroforesis se realizó durante 30 minutos a 25 V y 300 mA. Inmediatamente después, los preparados se neutralizaron mediante tres lavados con buffer Tris pH 7,5 cada 5 minutos y agua destilada.

Los preparados se colorearon con una solución de SYBR Green I® (Molecular Probes) 1 / 1000 y se analizaron con un microscopio Olympus BX 40 provisto de lámpara de mercurio de alta presión de 100 W (USHIO USH 102 D). Se utilizó una cámara Sony CCD para capturar las imágenes y estas se guardaron y analizaron utilizando el software Image Pro Plus®. Las células se clasificaron en primera instancia como normales (con núcleo redondeado) o anormales (con algún grado de migración de ADN del núcleo). En un segundo paso, las células anormales se clasificaron en diferentes grados del 1 al 5. Finalmente el Índice de daño en el ADN se calculó aplicado el modelo descrito por Collins (21), donde la ausencia de

daño se expresa como 0, siendo 400 el máximo nivel de daño posible.

#### **Análisis de los resultados:**

Los resultados del ensayo A se evaluaron mediante el análisis de regresión y correlación, mientras que la comparación entre rangos de cupremia se realizó mediante el análisis de la varianza. Los resultados del ensayo B se evaluaron mediante un Análisis de Muestras Repetidas dentro del General Lineal Model del paquete estadístico SPSS 10.0. Se empleó un ANOVA Factorial Mixto o split-plot, utilizando al grupo de origen (GS y GNS) como Factor Inter-sujeto y al tiempo como Factor Intra-sujeto, representando los muestreos los niveles de este factor. Las diferencias entre medias dentro de los factores se establecieron por Comparaciones Múltiples. Los resultados del ensayo C se evaluaron mediante el análisis de varianza. En todos los casos se exigió una significación estadística del 5 % ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

Ensayo A: Los resultados obtenidos al estudiar la relación existente entre cupremia y daño en el ADN en leucocitos de sangre periférica se presentan en la Tabla 1. En ella puede observarse que valores bajos de cupremia se corresponden con los máximos niveles de daño en el ADN.

El análisis de regresión y correlación reveló la existencia de una fuerte asociación, de tipo lineal (invertida) entre ambas variables ( $y = 0,0003x^3 - 0,0317x^2 + 0,7711x + 63,103$ ;  $R^2: 0,9014$ ;  $p < 0,01$ ). El análisis estadístico realizado para comparar los valores de daño en el ADN obtenidos en cada rango de cupremia, permitió establecer la existencia de 3 niveles de daño en el ADN, correspondientes a cupremias menores a 30

Tabla 1. Rangos de cupremia e índice de daño en el ADN en leucocitos de bovinos con diferentes niveles de cupremia.

<b>Rango de cupremia (<math>\mu\text{g/dl}</math>)</b>	<b>N</b>	<b>Índice de daño</b>
1-10	9	67,3 ( $\pm 14,21$ ) a
11-20	93	68,7 ( $\pm 17,40$ ) a
21-30	71	68,1 ( $\pm 17,33$ ) a
31-40	46	58,9 ( $\pm 10,23$ ) b
41-50	28	57,4 ( $\pm 12,40$ ) b
51-60	17	55,9 ( $\pm 10,85$ ) b
61-70	22	45,9 ( $\pm 16,16$ ) bc
70-80	18	51,7 ( $\pm 14,26$ ) bc

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre rangos de cupremia ( $p < 0,05$ ).

$\mu\text{g/dl}$  de Cu en plasma (máximo nivel de daño), cupremias entre 30 y 60  $\mu\text{g/dl}$  (nivel intermedio) y cupremias mayores a 60  $\mu\text{g/dl}$  (mínimo nivel de daño).

Ensayo B: La tabla 2 muestra los resultados obtenidos al evaluar el comportamiento de la actividad Cu/Zn-SOD durante el desarrollo de la carencia y la evolución de los niveles de cupremia. Como puede observarse, la disminución de las cupremias se acompañó de una disminución en la actividad de dicha enzima, pero dicha disminución solo fue significativa al final del ensayo, luego de tres meses de carencia y siendo los animales hipocuprémicos severos por al menos dos meses.

Ensayo C: Los resultados obtenidos al analizar el índice de peroxidación y la composición de ácidos grasos en glóbulos rojos de animales Cu-deficientes se presentan en las tablas 3 y 4. Previo a la realización de dichas determinaciones, el análisis de células con daño en el ADN realizado en las mismas muestras reveló un mayor número de células con daño en los animales hipocuprémicos con relación a los controles (frecuencia de daño: 0,196 vs 0,144;  $X^2 = 5,13$ ;  $p = 0,023$ ). El índice de peroxidación observado en glóbulos rojos de animales con y sin deficiencia (medido cada 5 minutos y hasta los 25 minutos), no arrojó diferencias significativas, solo pudiéndose observar una tendencia a un mayor nivel de peroxidación a los 5 minutos de iniciado el ensayo en los animales con deficiencia de Cu (85 vs 100 cpm en normo e hipocuprémicos respectivamente). La posterior determinación de la composición de ácidos grasos de membrana tampoco arrojó diferencias estadísticas significativas entre animales normales e hipocuprémicos cuando se analizó a cada ácido graso en particular. Sin embargo, el porcentaje de ácidos grasos saturados totales fue estadísticamente superior en los animales hipocuprémicos (72,9 % vs 64,1% en hipo y normocuprémicos respectivamente;  $p < 0,05$ ), al igual que la relación ácidos grasos saturados/insaturados ( $p < 0,05$ ). Mientras que el porcentaje de ácidos grasos insaturados totales fue mayor en los animales normocuprémicos (35,9 vs 27,06 %;  $p < 0,05$ ).

## **DISCUSION**

Los resultados obtenidos en el presente ensayo permiten observar en primer lugar una estrecha asociación entre el estatus de cobre de los animales (valorado según la cupremia) y los niveles de daño en el ADN. Dicha asociación, que se presenta como una correlación inversa entre cupremia y daño en el ADN, muestra que pequeñas variaciones en el estatus de Cu producen inmediatas consecuencias en la integridad del ADN, pero además permiten reconocer con claridad tres estratos de cupremia en los

Tabla 2. Concentración promedio de Cu ( $\pm$  ES) en plasma y actividad superóxido dismutasa eritrocitaria (SODe) en los grupos suplementado (A) y no suplementado (B).

	1° muestreo	2° muestreo	3° muestreo
<b>GRUPO A</b> <b>plasma (<math>\mu\text{g}/\text{dl}</math>)</b>	48 ( $\pm 12,24$ )a A	88 ( $\pm 4,40$ )a B	75 ( $\pm 4,9$ )a AB
<b>GRUPO B</b> <b>plasma (<math>\mu\text{g}/\text{dl}</math>)</b>	37 ( $\pm 8$ )a AB	51 ( $\pm 18,22$ )b A	30 ( $\pm 4,2$ )b AB
<b>GRUPO A</b> <b>SODe (UI/ml)</b>	376 ( $\pm 29,8$ )a A	358 ( $\pm 19,9$ )a A	383 ( $\pm 14,4$ )a A
<b>GRUPO B</b> <b>SODe (UI/ml)</b>	397 ( $\pm 30,9$ )a A	381 ( $\pm 30,6$ )a A	338 ( $\pm 11,3$ )b A

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre muestreos ( $p < 0.05$ ).

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (%) en los eritrocitos de animales suplementados y no suplementados.

Ácido graso	Suplementados	No suplementados	Significación estadística
C16:0	36,79 ( $\pm 2,47$ )	37,87 ( $\pm 1,47$ )	0,79
C16:1	7,73 ( $\pm 2,61$ )	5,03 ( $\pm 0,56$ )	0,43
C18:0	27,13 ( $\pm 4,43$ )	35,06 ( $\pm 0,85$ )	0,19
C18:1	20,24 ( $\pm 1,54$ )	15,81 ( $\pm 1,41$ )	0,09
C18:2	4,13 ( $\pm 0,74$ )	3,70 ( $\pm 0,98$ )	0,74
C20:4	3,30 ( $\pm 1,69$ )	2,52 ( $\pm 0,21$ )	0,71
Saturados	64,11 ( $\pm 2,43$ )	72,93 ( $\pm 2,17$ )	0,049
Mono saturados	27,98 ( $\pm 3,69$ )	20,84 ( $\pm 1,20$ )	0,173
Poli insaturados	7,91 ( $\pm 2,12$ )	6,22 ( $\pm 1,16$ )	0,56
Total insaturados	35,89 ( $\pm 2,43$ )	27,06 ( $\pm 2,17$ )	0,049
Saturados/insaturados	1,83 ( $\pm 0,20$ )	2,75 ( $\pm 0,32$ )	0,049

cuales el nivel de daño en el ADN es alto (hasta 30  $\mu\text{g}/\text{dl}$  de Cu en plasma), intermedio (30-60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) y bajo (más de 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ). Permitiendo por lo tanto, clasificar el estatus de Cu de los animales solo conociendo los valores de daño en el ADN. Esta última agrupación de las cupremias es coincidente con aquella propuesta por Suttle ya en 1983 (22) y reafirmada por Underwood y Suttle en 1999 (4) (Hipopupremia severa= menor a 30  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; hipocupremia moderada= entre 30 y 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ; normocupremia= mayor a 60  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), con la salvedad que dichos autores sugieren la posibilidad de aparición de consecuencias de la enfermedad cuando el animal es hipocupremico severo, mientras que según nuestros resultados, considerando al daño en el ADN como una consecuencia de la enfermedad, las alteraciones provocadas por la deficiencia aparecen ni bien el animal deja de ser normocuprémico.

En cuanto al origen de dicho daño, hemos especulado recientemente con el posible origen

Tabla 4. Índice de peroxidación (cpm) en eritrocitos pertenecientes a animales de los grupos suplementado y no suplementados.

		Tiempo (minutos)					
		0	5	10	15	20	25
<b>Grupo A</b>	3,4	<b>85</b>	80	67	55	47	
<b>Grupo B</b>	5,5	<b>100</b>	90	71	57	47	

oxidativo, producto de las disminuciones en la actividad de enzimas antioxidantes Cu-dependientes (Cu/Zn-SOD y Cp) y Cu-influenciables (GSHpx y catalasas), concomitantes con un incremento potencial de la producción de especies activas del oxígeno en la cadena respiratoria por disfunción de la CCO. Dicho esquema de producción de daño oxidativo, desarrollado ampliamente por Strain (12) para explicar otras



consecuencias de la enfermedad, y apoyado a partir de la información proveniente de ensayos aislados o parciales, realizados mayoritariamente *in vitro* (2,13,14,15,16,20) permiten suponer que el dicho modelo de daño oxidativo podría explicar el origen del daño en el ADN observado en bovinos en condiciones naturales. Sin embargo, y en contraposición con dicho modelo en el cual se le asigna un rol preponderante a la disminución de la actividad de la Cu/Zn-SOD, las evidencias obtenidas en este trabajo sugieren que se requieren varios meses de carencia (y por ende de valores subnormales de cupremia) para que se afecte significativamente la actividad SOD, lo cual es coincidente con las observaciones realizadas previamente por Boyne y Arthur (23), para los cuales la actividad de dicha enzima solo se afectó tras un prolongado periodo de carencia y con valores correspondientes a hipocupremia severa. Pese a ello, los resultados obtenidos al evaluar la composición de ácidos grasos en las células de animales con y sin un adecuado estatus de Cu sugieren la alteración del estatus antioxidante a favor de una condición prooxidante durante la carencia de Cu. En dicho ensayo, concomitante con un incremento en la frecuencia de leucocitos con daño en el ADN, la composición de ácidos grasos en eritrocitos reveló un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados en aquellos animales Cu-deficientes. Simultáneamente, se observó una mayor tendencia a la peroxidación de ácidos grasos, lo cual es interesante ya que dada la composición de ácidos grasos mayoritariamente saturados, era esperable una menor capacidad de peroxidación, apoyando nuevamente la teoría del estrés oxidativo durante la deficiencia. En tal sentido, dado que la enzima CCO presenta un umbral de protección mucho menor, con afectación de su funcionamiento en bovinos cuando estos dejan de ser normocuprémicos, es probable que presente un rol central en la génesis de dicho daño (20). Otra enzima que podría tener un rol clave es la Cp, la cual al igual que la CCO presenta una inmediata disminución en su actividad cuando disminuye la cupremia. De hecho, la actividad antioxidante ferroxidasa de dicha enzima posee una correlación mayor al 93% con la concentración plasmática de Cu (24). Estudios realizados en individuos aceruloplasminémicos demuestran que la falta de actividad Cp conduce a una acumulación intracelular de hierro y a un incremento de alteraciones oxidativas (20). Por otra parte, estudios realizados por este grupo demostraron que durante la deficiencia de Cu se produce un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas (10) y que en la génesis de dicho daño intervienen no solo una lesión en el ADN, sino también una incapacidad relativa para reparar dicho daño, específicamente una incapacidad de reparación del ADN en el período

G<sub>2</sub> del ciclo celular (25). Dicha observación sugiere un segundo factor posible para explicar la aparición de alteraciones en la molécula de ADN, pero de ninguna manera puede excluir la teoría del daño oxidativo, ya que Según Guetens y col. (26) el principal efecto pernicioso del incremento de la concentración de EAO es ejercido sobre las proteínas, agregando que las enzimas de la reparación no se encuentran exentas. Concluyen además que el hecho de que normalmente puedan detectarse productos de la oxidación de bases nitrogenadas indicaría que en condiciones *in vivo*, dichas enzimas se hallan muy cerca de su capacidad máxima de respuesta.

Por lo tanto, la deficiencia de Cu en bovinos provoca la producción precoz de daño en la molécula de ADN, participando probablemente en la génesis de dicho daño la alteración de la capacidad orgánica antioxidante. Sin embargo futuros estudios deberán orientarse a establecer el origen mono o multifactorial del daño en el ADN, así como su impacto en la capacidad productiva, reproductiva e inmunológica durante la hipocuprosis bovina.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ramírez CE, Mattioli GA, Tittarelli CM, Giuliodori MJ, Yano H. Cattle hypocuprosis in Argentina Associated with periodically flooded soils. *Livestock Production Science* 55, pp: 47-52. 1998.
2. Fazzio LE. Caracterización de terneros de cría con hipocuprosis. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2006.
3. Mattioli GA. Caracterización de la hipocuprosis bovina en el Partido de Magdalena (Provincia de Buenos Aires). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 1998.
4. Underwood EJ, Suttle NF. The mineral nutrition of livestock. 3<sup>rd</sup> edition. CABI Publishing. 1999.
5. Tessman RK, Lakritz J, Tyler JW, Casteel SW, Williams JE, Dew RK. Sensitivity and specificity of serum copper determination for detection of copper deficiency in feeder calves. *J Am Vet Med Assoc* 218 (5): 756-60. 2001.
6. Pan Y, Loo G. Effect of copper deficiency on oxidative DNA damage in Jurkat T-lymphocytes. *Free Rad. Biol. & Med.* 28 : 824-30. 2000.
7. Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Modulation by dietary copper of aflatoxin B1-induced activity of DNA repair enzymes poly (ADP-ribose) polymerase beta and ADN ligase. *In Vivo* 10: 533-536, 1996.
8. Percival SS. Copper and immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (suppl), 1064s-1068s. 1998.
9. Picco SJ, De Luca JC, Mattioli G, Dulout FN. DNA damage induced by copper deficiency in cattle assessed by the comet assay. *Mutation Research* 498: 1-6, 2001.
10. Picco SJ, Mattioli GA, Fazzio LE, Rosa D, De Luca JC, Dulout FN. Association between copper plasma

- level and DNA damage in cattle. *Mutagenesis* 19 (6), 453-456, 2004.
11. Abba MC, De Luca JC, Mattioli G, Zaccardi A, Dulout FN. Clastogenic Effect of copper deficiency in cattle. *Mutation Research* 466. pp. 51-55. Abba, M.C., J.C. De Luca, G. Mattioli, E. Zaccardi, F.N. Dulout. 2000. Clastogenic Effect of copper deficiency in cattle. *Mutation Research* 466. pp. 51-55, 2000.
12. Strain JJ. Newer aspects of micronutrients in chronic disease: Copper. *Proceeding of the Nutrition Society*, 53: 583-598, 1994.
13. Prohaska JR. Biochemical change in copper deficiency. *J Nutr Biochem.* 1: 452-461. 1990.
14. Sukalsky KA, LaBerge TP, Johnson WT. In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. *Free. Radic. Biol. Med.* 22 : 835-842, 1997.
15. Cockel KA, Belonje B. The carbonyl content of specific plasma proteins is decreased by dietary copper deficiency in rats. *J Nutr.* 132: 2514-2518, 2002.
16. Hawk SN, Lanoue L, Keen CL, Kwik-Urbe CL, Rucker RB, Uriu-Adams JY. Copper-deficient rat embryos are characterised by low superoxide dismutase activity and elevated superoxide anions. *Biol. Reprod.* 68 : 896-903, 2003.
17. Piper HG, Higgings G. Estimation of trace metals in biological material by atomic absorption spectrophotometry, *Proc. Assoc. Clin. Biochem.* 7 190-195, 1967.
18. Rosa D, Catala A. Fatty acid profiles and non enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from bovine liver, kidney, lung and heart. *Archives of Physiology and Biochemistry* 1998, 106: 1-5, 1998.
19. Folch J, Lees N, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
20. Picco SJ. Consecuencias genotóxicas y clastogénicas en bovinos hipocupremicos [tesis doctoral] Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2004.
21. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Mol Biotech* 26: 249-261, 2004.
22. Suttle NF. The nutritional basis for trace element deficiencies in ruminant livestock. En *Trace elements in animals productions and veterinary practice.* Occ. publication N° 7 - British Society of Animal Production. Edit: Suttle, N. F., Gunn, R. G., Allen, W. M., Linklater, K. A. and Wiener G. 2.1: 19-25, 1983.
23. Boyne R, Arthur JR. Effects of molybdenum or iron induced copper deficiency on the viability and function of neutrophils from cattle. *Research in Veterinary Science* 41, 417-419, 1986.
24. Bingley JB, Anderson N. Clinically silent hypocuprosis and the effect of molybdenum loading on beef calves in Gippsland, Victoria. *Aust. J. Agric. Res.* 23, 885-904, 1972.
25. Picco SJ, Mattioli GA, Fazzio LE, Rosa DE, De Luca JC, Dulout FN. Effect of 3-aminobenzamide on lymphocytes of copper-deficient cattle. *Journal of Basic and Applied Genetics* XVI (1/2), 13-18, 2004.
26. Guetens G, De Boeck G, Highley M, van Oosterom AT, de Bruijn EA. Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 39: 331-457, 2002.

## ESTUDIO RETROSPECTIVO EN NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS CANINAS: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Cuitiño MC<sup>1</sup>, Massone AR, Idiart JR.

Instituto de Patología Dr. B. Epstein.  
Facultad de C. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

<sup>1</sup> Becaria SECyT, UNLP.

**Resumen:** Con el objetivo de presentar información epidemiológica sobre neoplasias melanocíticas (NM) caninas, se realizó un estudio de 78 casos de archivo. Se registraron aspectos tales como: raza, edad, sexo, localización de la neoplasia, tamaño, ulceración y pigmentación macroscópica, así como el diagnóstico histopatológico, el tipo celular predominante, el grado de pigmentación (de 0 a 4) y la cantidad de mitosis en 10 campos de mayor aumento. El diagnóstico histopatológico resultó en: 62,8% melanoma maligno, 32,1% melanocitoma y el 5,1% NM no clasificada. Los animales más afectados fueron mestizos (35,9%) y de las razas Ovejero Alemán (12,8%), Doberman (9,0%), Cocker Spaniel (6,4%) y Pequinés (5,1%). La edad promedio de presentación fue de 9,6 años. No se observó predilección por sexo. Los sitios más afectados fueron la piel (64,1%), la mucosa oral (32,1%) y el ojo (2,6%). Se observó asociación significativa entre NM de localización cutánea y diagnóstico de melanocitoma ( $p < 0,01$ ) y entre NM de localización oral y diagnóstico de melanoma maligno ( $p < 0,01$ ). El 33,3% de las NM presentó tipo celular mixto, el 30,8% epiteliode, el 29,5% fusiforme, el 3,8% globoso y el 2,6% redondo. La pigmentación microscópica se distribuyó uniformemente entre los grados 1 a 4, registrándose sólo 2 neoplasias amelanicas.

**Palabras clave:** caninos, neoplasias melanocíticas, epidemiología

## RETROSPECTIVE STUDY ON CANINE MELANOCYTIC TUMORS: EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS

**Abstract:** Clinical features and histopathological details from 78 file cases of canine melanocytic tumors (MT) were reviewed in order to present epidemiological data. The following characteristics were recorded: breed, age, sex, tumor location, size, ulceration, and macroscopic pigmentation as well as histopathological diagnosis, predominant cell type, degree of pigmentation (from 0 to 4), and number of mitotic figures per 10-high power fields. Diagnosis resulted in: 62.8% malignant melanoma, 32.1% melanocytoma, and 5.1% unclassified MT. Mixed breed dogs (35.9%) and German shepherd (12.8%), Doberman pinscher (9.0%), Cocker spaniel (6.4%), and Pekinese (5.1%) breeds were the most affected. The average age at presentation was 9.6 years. There was no gender predisposition. Sites commonly affected were the skin (64.1%), the oral mucosa (32.1%), and the eye (2.6%). There was significant correlation between cutaneous location and melanocytomas ( $p < 0.01$ ) as well as between oral location and malignant melanomas ( $p < 0.01$ ). Thirty three percent of MT had mixed cell type, 30.8% epithelioid, 29.5% spindle, 3.8% balloon, and 2.6% round cell type. Microscopic pigmentation was evenly distributed among degrees 1 to 4. Only 2 completely amelanotic tumors were observed.

**Key words:** canine, melanocytic tumors, epidemiology

Fecha de recepción: 21/07/06

Fecha de aprobación: 02/02/07

**Dirección para correspondencia:** MC Cuitiño, Instituto de Patología Dr. B. Epstein. C.C. 296, (B1900AVW) Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. La Plata, ARGENTINA.

**E-mail:** mccuitino@fcv.unlp.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

En el pasado, el término "melanoma" ha sido empleado de diferentes formas en los sistemas de nomenclatura de las neoplasias melanocíticas (NM) caninas. Algunos autores han aplicado el término "melanoma" a proliferaciones benignas y malignas, mientras que otros han restringido su uso sólo para referirse a proliferaciones malignas. Actualmente, de acuerdo con la descripción y clasificación propuesta por la OMS, las NM malignas (NMM) son denominadas melanomas y las NM benignas (NMB) melanocitomas (1, 2).

Las NM en caninos son relativamente comunes representando entre el 4 y el 7% del total de los tumores en general. Se presentan con mayor frecuencia en caninos mayores de 10 años de edad (rango de 1 a 17) (3, 4). La frecuencia de las NM es más alta en animales de piel y mucosas pigmentadas (3, 4, 5). No ha sido observada predisposición por sexo, aunque algunos autores afirman que, al igual que en humanos, la proporción de machos y hembras afectados es de 2-3:1 (3, 4, 6).

Los sitios más comúnmente afectados son, en orden decreciente, la mucosa oral, los labios, la piel (especialmente de los dedos) y, en menor medida, el ojo (3). Existen contradicciones al respecto, ya que otros autores afirman que el mayor porcentaje de estas neoplasias ocurre en la piel (2,7).

En la mucosa oral, las localizaciones más comunes son las encías, el paladar y los labios (incluyendo la unión mucocutánea) (3, 4, 10), mientras que en la piel lo son la cara (especialmente los párpados), el tronco y las extremidades (sobre todo los dedos y el lecho ungueal) (2, 3, 5, 10).

Llama la atención la relación entre el comportamiento de las NM y su localización; aquellas situadas en la mucosa oral y las uniones mucocutáneas suelen ser malignas en su mayoría (2, 3, 5, 8, 11), mientras que las situadas en el ojo y los párpados suelen presentar comportamiento benigno (a excepción de las de la conjuntiva) (7, 2, 12). Esto último también parece ocurrir en las NM cutáneas, constituyendo la excepción las de localización digital (lecho ungueal) (3, 5, 8, 9, 10).

El objetivo del presente trabajo es presentar información epidemiológica sobre neoplasias melanocíticas caninas a partir del análisis de casos de archivo y compararla con la comunicada por otros autores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo la búsqueda de todos los casos de neoplasias melanocíticas caninas ingresados al Instituto de Patología durante el periodo 1995-2005. Ochenta y seis casos fueron revisados por los autores aplicando la clasificación pro-

puesta por la OMS (1998), utilizando cortes histológicos coloreados con H&E y, en dos de los casos, con la coloración de Fontana Masson. El 95 % de las muestras provino de material de biopsias y el 5 % restante de necropsias. Setenta y ocho neoplasias fueron seleccionadas para su inclusión en el estudio de acuerdo con la disponibilidad de materiales, así como de información acerca de los aspectos siguientes: raza, edad, sexo, localización de la neoplasia primaria y metastásica (si la hubiere), tamaño (diámetro mayor, sólo de la masa primaria), ulceración (presencia o ausencia) y pigmentación macroscópica (presencia o ausencia). Durante la observación microscópica de los casos se registraron el diagnóstico histopatológico (melanoma, melanocitoma, NM no clasificada), el tipo celular predominante (epitelioide, fusiforme, mixto, globoso, redondo), el grado de pigmentación mediante una escala subjetiva de 0 a 4 (0 = pigmento no evidenciable, ausente, 1 = pigmento evidenciable mediante coloraciones especiales, 2 = escasa cantidad de pigmento presente sólo en algunas células, 3 = gran cantidad de pigmento presente sólo en algunas células y 4 = gran cantidad de pigmento presente en la mayor parte de las células) y la cantidad de mitosis en la observación de 10 campos de mayor aumento desde 0 hasta más de 3. Los datos fueron tabulados y se determinó la distribución de frecuencias para cada una de las variables analizadas. A fin de evaluar una posible asociación entre el diagnóstico histopatológico de la neoplasia y los eventos sexo, edad, localización anatómica, ulceración, grado de pigmentación y tipo celular predominante se utilizó la prueba de  $X^2$  y el test exacto de Fisher. Los resultados se consideraron significativos en un nivel del 5 % ( $p < 0,05$ ). Se utilizó el software Epi Info, versión 3.3.2.

## RESULTADOS

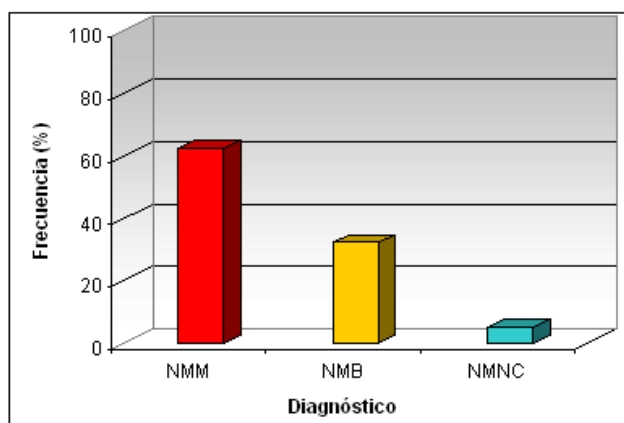
La frecuencia de neoplasias melanocíticas malignas (NMM), benignas (NMB) y no clasificadas (NMNC) se muestra en la figura I. Estas últimas corresponden a un grupo de NM que no pudo ser incluido en alguno de los anteriores mediante las técnicas convencionales.

La distribución de las NM de acuerdo con la raza se muestra en la figura II.

La edad promedio de presentación fue de 9,6 años (rango=17, mediana=9,5, moda=10). Cerca del 40% de los casos se presentó en animales de entre 8 y 10 años. Del total de los casos observados en animales menores de la edad promedio de presentación, sólo uno correspondió a un animal mestizo (2 años). Los demás ocurrieron en animales de razas definidas.

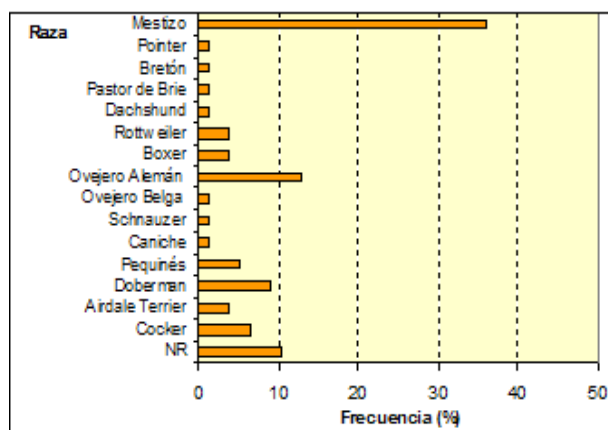
La distribución de las neoplasias NMM, NMB y NMNC de acuerdo con la edad se muestra en la figura III.

La distribución de las NMM, NMB y NMNC



**Figura I.** Frecuencia de neoplasias melanocíticas malignas (NMM), benignas (NMB) y no clasificadas (NMNC).

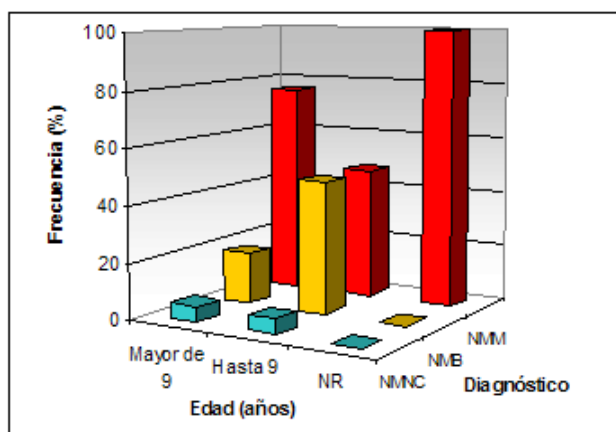
**Figure 1.** Frequency of malignant, benign and unclassified melanocytic tumors.



NR: raza no registrada

**Figura II.** Distribución de las neoplasias melanocíticas de acuerdo con la raza

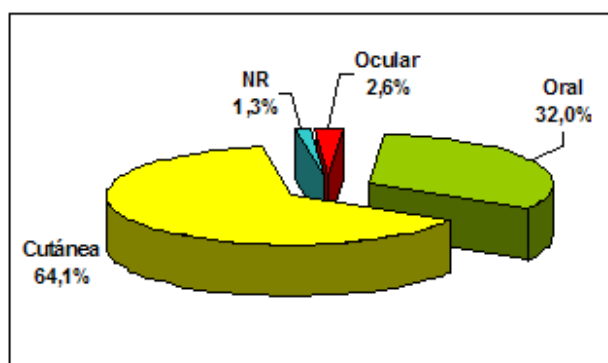
**Figure II.** Distribution of melanocytic tumors according to breed



NR: edad no registrada

**Figura III.** Distribución de las neoplasias melanocíticas malignas (NMM), benignas (NMB) y no clasificadas (NMNC) de acuerdo con la edad

**Figure III.** Distribution of malignant, benign, and unclassified melanocytic tumors according to age



NR: localización no registrada

**Figura IV.** Distribución de las neoplasias melanocíticas según la localización anatómica

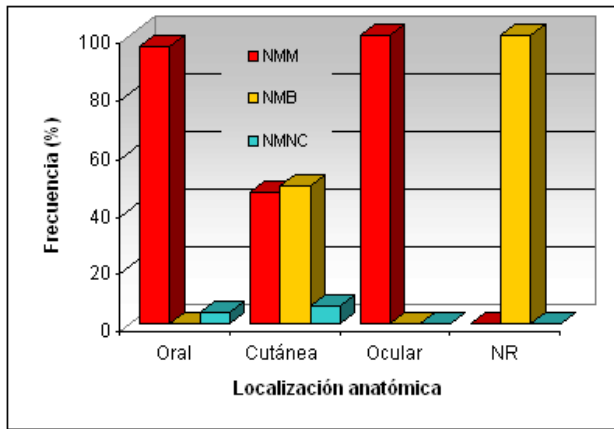
**Figure IV.** Distribution of melanocytic tumors according to location

**Tabla 1.** Distribución de las neoplasias melanocíticas malignas (NMM), benignas (NMB) y no clasificadas (NMNC) de acuerdo con el sexo

**Table 1.** Distribution of malignant, benign, and unclassified melanocytic tumors according to sex

Sexo	NMM		NMB		NMNC		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Hembras	23	46,9	14	56,0	3	75,0	40	51,3
Machos	26	53,1	9	36,0	1	25,0	36	46,1
NR	0	0,0	2	8,0	0	0,0	2	2,6
Total	49	100,0	25	100,0	4	100,0	78	100,0

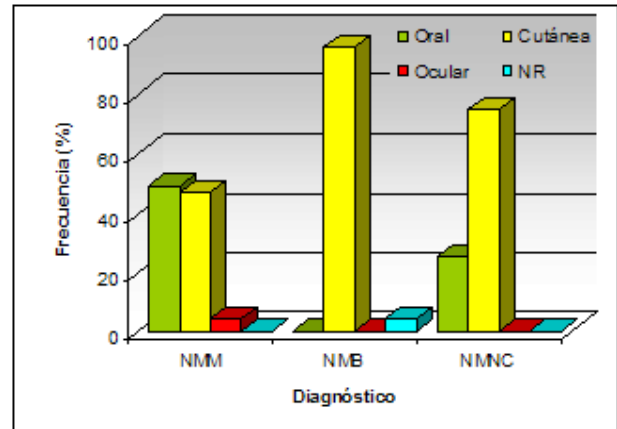
NR: sexo no registrado



NR: localización anatómica no registrada

**Figura V.** Distribución de las neoplasias melanocíticas malignas (NMM), benignas (NMB) y no clasificadas (NMNC) según su localización anatómica

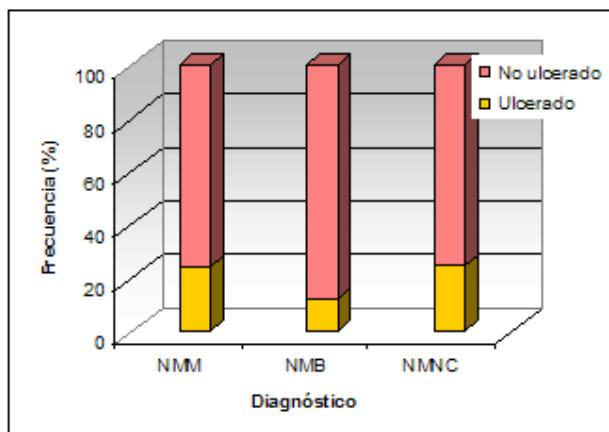
**Figure V.** Distribution of malignant, benign, and unclassified melanocytic tumors according to location



NR: localización anatómica no registrada

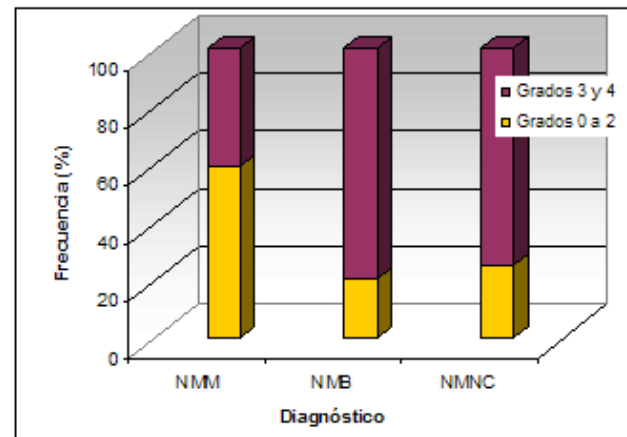
**Figura VI.** Frecuencia de localización anatómica de las neoplasias melanocíticas malignas (NMM), benignas (NMB) y no clasificadas (NMNC)

**Figure VI.** Frequency of location of malignant, benign, and unclassified melanocytic tumors



**Figura VII.** Frecuencia de ulceración en neoplasias melanocíticas malignas (NMM), benignas (NMB) y no clasificadas (NMNC)

**Figure VII.** Frequency of ulceration in malignant, benign, and unclassified melanocytic tumors



**Figura VIII.** Distribución del grado de pigmentación en neoplasias melanocíticas malignas (NMM), benignas (NMB) y no clasificadas (NMNC)

**Figure VIII.** Distribution of degree of pigmentation in malignant, benign, and unclassified melanocytic tumors

**Tabla 2.** Distribución del tipo celular predominante en neoplasias melanocíticas malignas (NMM), benignas (NMB) y no clasificadas (NMNC)

**Table 2.** Distribution of predominant cell type in malignant, benign, and unclassified melanocytic tumors

Tipo celular	NMM		NMB		NMNC		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Epitelioide	16	32,7	6	24,0	2	50,0	24	30,8
Fusiforme	10	20,4	12	48,0	1	25,0	23	29,5
Globoso	2	4,1	0	0,0	1	25,0	3	3,8
Redondo	2	4,1	0	0,0	0	0,0	2	2,6
Mixto	19	38,8	7	28,0	0	0,0	26	33,3
Total	49	100,0	25	100,0	4	100,0	78	100,0

**Tabla 3.** Mitosis cada 10 campos de mayor aumento (CMA) en neoplasias melanocíticas malignas (NMM), benignas (NMB) y no clasificadas (NMNC)**Table 3.** Mitosis per 10 high-power fields in malignant, benign, and unclassified melanocytic tumors

Mitosis/ 10CMA	NMM		NMB		NMNC		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>0</b>	10	20,4	21	84,0	1	25,0	32	41,0
<b>1</b>	5	10,2	4	16,0	1	25,0	10	12,8
<b>2</b>	7	14,3	0	0,0	2	50,0	9	11,6
<b>3 o más</b>	27	55,1	0	0,0	0	0,0	27	34,6
Total	49	100,0	25	100,0	4	100,0	78	100,0

de acuerdo con el sexo se muestra en la tabla 1.

Las neoplasias fueron macroscópicamente pigmentadas en el 51,0% (n=40) de los casos. El color varió desde negro hasta gris claro, con tonalidades pardo grisáceas intermedias.

El diámetro mayor de las NMM fue, en promedio, de 3,8 cm, con extremos de 0,5 y 15 cm, una moda de 4 cm y una mediana de 3 cm. En las NMB, el diámetro mayor fue de 2,81 cm en promedio, con extremos de 0,5 y 15 cm, con una moda de 2 cm y una mediana de 1,5 cm.

La distribución de las NM según la localización anatómica se expone en la figura IV.

Sólo en cuatro casos con diagnóstico de NMM se dispuso de información acerca de la presencia de metástasis. Los sitios preferentemente afectados fueron el pulmón y los linfonodos satélites y, en un caso, el hígado.

La distribución de las NMM, NMB y NMNC según su localización anatómica se muestra en la figura V.

Se observó asociación significativa entre NM de localización cutánea y diagnóstico de melanocitoma ( $p<0,01$ ), así como entre NM de localización oral y diagnóstico de melanoma ( $p<0,01$ ; OR=25).

El 26,0% (n=13) de las NM cutáneas se localizó en la región de la cabeza, afectando principalmente los párpados. El 42,0% (n=21) de las mismas se localizó en el tronco, con mayor frecuencia en el torax, el vientre y el periné. En cuanto a las extremidades (n=14; 28,0%), se observó predilección por los dedos (n=13; 92,9%). Una gran parte de los casos afectó a los dedos tercero y cuarto, preferentemente del miembro torácico. Del total de las NM cutáneas digitales, el 69,2% (n=9) estuvo representado por melanomas y el 30% (n=3) por melanocitomas. No se encontró asociación significativa entre localización cutánea digital y diagnóstico de melanoma ( $p>0,05$ ).

Los sitios más afectados por las NM orales fueron las encías, tanto maxilar como mandibular (n=9; 36%), el paladar (n=5; 20%) y los labios (n=4; 16%); los carrillos y la afección conjunta de

las encías, el paladar y los carrillos representaron el porcentaje restante.

Las NM de localización ocular (n=2) fueron diagnosticadas como melanomas, representando el 4% del total de los melanomas diagnosticados en el estudio (figuras V y VI). Ambas se encontraban localizadas en la membrana nictitante.

El 20,5 % (n=16) de las NM estudiadas presentó ulceración. La frecuencia de ulceración en NMM, NMB y NMNC se muestra en la figura VII. Cabe mencionar que en tres de los casos de melanoma (dos de ellos localizados en la piel del escroto y uno en la encía), la ulceración fue la única manifestación de la neoplasia. No se encontró asociación significativa entre la presencia de ulceración y el diagnóstico histopatológico ( $p>0,05$ ).

El 33,3% (n=26) de las NM estudiadas presentó tanto células epitelioides como fusiformes (tipo celular mixto), el 30,8% (n=24) epitelioides, el 29,5% (n=23) fusiformes, el 3,8% (n=3) globosas y el 2,6% (n=2) redondas. La distribución del tipo celular predominante en NMM, NMB y NMNC se muestra en la tabla 2. No se encontró asociación significativa entre el tipo celular predominante y las NMM ( $p>0,05$ ), aunque sí se observó asociación entre el tipo celular fusiforme y las NMB ( $p<0,05$ ; OR=3,51).

La pigmentación microscópica de las NM se encontró distribuida en forma relativamente uniforme entre los grados 1 a 4, registrándose sólo 2 neoplasias (2,6%) con ausencia total de melanina (grado 0). La distribución del grado de pigmentación en NMM, NMB y NMNC se muestra en la figura VIII. Se observó asociación significativa entre la presencia de grados 3 y 4 de pigmentación y melanocitomas y entre grados 0 a 2 y melanomas ( $p<0,01$ ; OR=5).

Del total de melanomas diagnosticados en este estudio, el 55,1% (n=27) presentó tres mitosis (o más de tres) observadas en 10 campos de mayor aumento. Asimismo, el 100,0% de los melanocitomas presentó entre 0 y 1 mitosis (tabla 3). Se observó asociación significativa entre la cantidad de mitosis en diez campos de mayor

aumento y el diagnóstico histopatológico en las NM estudiadas ( $p < 0,01$ ).

## DISCUSIÓN

Los hallazgos en la distribución de las NM de acuerdo con la raza son en parte coincidentes con los de la bibliografía; algunos autores han informado sobre una predisposición a la ocurrencia de melanomas orales en las razas Cocker Spaniel, Pequinés y Doberman, así como en animales mestizos (4). Existen controversias acerca de la representación de cada raza entre los autores (4, 2, 5, 6, 10).

Los datos acerca de la edad de presentación concuerdan con los de la bibliografía consultada (2, 3, 4, 5, 6, 10). Sobre el total de las NM observadas en animales de hasta 9 años, se diagnosticó el mismo porcentaje de melanocitomas y melanomas (47,4%;  $n=18$ ). En animales mayores de 9 años, el 76,3% ( $n=29$ ) fue maligno y el 18,4% restante ( $n=7$ ) benigno. Esta observación indicaría que los animales mayores de esta edad presentan un riesgo más elevado de padecer melanoma que los animales menores de la misma ( $p < 0,01$ ;  $OR=3,58$ ).

Al contrario de lo que sucede en medicina humana, y de lo observado en algunos estudios en medicina veterinaria, no se detectó predisposición por sexo ( $p > 0,05$ ) (3, 4, 6). El número de hembras afectadas ( $n=40$ ; 51,3%) fue ligeramente superior al de machos ( $n=36$ ; 46,1 %).

En lo que respecta a la localización de las NM estudiadas, la frecuencia de la misma y su asociación con el diagnóstico histopatológico coincide con lo comunicado por otros autores (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Del total de las NM cutáneas, el 48,0% ( $n=24$ ) de las mismas fue diagnosticado como melanocitoma, el 46,0% ( $n=23$ ) como melanoma y el 6,0% ( $n=3$ ) restante como NM no clasificada. A su vez, las NM de localización cutánea representaron el 96,0% ( $n=24$ ) del total de los melanocitomas diagnosticados en este estudio. Según estos hallazgos, las NM de localización cutánea serían más probablemente benignas y, a su vez, la casi totalidad de las NMB ocurriría en la piel ( $p < 0,01$ ). A pesar de que un gran porcentaje de NM observadas en la localización cutánea digital fue maligno ( $n=9$ ; 69,2%), no hubo diferencias significativas en esta localización ( $p > 0,05$ ). Del total de las NM orales, el 96,0% ( $n=24$ ) fue clasificado como maligno, mientras que el 4,0% restante no pudo ser clasificado. A su vez, las NM de localización oral representaron el 49,0% del total de los melanomas malignos diagnosticados en el estudio. Estos resultados permitirían inferir que las NM de localización oral serían malignas en la mayor parte de los casos ( $p < 0,01$ ;  $OR=25$ ).

Se coincide con los datos de la bibliografía en que la presencia de ulceración no estaría relacionada con el diagnóstico histopatológico en

animales ( $p > 0,05$ ) (3).

Los resultados obtenidos en cuanto a la distribución del tipo celular predominante en NMM, NMB y NMNC son similares a los comunicados por otros autores (4). En nuestra serie, el tipo celular fusiforme se asoció con las NMB ( $p < 0,05$ ;  $OR=3,51$ ). Según otros estudios, el tipo celular predominante carece de valor pronóstico en animales (3). Sin embargo, otros afirman que en NM caninas de la úvea anterior, el tipo celular fusiforme se asociaría con pronóstico favorable y los tipos epitelioides y mixto con un pronóstico desfavorable, debido a un elevado riesgo de metástasis (3).

Si bien el grado de melanización se considera en la bibliografía como un indicador de dudoso valor pronóstico (3), la frecuente observación en este estudio de la presencia de grados 3 y 4 de pigmentación en melanocitomas y, de grados 0 a 2 en melanomas, indicaría una posible relación entre dichas variables ( $p < 0,01$ ;  $OR=5$ ).

El hallazgo de 3 mitosis (o más de tres) observadas en 10 campos de mayor aumento se considera un indicador de malignidad en caninos (1). Los resultados obtenidos en los casos estudiados apoyarían esta afirmación ( $p < 0,01$ ).

La información aquí presentada correspondiente en su mayor parte a casos registrados en La Plata y alrededores concuerda, en general, con la comunicada por otros autores de diversas partes del mundo. La misma es un aporte al conocimiento acerca de la epidemiología de las NM en nuestro medio, teniendo en cuenta que no hemos encontrado publicaciones sobre el tema en la Argentina. Cabe mencionar que los resultados presentados deben ser interpretados como una estimación de los parámetros analizados, dados la naturaleza retrospectiva del estudio y su tamaño muestral.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Goldschmidt MH. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series. AFIP. Washington (USA), 1998; p. 38-40.
2. Wilcock B. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series. AFIP. Washington (USA), 1998; p.14-16, 18-19, 22-24.
3. Smith SH, Goldschmidt MH, McManus PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol* 2002; 39: 651-678.
4. Ramos-Vara JA. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet Pathol* 2002; 37: 597-608.
5. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. *Skin Diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis*. 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Science. Iowa (USA) 2005; p. 813-833.
6. Hernández SZ. Neoplasias orales en caninos: Des-



**M.C. Cuitiño y col.**

cripción epidemiológica de 73 casos. *InVet* 1999; 1: 61-66.

7. Roels S, Tilmant K, Ducatelle R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J Comp Pathol* 1999; 121:13-24.

8. Yager JA, Scott DW. The Skin and Appendages. En: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. *Pathology of Domestic Animals*. Vol 1, 4<sup>th</sup> Ed. Academic Press. California (USA), 1993; p. 719-721.

9. Koenig A. Expression of S100a, vimentin, NSE, and Melan A/MART-1 in seven canine melanoma cell lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. *Vet Pathol* 2001; 38: 427-435.

10. Goldschmidt MH, Hendrick MJ: Tumors of the Skin and Soft Tissues. En: Meuten DJ (ed): *Tumors in Domestic Animals*. 4<sup>th</sup> ed. Iowa State Press. Iowa (USA), 2002; p. 78-83.

11. Head KW. Tumors of the Alimentary Tract. En: Meuten DJ (ed): *Tumors in Domestic Animals*. 4<sup>th</sup> ed. Iowa State Press. Iowa (USA), 2002; p. 427-430.

12. Dubielzig RR. Tumors of the Eye. En: Meuten DJ (ed): *Tumors in Domestic Animals*. 4<sup>th</sup> ed. Iowa State Press. Iowa (USA), 2002; p. 744-746.

## OTOENDOSCOPIAS EN CANINOS Primera Etapa

Aprea A<sup>1</sup>, Giordano A<sup>1</sup>, Baschar H<sup>2</sup>, Broglia G<sup>2</sup>, Bonzo E<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Diagnóstico por Imágenes-Area Endoscopia;

<sup>2</sup>Hospital Escuela, Cátedra de Patología Médica. <sup>3</sup>Cátedra de Bioestadística  
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

**Resumen:** Se describen los hallazgos endoscópicos de los conductos auditivos externos en caninos sin enfermedad ótica aparente. El conducto era permeable en el 88 % de los casos, en ningún caso se hallaron parásitos y/o cuerpos extraños. La membrana timpánica estaba íntegra en el 76% de los casos y no visible en el 20 %.

**Palabras Clave:** oído- endoscopia- caninos

### Otoendoscopy in dogs

**Abstract:** Endoscopic finding of the ear canal are described in canine without apparent otic illness. The duct was permeable in 88% of the cases. There was not found parasites and/or strange bodies. The tympanic membrane was entire in 76 % of the cases and not visible in 20%.

**Key Words:** ear – endoscopy- canines

Fecha de recepción: 26/04/06

Fecha de aprobación: 18/11/06

---

**Dirección para correspondencia:** Adriana Aprea, Servicio de Diagnóstico por imágenes-Área endoscopia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296 (B1900AVW) La Plata. Argentina. **E-mail:** [aaprea@fcv.unlp.edu.ar](mailto:aaprea@fcv.unlp.edu.ar)

---

## INTRODUCCIÓN

Los problemas óticos en caninos son motivo frecuente de consulta en la clínica diaria. Se estima que entre el 15 y el 20 % de los pacientes caninos tienen alguna clase de enfermedad ótica con algunas variaciones vinculadas a la época del año en que fueron realizados los diferentes estudios (1,5).

El conducto auditivo externo canino tiene entre 5 a 10 cm de longitud y una luz de aproximadamente 4 y 5 mm. El conducto vertical tiene dirección ventral y ligeramente rostral antes de curvarse para formar un conducto horizontal más corto, que tiene dirección medial y forma la porción horizontal del conducto auditivo externo. Como el oído externo es elástico, es posible alinear el conducto auditivo en grado suficiente para proceder al examen otoscópico. La porción vertical y la mayor parte de la horizontal son cartilagosas, pero la más profunda es ósea. El conducto auditivo está cubierto por piel que contiene glándulas sebáceas y ceruminosas y folículos pilosos. Las ceruminosas son glándulas sudoríparas tubulares apócrinas modificadas. Las secreciones combinadas de las glándulas sebáceas y ceruminosas forman el cerumen que cumple la función de proteger al conducto auditivo externo al inmovilizar los objetos extraños y contribuye a mantener la membrana timpánica húmeda y flexible. El conducto auditivo externo está separado de la cavidad del oído medio por la membrana timpánica semitransparente. Esta consiste en un tabique membranoso, delgado y ligeramente opaco. Se ubica en un ángulo de 45 grados en relación con el eje central de la porción horizontal del conducto auditivo externo. Es delgada en el centro y más gruesa cerca de la periferia. La porción superior pequeña es la porción flácida y la porción inferior más grande es la porción tensa. A excepción de la porción flácida, la membrana es tensa y tiene una inserción firme al hueso circundante mediante el anillo fibrocartilaginoso. Este se inserta en el anillo óseo del meato acústico externo mediante tejido fibroso. El contorno del mango del martillo se suele visualizar a través de la membrana timpánica como estrías del martillo (4,10).

La otitis externa es la inflamación aguda o crónica del canal auditivo desde el pabellón hasta la membrana timpánica, de etiología multifactorial, lo que dificulta el diagnóstico y el tratamiento (4,9). Una posible complicación de la otitis externa es la perforación del tímpano.

La otitis media es la inflamación del oído medio incluyendo la membrana y la bulla timpánicas. Para el diagnóstico de las otitis medias es indispensable la visualización de la membrana timpánica, pero, la mayoría de las veces las características anatómicas del conducto auditivo externo, hacen imposible la visualización directa

y la endoscopia ótica es indispensable en estos casos (7,9).

El tratamiento de las otitis crónicas representa un gran desafío para el veterinario práctico debido al alto porcentaje de recidivas que se observan rutinariamente. El tratamiento sintomático de las otitis externas, en base a un examen superficial del oído, sin un examen adecuado y en profundidad del conducto auditivo externo (CAE), puede resolver algunos casos, pero generalmente las respuestas que se observan son temporales y parciales. Las claves para el tratamiento exitoso de esta enfermedad son: la intervención temprana, la correcta identificación de la causa y el empleo de una terapia específica y apropiada. El fracaso en la identificación y tratamiento de la causa primaria o predisponente es el motivo más común de otitis crónica recurrente y en muchos de los casos se debe a una visualización inapropiada del conducto auditivo externo y membrana timpánica (2,3,6,8,11).

La otoendoscopia es una técnica aún no implementada rutinariamente en nuestro medio.

El objetivo de la primera etapa de este trabajo es describir los hallazgos endoscópicos en oídos de caninos sin signos clínicos de enfermedad ótica. Esto permitirá posteriormente, identificar las causas primarias y predisponentes de las otitis, lo que redundará en la aplicación de terapéuticas específicas acordes a cada caso.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En esta primera etapa se realizaron 25 otoendoscopias bajo anestesia general a caninos que ingresaron al Servicio de Endoscopia del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP para otras prácticas. Se registraron los siguientes datos en planillas elaboradas para tal fin: reseña, antecedentes de otitis y/o enfermedades alérgicas, permeabilidad del conducto, presencia o no de secreciones y/o exudados, presencia de parásitos y/o cuerpos extraños, características de la pared y de la membrana timpánica, para poder caracterizar endoscópicamente el oído de perros sin enfermedad ótica. Se utilizó un fibro gastroscopio pediátrico, cuyo diámetro externo es de 5 mm (Olympus Gif N 30). Simultáneamente a cada paciente se le tomaron muestras del conducto auditivo externo con hisopo estéril para realizar tinción citológica (Tinción 15) y tinción de Gram.

Tabla 1- Antecedentes de otitis y/o alergias.  
Table 1- Otitis and/or allergy antecedents

Antecedentes	
Otitis	32 %
Alergias	17 %
Ninguno	51 %



Foto 1. Pared normal del conducto auditivo externo  
Photo 1. Normal view of the ear canal.

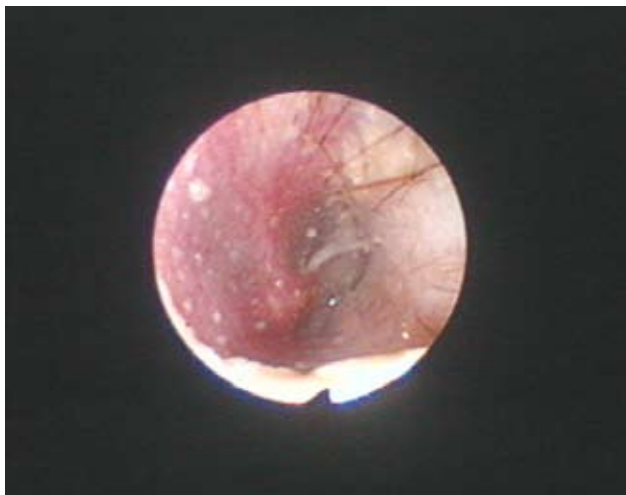


Foto 2. Eritema en pared del conducto auditivo  
Photo 2. Erythema in the ear canal

## RESULTADOS

Se realizaron 25 estudios durante el período mayo de 2004 a abril de 2005. Las edades de los caninos oscilaron entre 3 meses y 12 años. En 32% de los casos se registraron antecedentes de otitis (Tabla 1). La permeabilidad del conducto auditivo estaba conservada en el 88% de los caninos observados. Se observó secreción en el 92% de los pacientes. En ningún caso se encontraron cuerpos extraños o parásitos. En el 68 % la pared del conducto auditivo externo era normal (Foto 1), en el 16% había eritema (Foto 2), en el 12% estaba ulcerada, y un 4% no era visible. La membrana timpánica estaba íntegra en el 76% de los casos (Foto 3), no visible en el 20% y en un caso (4%) estaba perforada. En el 72% de los pacientes se realizó estudio citológico y tinción de Gram. En el 89% se observaron cocos Gram positivos. En el 45% se observó moderada cantidad de *Malassezia sp.*



Foto 3 . Vista endoscópica de la membrana timpánica.  
Photo 3. Endoscopic view of the tympanic membrane.

## DISCUSIÓN

La utilización de una técnica innovadora como la otoendoscopia nos permite, en la gran mayoría de los casos, visualizar claramente las estructuras del conducto auditivo externo y la membrana timpánica. Esto, juntamente con los hallazgos citológicos y de la tinción de Gram en animales sin patología ótica aparente, nos permite tener un patrón normal de comparación ante la presencia de enfermedades clínicas. En la mayoría de los animales el conducto auditivo fue permeable. Se observó la presencia de pelos y cerumen en las proximidades de la membrana timpánica. La secreción ceruminosa se observó frecuentemente. Los gérmenes comúnmente identificados fueron Gram positivos (microbiota normal) y *Malassezia sp.* En algunos animales que no presentaban signos clínicos se encontraron sin embargo anomalías en la pared del conducto y en la membrana timpánica.

## AGRADECIMIENTOS

Proyecto V/141 acreditado en el Programa de Incentivos de la Universidad Nacional de La Plata.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Angus JC y col. Breed variations in histopathologic features of chronic severe otitis externa in dogs: 80 cases (1995-2001). JAVMA 2002; 221:1000-1006
2. August JR. Otitis externa: A disease of multifactorial etiology. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1988;18:731-742
3. Flores Alés, A. Video otoscopia en el perro. www.aevedi.org
4. Gotthelf, Louis N. Factores que perpetúan la otitis externa. En: Gotthelf (ed) Enfermedades del oído de animales de compañía. Ed. Intermédica. Buenos Aires

**A. Aprea y col.**

(Argentina), 2001; pp 99-108

5. Grono, L.R. Otitis externa. In: Kirk, R.W (ed). Current Veterinary Therapy VII. WB Saunders Co, Philadelphia, 1980.

6. Jacobson LS. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. J S Afr Vet Assn 2002; 73:162-170

7. Little CJL, Lane JG. An evaluation of tympanometry, otoscopy and palpation for assessment of the canine tympanic membrane. Vet Rec 1989; 1245: 5-8.

8. Murphy KM. A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. Clin Techniques Small Anim Pract 2001; 16:236-241

9. Scott, D; Miller, W; Griffin, C. Diseases of Eyelids, claws, anal sacs and ear canals. En : Muller-Kirk (ed) Small Animal Dermatology WB Saunders Co, Philadelphia, 1995.

10. Smallwood JE, Spauling, KA. Anatomía radiológica del perro y el caballo. En: Thrall, DE (ed) Tratado de Diagnóstico Radiológico Veterinario. Ed. Inter Médica, Bs. As, 2001; pp 641

11. White PD. Medical management of chronic otitis in dogs. Comp Cont Edu 1999; 21(8) 716-728.

## FERTILIDAD Y SUPERVIVENCIA DEL SEMEN CANINO CRIOPRESERVADO

MA Stornelli, RL de la Sota

Instituto de Teriogenología  
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

**RESUMEN:** En la presente revisión se tratan los procedimientos de evaluación seminal, los aspectos más importantes de la criopreservación de semen en el perro y el alcance de la valoración *in vitro* de la calidad de semen al descongelado. Se realiza también la evaluación de los alcances de la inseminación artificial con semen criopreservado en esta especie.

**PALABRAS CLAVES:** Semen congelado-criopreservación-evaluación de semen- caninos

## FERTILITY AND SURVIVAL OF CANINE SEMEN CRIOPRESERVATION

**ABSTRACT:** Semen evaluation, criopreservation, and artificial insemination with frozen semen in canines are reviewed. Factors influencing the fertility of stored semen and methods used for improvement are discussed.

**KEY WORDS:** Frozen semen-criopreservation- semen evaluation-canine

Fecha de recepción: 16/11/05

Fecha de aprobación: 12/03/07

---

**Dirección para correspondencia:** M. Alejandra Stornelli, Instituto de Teriogenología. C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA. Tel: +54-221-4236663/4, ext. 457. Fax: +54-4257980.

**E-mail:** [astornel@fcv.unlp.edu.ar](mailto:astornel@fcv.unlp.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

El aumento del valor y las posibilidades de comercialización de los cachorros de pura raza así como el aumento de la importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el desarrollo e implementación de las biotecnologías reproductivas en esta especie.

La Inseminación Artificial (IA) ha beneficiado el mejoramiento genético en los perros de raza pura. El desarrollo de IA (la primera generación de biotecnologías reproductivas), junto con la criopreservación de semen ha hecho posible la distribución por el mundo de material genético a un bajo costo. Diversas metodologías de criopreservación de semen, se están aplicando cada vez con más frecuencia con el fin de establecer bancos de reserva genética para conservar las diferentes especies en el futuro (1). Las especies en vías de extinción son los principales impulsores y receptores de esta corriente (2).

La primera comunicación de IA en caninos fue realizada en 1887 por Lazzaro Spallanzani quien utilizó semen fresco (3, 4, 5). Sin embargo fue muchos años más tarde cuando este tópico se convirtió en foco de interés para la investigación. En 1956, Harrop (6) comunica que una de seis perras inseminadas con semen refrigerado después de seis días de almacenamiento resultó preñada. En 1954, Rowson (7) notifica la primera congelación de semen exitosa en caninos y más tarde en 1969, Seager (8) obtiene la primera preñez con semen congelado en perros. Desde la ocurrencia de estos eventos, el interés de los criadores caninos en la IA y la criopreservación de semen han aumentado en forma creciente. Es así que en el mundo, por aproximadamente 5 décadas, muchas camadas han nacido a partir de IA con semen fresco, refrigerado y congelado. Sin embargo las tasas de preñez obtenidas a partir de IA usando semen congelado son aún poco satisfactorias y esto ocurre en particular con las obtenidas bajo condiciones clínicas. En la clínica reproductiva diaria las variables asociadas al manejo del semen en la descongelación, a la técnica de IA implementada y a la detección del momento de mayor fertilidad están fuertemente influenciadas por el entrenamiento del operador actuante, a la infraestructura de la clínica en la que se realiza el procedimiento y al estado de salud y nutrición de los reproductores utilizados (9, 10, 11, 12, 13). Estos hechos se relacionan tanto con las particularidades de la fisiología reproductiva de la hembra como con la especial sensibilidad del semen canino a los procesos de criopreservación y la falta de desarrollo en este área. (12, 14). Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la habilidad para mantener la capacidad fecundante del semen

congelado en caninos y obtener así tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios.

Para que sea posible la interacción óvulo-espermatozoide y el comienzo de una nueva vida, un número suficiente de espermatozoides fértiles debe arribar a la ampolla para encontrarse con los oocitos y que ocurra así la secuencia de eventos necesarios para la fertilización (15, 16).

## EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL Y PREDICCIÓN DE LA CAPACIDAD FECUNDANTE

Existen una gran variedad de pruebas de laboratorio que han sido desarrolladas para evaluar la calidad del semen (integridad espermática y capacidad fecundante) usado para IA, y predecir así la capacidad fecundante del mismo. El uso de estas pruebas en forma combinada puede aumentar la exactitud en la estimación de la función espermática. Sin embargo, es imposible reemplazar las pruebas de campo, pues las pruebas *in vitro* nunca podrán predecir exactamente que ocurrirá cuando se encuentren óvulo y espermatozoide *in vivo* (15, 17). Los métodos más precisos para evaluar la capacidad de fecundante del semen luego de ocurrido un proceso de criopreservación son las pruebas de campo, es decir la inseminación de un gran número de hembras (18). Este hecho fue posible en los animales de granja (19, 20, 21). Sin embargo, en pequeños animales las pruebas de fertilidad a campo son difíciles de implementar ya que usualmente solo un pequeño número de hembras está disponible para el estudio, razón por la cual poseen baja sensibilidad.

## PRUEBAS DE CONTRASTACIÓN SEMINAL

Las pruebas *in vitro* de evaluación seminal pueden relacionarse con la morfología o viabilidad espermática (22). Las pruebas que se relacionan con el estudio morfológico del espermatozoide se considera que reflejan la producción espermática y el almacenamiento extragonadal. Las pruebas que evalúan la viabilidad espermática proveen información no solo de la calidad espermática del semen producido sino también del efecto causado por el estrés de la recolección y la criopreservación (23, 24). Los procesos de congelación y descongelación someten a los espermatozoides a diferentes tipos de estrés provocando daños de membrana, alteración del metabolismo espermático y pérdida de la motilidad, factores que afectan la capacidad fecundante del semen (25, 26, 27, 28).

## EVALUACIÓN DE LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS

Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (27, 28). La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (25, 27, 33). Para poder interactuar con el ovocito, los espermatozoides deben estar vivos, motiles y poseer las membranas plasmática y acrosomal intactas y funcionales. Existen variadas metodologías que pueden utilizarse para estudiar la viabilidad espermática e integridad de membrana. Una de estas metodologías está representada por tinciones que permiten diferenciar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos en base a la permeabilidad de membrana a los colorantes vitales. Las células cuya membrana plasmática es funcional y por lo tanto conservan la permeabilidad selectiva, no permiten el paso del colorante y se observan no teñidas. Por el contrario cuando la membrana plasmática está alterada y pierde la permeabilidad selectiva, permite el paso del colorante y la célula se observa teñida (Watson 1990). Algunos ejemplos de coloraciones vitales son eosina-nigrosina, eosina azul de anilina, azul tripán (34). Existen también tinciones que permiten evaluar simultáneamente viabilidad espermática e integridad acrosomal. La triple tinción utilizando azul tripán, marrón bismark y rosa de bengala permite observar si la membrana plasmática de la célula conserva la permeabilidad selectiva no permitiendo el paso del azul tripán así como también la integridad del acrosoma el cual si está presente en la célula se teñirá con rosa de bengala pudiendo observarse si está íntegro o si está dañado (3, 5). También pueden emplearse sustancias fluorescentes permeables como marcadores de integridad de membrana, por ejemplo yoduro de propidio o bisbencimida (propidium iodide o bis-benzimide) combinado con Isotiocianato de fluoresceína usando microscopio de fluorescencia. Los espermatozoides que han perdido la permeabilidad selectiva de membrana dejan pasar al yoduro de propidio y se observan rojos (35). La aplicación del citómetro de flujo permite realizar una evaluación exacta y objetiva de la célula espermática mediante la aplicación de pruebas fluorescentes (36). Sin embargo el costo de los equipos impide el uso de esta técnica en muchos laboratorios de investigación y centros comerciales. Una prueba sencilla, poco costosa y que posee buena correlación con la capacidad fecundante del semen es la prueba de endósmosis positiva (EP). En esta prueba los espermatozoides son expuestos a una solución hipotónica la cual produce el hinchamiento celular por entrada de

agua a la célula, induciendo de esta manera el enrollamiento de la cola de los espermatozoides que poseen membrana plasmática intacta (37, 38).

Los procesos de criopreservación afectan la integridad acrosómica. El acrosoma debe estar intacto en el momento de la inseminación debido a que la reacción acrosómica debe ocurrir en el sitio donde ocurra la fertilización. La morfología acrosómica puede ser observada mediante microscopio de contraste de fase, microscopio electrónico de transmisión, lectinas marcadas con sustancias fluorescentes y anticuerpos monoclonales (39,40). Dentro de las lectinas marcadas con fluorescentes, el *Pisum sativum* (PSA) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el más usado para detectar cambios acrosomales mediante el uso de pruebas fluorescentes (39). El PSA se une en forma selectiva a las proteínas acrosomales de los espermatozoides de los mamíferos permitiendo visualizar la integridad acrosómica a través de su conjugación con el FITC (41).

## MOTILIDAD

La motilidad espermática se evalúa antes y después de la criopreservación. Los espermatozoides necesitan ser motiles y capaces de sufrir hiperactivación para lograr alcanzar y penetrar las capas que rodean al ovocito cuando ambas células se encuentran en el oviducto. La estimación visual de la motilidad es el método más simple y menos costoso para evaluar la calidad seminal. Sin embargo debe tenerse en cuenta que es el parámetro más influenciado por el operador (22). El sistema de análisis computarizado de semen (CASA, Computer assisted semen analysis) combina una cámara termostáticamente controlada (cámara de Makler en la que se deposita una alícuota de semen y se mantiene la temperatura a 37°C durante el examen), un sistema óptico con iluminación de contraste de fases, un detector de imágenes, un conversor digital, un sistema de computación y un monitor de video. Este sistema permite medir el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y la velocidad de movimiento. El uso del sistema CASA provee mediciones más objetivas y confiables de la motilidad espermática (29, 30) y permite no solo evaluar motilidad espermática sino también diferenciar sub-poblaciones en relación al tipo de motilidad espermática (e.g. espermatozoides que muestran movimientos lineales o de hiperactividad) (31). Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una exacta calibración (32). Si bien, la motilidad es solo uno de los muchos atributos de un espermatozoide fértil, fue el primer atributo utilizado y sigue siendo el más frecuentemente usado como indicador de la función espermática.



### **Proceso de criopreservación espermática**

El semen puede ser conservado mediante refrigeración o congelación. La refrigeración disminuye la tasa metabólica y prolonga la sobrevivencia espermática. Los diluyentes de semen utilizados para refrigeración protegen las membranas espermáticas de los daños causados por los cambios de temperatura, proveen energía, estabilizan el pH y la presión osmótica (26). La yema de huevo es un componente habitual de los diluyentes para semen debido a que sus fosfolípidos y proteínas de baja densidad protegen al espermatozoide del shock de frío (42, 43). En 1956, Harrop (6) comunica la primera preñez en caninos con semen refrigerado a 4° C durante 4 días usando un diluyente a base de leche. Desde entonces varios diluyentes han sido probados para su uso con semen canino (44, 45, 46). Uno de los diluyentes más comúnmente usados es el Tris-citrato conteniendo 20% de yema de huevo (TYH) (45, 78), el cual permite el uso de semen refrigerado con buena capacidad fecundante durante 24-48 horas pos-refrigeración, obteniéndose porcentajes de preñez aceptables (62,5%; Fosberg 91, 46). Este diluyente se ha comparado *in vitro* con diluyentes preparados en base a leche y yema de huevo; y crema de leche y yema de huevo, observándose resultados similares en cuanto a la conservación de motilidad espermática e integridad de membrana (46). El MRA® (glucosa, EDTA, citrato de sodio, acetato de potasio, aminoglucósidos, excipiente tampón), es un diluyente que posibilita buena conservación del semen porcino tanto en relación a la viabilidad espermática como a la preservación de la capacidad fecundante (27, 48). Este diluyente con el agregado de 20% de yema de huevo permitió obtener en caninos, parámetros seminales (porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto) significativamente mayores que el TYH cuando el semen fue refrigerado durante 24, 48 o 72 hs tanto a 4° C como 15° C (78). Se ha observado que la longevidad del semen canino es significativamente mayor a 4° C que a 22° C (47). Sin embargo no se observaron diferencias significativas cuando se conservó a 4° C o 15° C (78).

Tanto el tipo de diluyente usado como la temperatura de almacenamiento son factores que poseen gran influencia sobre la capacidad fecundante del semen luego de la refrigeración (50). El semen refrigerado, no requiere el uso de equipos sofisticados para su preparación y puede utilizarse mediante la aplicación de IA vaginal (2, 12). Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen canino y se la mezcla con el diluyente elegido, el cual debe encontrarse a

la temperatura del semen en el momento de la dilución. Entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4. El semen así preparado puede refrigerarse a 4 °C o 15°C y utilizarse para IA lográndose tasas de preñez aceptables durante las primeras 24-48 h. Previo a la IA el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente (12).

La utilización de semen refrigerado con diluyentes protectores como el tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo permite conservar espermatozoides con buena capacidad fecundante por un período de tiempo suficiente para trasladar el semen e inseminar animales ubicados en localizaciones geográficas distantes. Esto hace posible la IA de una hembra con el semen de un macho que se encuentre en otra provincia u otro país limítrofe o cercano con mínimo gasto y baja complejidad de manejo. De esta manera se amplían las posibilidades de uso de un reproductor, permitiendo la comercialización de semen y facilitando el intercambio genético entre diferentes establecimientos (40).

Hasta hace poco tiempo, se practicaba IA exclusivamente con semen fresco, posteriormente comenzó a utilizarse semen refrigerado. En muchos países de Europa así como en Estados Unidos la IA con semen refrigerado es una práctica rutinaria, sin embargo no ocurre lo mismo en Sudamérica.

Este método de criopreservación de semen puede ser implementado con bajo costo, fácil manejo y moderada infraestructura, factores que pueden determinar, en el futuro, su uso rutinario en Sudamérica, mejorando así las posibilidades del uso del semen de reproductores valiosos.

Los procesos de congelación-descongelación resultan en reducción de la fertilidad del semen criopreservado si lo comparamos con el semen fresco. Este hecho es el resultado tanto de la pérdida de viabilidad espermática (población de espermatozoides muertos) como de las alteraciones funcionales instauradas en la población sobreviviente (28).

Los espermatozoides criopreservados exhiben modificaciones de membrana similares a las ocurridas en espermatozoides capacitados, dichos eventos reducen la longevidad espermática (51). Estos cambios similares a la capacitación espermática están relacionados con eventos que desestabilizan las membranas. Un aumento de la tasa de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y aumentando así la cantidad de espermatozoides con capacidad fecundantes en la población de espermatozoides sobrevivientes luego del proceso de criopreservación (27, 28). Existen variados tipos de daños asociados tanto al enfriamiento propiamente

dicho como a los componentes de un diluyente. Estos daños están relacionados con los cambios de temperatura (shock de frío), la toxicidad de los crioprotectores y la formación y disolución de hielo en el medio ambiente extracelular (26,52, 53, 54, 55). Cada paso del protocolo de criopreservación podría afectar la estructura de la membrana así como el metabolismo y la función celular. Sin embargo los pasos están interrelacionados entre sí y un cambio en uno de ellos puede modificar el efecto de otras variables (56).

Las primeras preñeces obtenidas en caninos a partir de IA con semen congelado fueron logradas utilizando lactosa y un diluyente con base Tris (8, 57,). Desde entonces, variados diluyentes han sido evaluados para su uso en caninos, sin embargo los diluyentes en Tris Base son aún los usados más frecuentemente (3, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64,). En la actualidad, el glicerol es el crioprotector usado con más frecuencia en la preparación de diluyentes de semen, habiendo sido utilizado también el dimetilsulfoxido (DMSO) (61, 65). Existen otros compuestos como el dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina betaina, prolina y metilxantinas que han sido incluidos en los diluyentes utilizados para congelación de semen canino (64,66, 67, 68,).

La yema de huevo es el componente más efectivo para proteger al espermatozoide del shock de frío y es generalmente incluido en los diluyentes utilizados para criopreservación. Este componente previene la aparición de colas dobladas y protege la motilidad (69, 70). El compuesto activo en la yema de huevo es la fracción de lipoproteína de baja densidad, una molécula de alto peso molecular que solo puede actuar en la superficie celular (54). Se ha comprobado que la acción de ciertos detergentes sobre las lipoproteínas de la yema de huevo mejora el efecto crioprotector de los diluyentes de semen en algunas especies (68, 71, 72, 73). Compuestos detergentes que contienen dodecil sulfato de sodio (SDS) solos o como un componente del Equex STM® paste (detergente comercial) han sido incluidos en diluyentes de semen usados para la congelación de semen canino (12, 43, 74, 75). Se observó que la adición de Equex STM paste a un diluyente con base Tris mejora la supervivencia espermática al descongelado (64, 68, 40) así como la capacidad espermática para unirse a la zona pelúcida de ovocitos homólogos (76, 77, 78). Peña (68), observó un efecto benéfico en todos los indicadores de viabilidad espermática al utilizar dos pasos de dilución en el protocolo de congelación cuando incorpora Equex STM paste al diluyente. Sin embargo no se ha evaluado el efecto de diferentes concentraciones de Equex STM paste sobre la viabilidad espermática al descongelado. Notthing (79) obtuvo altos porcentajes de preñez mediante IA intravaginal con semen criopreservado utili-

zando un diluyente con el agregado de Equex STM paste. Así mismo Rota (80) obtuvo buenos resultados utilizando inseminación artificial intravaginal e intrauterina con semen congelado utilizando Equex STM paste. Sin embargo no existen estudios de fertilidad en relación con las concentraciones de Equex STM paste utilizadas en la formulación de los diluyentes.

Diferentes tipos de azúcares han sido incluidos en los diluyentes usados para congelación de semen canino (81, 82). Los azúcares utilizados poseen variadas funciones tales como proveer un sustrato energético para las células espermáticas durante la incubación, mantener la presión osmótica del diluyente y actuar como crioprotectores (83). Se ha estudiado la influencia de los azúcares (monosacáridos, disacáridos, trisacáridos), sobre la motilidad, viabilidad y porcentaje de acrosomas intactos durante la dilución, equilibración y congelación de espermatozoides caninos (83). La suplementación del diluyente con azúcares influencia la calidad espermática pos-equilibración y pos-descongelación. El tipo y localización del impacto protector del azúcar sobre la célula espermática varía de acuerdo al tipo de azúcar utilizado (83, 84, 85, 86, 87).

La trealosa es usada como una molécula protectora en la estabilización celular durante la congelación. Durante la congelación ocurren fenómenos de deshidratación celular. Este azúcar es acumulado en altas concentraciones (superiores al 20%) en muchos organismos capaces de sobrevivir a la deshidratación completa. Por ejemplo las levaduras utilizadas en panadería, las cuales han sido estudiadas exhaustivamente, no sobreviven a la desecación durante la fase de crecimiento logarítmico (en la cual no poseen cantidades significativas de trealosa), pero durante la fase estacionaria ellas acumulan este azúcar y pueden desecarse satisfactoriamente (88, 89).

Se ha comunicado el efecto benéfico en la viabilidad espermática al descongelado en espermatozoides de carnero y equino cuando el diluyente es suplementado con trealosa (90, 91, 92). Este disacárido posee un efecto protector relacionado con el efecto osmótico que produce y su interacción específica con los fosfolípidos de membrana (85, 86).

Por debajo de aproximadamente  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , las células y el medio que las rodea permanece no congelado gracias al superenfriamiento y al descenso del punto de congelación producido por los solutos protectores presentes frecuentemente en el medio externo. Es así que el contenido de la célula permanece no congelado y superenfriado, presumiblemente pues la membrana plasmática bloquea el desarrollo de cristales de hielo dentro del citoplasma. El agua superenfriada de la célula, tiene por definición un potencial químico

mayor que el agua parcialmente congelada existente en el exterior de la célula. El medio externo de la célula como consecuencia de la congelación parcial y de la formación de cristales de hielo, posee una concentración de solutos mayor en la fracción líquida externa que antes de la formación de los cristales de hielo (87). Esto determina que el medio externo que rodea a la célula posea una mayor presión osmótica que el medio celular interno. En respuesta a los fenómenos ocurridos y a las diferencias fisicoquímicas entre el medio interno y externo el agua sale de la célula y se congela externamente. Si el enfriamiento es suficientemente lento, la célula es capaz de perder agua y concentrar suficientemente los solutos para eliminar el superenfriado y mantener el potencial químico del agua intracelular en equilibrio con el agua extracelular. El resultado es que la célula se deshidrata y no se congela en su interior (93).

Los azúcares no permeables (trealosa, lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación (85, 88, 94). Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de daño celular por la cristalización del hielo (91, 95).

El mayor grado de estrés sufrido por los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana resulta en una transición de fase termotrópica, fusión y aumento de la permeabilidad de membrana. Debido a que el agua, ligada al hidrógeno de los grupos polares de las cabezas, es removida por la deshidratación aumenta la temperatura de transición ( $T_m$ ) de gel a líquido cristalino. Sin embargo la solubilidad fosfolipídica de la fase gel está siempre disminuida relativamente en comparación con lo que se observa en la fase líquida cristalina y podrían existir diferencias de sensibilidad en la  $T_m$  en el estado de hidratación lo cual puede resultar en separación fosfolipídica (85). La trealosa posee una acción protectora relacionada con su interacción específica con los fosfolípidos de membrana (84, 85, 88, 96) y puede ser capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación (14). Este azúcar muestra una interacción directa con los fosfolípidos de las cabezas de los grupos polares durante la desecación y congelación, reduciendo las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas que se relacionaría con la disminución de  $T_m$  (84, 96). El agregado de trealosa al diluyente utilizado para la congelación de semen canino podría mejorar la viabilidad espermática al descongelado (97).

El espermatozoide es una célula altamente especializada con una membrana plasmática que no solo ayuda a mantener la integridad celular sino también participa en los eventos de fusión de membrana asociados con la fertilización (98).

La membrana plasmática es considerada como el sitio donde se inicia la injuria inducida por la congelación (99). En humanos, la integridad de la membrana plasmática y acrosómica fue estudiada mediante microscopio electrónico de transmisión (MET) y se observó una correlación positiva entre los daños observados y la fertilidad (100). En caninos se han estudiado los cambios ultraestructurales presentes en las cabezas espermáticas usando MET (40). Cuando se compararon los dos métodos de congelación (Congelación en termo de nitrógeno vs congelación sobre vapores de nitrógeno líquido) utilizados para criopreservar semen en caninos (44,80) no se observaron diferencias entre los métodos, y ningún método provocó daño más extenso que el otro, ni mejoró significativamente la calidad espermática al descongelado. Sin embargo en ambos métodos se observaron importantes cambios a nivel de las cabezas en el semen congelado, lo cual puede causar reducida longevidad espermática y explicar las bajas tasas de concepción obtenidas con IA intavaginal en comparación con IA intrauterina cuando se usa semen congelado (40, 101). Estudios dirigidos a caracterizar el tipo y extensión de los cambios ultraestructurales presentes en espermatozoides caninos congelados con diferentes diluyentes podrían ayudar a desarrollar nuevos diluyentes prediciendo en forma más segura la fertilidad de ese semen. El semen congelado puede ser almacenado por largo tiempo en bancos de semen y preservar así material genético, es así que un reproductor puede ser usado mucho tiempo después de su muerte.

## **INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO**

Tres puntos conforman las llaves del éxito para obtener buenos resultados con la implementación de IA en caninos: 1) Determinación del momento óptimo para la IA, 2) Uso de semen de buena calidad, 3) Uso de una adecuada técnica de IA (12).

El semen congelado luego de la descongelación posee una vida mucho más corta que el semen fresco, debido a que los protocolos de criopreservación producen un número potencial de factores de estrés que pueden producir variados cambios en el espermatozoide (102, 103). Es así que en caninos, si se usa semen congelado, la IA debe realizarse entre el día 4 y 7 del estro, ya que este es el período óptimo para la concepción. En este momento, el espermatozoide posee altas probabilidades de interactuar con ovocitos fértiles en relación al tiempo de vida de los mismos (10).

La IA debe ser realizada con un número de espermatozoides vivos y competentes al descongelado suficientes para obtener una alta probabilidad de fertilización. Es por esto que debe

considerarse un protocolo de criopreservación que no solo logre una gran población de sobrevivientes sino también la integridad de las células que la conforman (102). En el perro se estima que entre 150 y 200 X 10<sup>6</sup> espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez (34).

Debido a la corta sobrevivencia de los espermatozoides congelados en comparación con el semen fresco, el uso de IA intrauterina aumenta las posibilidades de preñez. La inseminación artificial intrauterina puede realizarse depositando el semen en el útero, a través de la cateterización de cervix o inoculándolo directamente en el cuerpo o cuernos uterinos en forma quirúrgica. Si bien la IA con semen fresco es una práctica usada rutinariamente en la reproducción de pequeños animales, no ocurre lo mismo con la IA con semen criopreservado (refrigerado o congelado). Sin embargo, el continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de refrigerado, congelado y descongelado, posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esa biotecnología.

## CONCLUSIONES

La utilización de diluyentes que permitan conservar el semen canino refrigerado logrando altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica durante 2 a 5 días, hará posible el traslado de semen a diferentes puntos de nuestro país e incluso a países limítrofes o cercanos. Esto evitará el traslado de animales para la realización de servicio natural, disminuyendo los costos y esfuerzo que esto implica. Es importante destacar que el proceso de refrigeración de semen canino es de bajo costo y fácil realización, pudiendo implementarse con mínimo equipamiento y moderado entrenamiento del operador. Por otro lado, el semen refrigerado puede utilizarse realizando IA intravaginal, técnica poco costosa y de baja complejidad. La implementación de técnicas de refrigeración de semen e inseminación artificial con semen refrigerado en nuestro país permitirá a los Médicos Veterinarios de práctica privada brindar un nuevo servicio, aumentar sus ingresos y mejorar su práctica diaria.

Procesos adecuados de criopreservación determinarán un porcentaje reducido de células con membrana espermática dañada y una mayor sobrevivencia de los espermatozoides en el tracto genital femenino. La conservación de la integridad estructural y de la fisiología espermática forma parte de los factores que permiten altos porcentajes de preñez y un mayor tamaño de camada. Con el desarrollo de la criopreservación de semen junto con la determinación exacta del momento de mayor fertilidad de la hembra y una adecuada técnica de IA, esta biotecnología brindará grandes

posibilidades en el futuro.

Por otra parte la congelación de semen canino aplicando metodologías que permitan obtener porcentajes aceptables de espermatozoides viables al descongelado hará posible introducir esta biotecnología en nuestro medio. Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, su utilización mediante IA puede ser aplicada en la práctica reproductiva diaria.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Luvoni GC. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: in vitro embryo production. *Reprod Nutr Develop.* 2000; 40:505-512.
2. Fastard W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology.* 2000; 53:175-186.
3. Peña Martínez AI. Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela. 1997.
4. Spallanzani L. Observazione e sperienze in torno ai vercimelli spermetici dell' homo e degli animali. *Opuscoli di fisica animale e vegetabile opuscola.* II. Modena. 1776; (citado por, Peña, 1997).
5. Stornelli MC, Stornelli MA, Savignone C, Beluzan I, Arauz MS, De La Sota, R.L. Use of a triple stain technique for simultaneously evaluating of sperm viability and acrosomal status in canine semen. *Braz. J. Anim. Reprod.* 2001; 25:464-466.
6. Harrop AE. Artificial Insemination in a bitch with preserved semen. *Brit. Vet. J.* 1956; 110:424-425.
7. Rowson LEA. infertility of cow, sow and bitch. *Irish Vet. J.* 1954; 8: 216-221.
8. Seager SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest;* 1969; 17:6-7.
9. Fontbonne A, Badinand F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of the results obtained with an intravaginal and an intrauterine deposition of semen. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47:323-327.
10. Fosberg CL, Fosberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 39:299-310.
11. Fosberg CL, Fosberg M. Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47:313-323.
12. Fosberg CL. Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery.* 1995; 10:48-58.
13. Gill HP, Kaufman CF, Foote RH, Kirk RW. Artificial insemination of Beagles bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. *Am. J. Vet. Res.* 1970; 31:1807-1813.
14. Johnston DJ, Kuztritz MVR.; Olson, P. Canine

- and feline Theriogenology. Ed. Saunders. Philadelphia (United States). 2001; p.287-306.
15. Amann RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality. An opinion. *J. Androl.* 1993; 14:397-406.
  16. Watson PF. The effects of cold shock on sperm cell membrane. En: Morris, G.J.; Clarke, A. (ed). *Effects of low temperatures on biological membranes.* Academic Press. Orlando. Fla. 1981; 189-417.
  17. Larson B, Rodriguez-Martinez H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility?. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 61:327-336.
  18. Amann RP. Can be the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.* 1989; 10: 89-98.
  19. Chupin D, Schuh H. Survey of a present status of artificial insemination in developing countries. *Wild Anim. Rev.* 1993; 74:26-35.
  20. Chupin D, Thibier M. Survey of the present status of artificial insemination in developed countries. *Wild Anim. Rev.* 1995; 82:58-68.
  21. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination (Review). *Anim. Reprod. Sci.* 1995; 37:185-249.
  22. Saacke RG. Components of semen quality. *J. Anim. Sci.* 1982; 55:1-13.
  23. Saacke RG. Semen quality in relation to semen preservation. *J. Dairy Sci.*, 1983; 66:2635-2644.
  24. Xia-Zou C, Ming-Yang Z. Evaluation of sperm quality freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology.* 2000; 53:1477-1488.
  25. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological system. *Science.* 1970; 168:939-949.
  26. Strom Holst B, Larson B, Fosberg L, Rodriguez Martinez H. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 2000a; 119:77-83.
  27. Watson PF. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5° C and deep-freezing. *J. Thermal Biol.* 1976; 1:137-141.
  28. Watson PF. The preservation of semen in mammals. En: Finn C.A. (ed). *Oxford Reviews of Reproductive Biology.* Oxford University Press. 1979; 1:283-350.
  29. Irvine S. Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum Reprod.* 1995; 10 (1):53-59.
  30. Vestergren J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002; 57:149-179.
  31. Holt C, Holt WV, Moore HDM. Choice of operating condition to minimize sperm subpopulation sampling bias in the assessment of boar semen by computer assisted semen analysis. *J Androl.* 1996; 17:587-595.
  32. Stornelli, M A.; Arauz, M.S.; Baschard,; De LA Sota, R.L.; (2003). Unilateral and bilateral vasectomy in the dog: Alkaline Phosphatase as an Indicator of Tubular Patency. *Reproduction in Domestic Animals.* 38 (1): 1-4.
  33. Mazur P, Leivo SP, Chu EHY. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exper. Cell Res.* 1972; 71:345-355.
  34. Johnston SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 1991; 21:545-551.
  35. Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biol. Reprod.* 1986; 34:127-138.
  36. Harrison RPA, Miller NGA. Applying flow cytometry to the investigation of live and sperm suspensions. *Proc. BAS Advances topics in andrology. Sperm Biology, New techniques, New Insights.* 1998; 1-3.
  37. Hideki F, Masashi I, Takasashi K. Correlation between the hypo osmotic swelling test and various sperm function tests. *Int. Fertil.* 1993; 38:311-315.
  38. Rodrigez-Gil JE, Montserrat A, Rigau T. Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology.* 1994; 44:885-900.
  39. Kawakami E, Vandevootrt CA, Mahi-Brown CA, Tollner TL, Overstreet JW. Comparison of fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reaction of dog sperm. *J. Exp. Zool.* 1993; 265:599-603
  40. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, de la Sota RL Inseminación con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria.* 2001, 21(1): 58-66.
  41. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tsarik J. Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.* 1992; 95:755-763.
  42. Foulkes JA. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1977; 49:277-284.
  43. Quinn PJ, Chow PJW, White IG. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fert.* 1980; 60:403-407.
  44. Andersen K. Artificial insemination and storage of canine semen. En: Morrow, D.A. (ed.): *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Animals.* W.B. Saunders, Philadelphia, PA. 1980; 661-665.
  45. Concannon PW, Battista M. Canine semen freezing and artificial insemination. En: Kirk RW. (ed). *Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice.* W.B. Saunders, Philadelphia (United States). 1989; p.1247-1259.
  46. Rota A, Strom B, Fosberg CL. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology.* 1995; 44:885-900.

47. Bouchard GF, Morris JK, Sikes JD. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*. 1990; 34:147-157.
48. Paquignon, M.; Bariteau, J.; Boussiere, M.; Courot, M. (1979). Conservation prolongée du sperm frais du verrant. *Journées Rech. Porcine en France*. 1: 323-328.
49. Roca J, Martinez,S, Vazquez JM, Lucas X, Parilla I, Martinez EA. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer and stored at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 64:103-112.
50. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:481-492.
51. Rota A, Peña AI, Fosberg LC, Rodríguez Martínez H. In vitro capacitation fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 1999; 57:199-215.
52. Rota A, Strom B, Fosberg CL, Rodríguez-Martínez H. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38° C. *Theriogenology*. 1997; 47:1093-1101.
53. Gao GY, Liu J, Liu C, Mcgann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.* 1995; 10:1109-1122.
54. Strom Holst B, Rota A, Andersen Berg K, Linde Fosberg C, Rodriguez Martinez H. Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation and content of select elements. *Reprod. Dom. Anim.* 1998;33:77-82.
55. Strom Holst B, Larson B, Fosberg L, Rodriguez Martinez H. Evaluation of chilled and frozen -thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *J. Reprod. Fertil.* 2000b; 119:201-206.
56. Hammerstedt RH, Grahan JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 1990; 11:73-88.
57. Andersen K. Fertility of frozen dog semen. *Acta Vet. Scand.* 1972; 13:128-134.
58. Battista M, Parks J, Concanon P. Canine sperm post thaw survival following freezing in straws or pellet using pipes, lactose, tris or test extenders. *Proc. 11<sup>th</sup> Int. Cong. Anim. Reprod. (ICAR)* 1998; 3:229.
59. Davies PR. A study of spermatogenesis, rates of sperm production, and methods of preserving the semen of dogs. (Doctoral Thesis). University of Sidney. 1982.
60. England GCW. The cryopreservation of dog semen. (Doctoral Thesis). Royal College of Veterinary. University of London. 1992.
61. England GCW. Cryopreservation of dog semen: A review. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 47:243-255.
62. Fastard W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with semen fresh or frozen semen. *J. Small. Anim. Pract.* 1984; 25:561-565.
63. Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*. 2001; 56:801-815.
64. Rota A, Strom B, Fosberg CL, Rodríguez-Martínez H. Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38° C. *Theriogenology*. 1997; 47:1093-1101.
65. Fastard W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.* 1996; 42:251-260.
66. Koutsarova N, Todorov P, Koutsarov G. effect of pentoxifyline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1997; 51:117-121.
67. Peña Martínez AI, Barrio F, Quintela LA, Herradon PG, Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 1998; 35:5-9.
68. Peña A; Forsberg, LC. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2000; 54:859-875.
69. Holt WV, North RD. Cryopreservation, actin localization and termotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1991; 91:451-461.
70. Holt WV, Morris GJ, Coulson G, North RD. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J. Exp. Zool.* 1998; 246:305-314.
71. Arriola J, Foote RH, Glycerolation, and thawing effect on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci.* 1987; 70:1664-1670.
72. Graham EF, Rajamannan AHJ, Schemehl MKL, Maki-Laurila M, Bower RE. Fertility studies with frozen board spermatozoa. *A.I. Digest.* 1971; 19:6-7.
73. Pendfold LM, Moore HDM. A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1993; 99:131-134.
74. Fosberg CL, Strom B, Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs. intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*. 1999; 52:11-23.
75. Nothling JO, Volkman DH. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1997; 51:109-116.
76. Stornelli MC, Stornelli MA, Savignone C, Beluzan I, Arauz MS, de la Sota RL. (2001). Use of a triple stain technique for simultaneously evaluating of sperm viability and acrosomal status in canine semen. *Brazilian Journal of Animal Reproduction*. 25 (3): 464-466.
77. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Savignone CA, García M, de la Sota RL. (2001). Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado a 4°C. *Revista Brasileira de Reproducción Animal*. 25 (3): 468-470.
78. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Savignone CA, García M, de la Sota RL. (2002). Effects of two different temperatures and three different extenders

- on survival and longevity of chilled canine semen. *Theriogenology* 57: 483 abstr.
79. Nothling JO, Gerstenberg C, Volkman DH. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen. A retrospective study. *J. S. Afr. Vet. Ass.* 1995; 66:49-55.
80. Rota A. Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa. (Doctoral Thesis). Swedish University of Agricultural Sciences; 1998.
81. Norton DB, Bruce SG. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 39:311-316.
82. Watson PF. The preservation of semen in mammals. In: Finn C.A. (ed). *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press. 1979; 1:283-350.
83. Strom Holst B. In vitro characterization of cryopreserved canine spermatozoa with special reference to post thaw survival time and pellucida capacity. (Doctoral Thesis); 1999.
84. Bakas LS, Disalvo. E.A. Effect of Ca<sup>2+</sup> on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*. 1991; 28:347-353.
85. Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents. 26 th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol. California. 1989; 219-229.
86. Stornelli. MA, Stornelli MC, Savignone CA, Arauz MA, Tittarelli C, and R.L. de la Sota. (2003). Comparison of different concentrations of threalose on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Bras. J. Anim. Reprod.* 27 (3): 359-361.
87. Watson PF, Duncan. Effect of salt concentration and unfrozen water on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1988; 25:131-142.
88. Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W, Tablin F. The threalosa myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 2001; 43:89-105.
89. Argüelles JC. Physiological roles in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* 2000; 174:217-224.
90. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 2000; 53:1053-1061.
91. Aisen EG, Medina VH, Venturino, A. Cryopreservation and post-thawed fertility ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*. 2002; 57:1801-1808.
92. Juliani GC, Snoeck PPN, Henry M. The effect of threalose ou rafinose associated to acetamide/methylcelulose on post thaw equine sperm viability. *Braz. J. Anim. Reprod.* 2003; 27:355-356.
93. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 1984; 247:125-142.
94. Aisen,E.; Cisale, H.; Fernández, H. Criopreservación de semen ovino. Nueva técnica. *Vet. Arg.* 1990, 63:1
95. Chen T, Fowler A, Torner M. Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology*. 2000, 40:277-282.
96. Yildiz C, Kaya A, Askoy M, Tekeli T. Influence of sugar supplementation of extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 2000; 54:579-585.
97. Yanagimachi R. The physiology of reproduction. En: Knobil, E.; Neil, J.D. (eds). *The physiology of reproduction*. 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press. New York. 1994; 189-317.
98. Morris GJ. Liposomes as a model system for investigating freezing injury. En Morris, GJ, Clarke A. (eds). *Effects of low temperature on biological membranes*. Academic press, London. 1981; 241-262.
99. Mahadevan MN, Trouson A O. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fert. Ster.* 1984; 41:287-293.
100. Oettlé EE. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. *Med. Ve. Rev.* 1998; 59:28-70.
101. Tsutsui T, Shimizu O, Ohara N. Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn. *J. Vet. Med. Sci.* 1989; 51:257-263.
102. Watson PF. Artificial insemination and the preservation of semen. En: Lammig, G.E. (ed). *Marshall's Physiology of Reproduction*. 2. Reproduction in the male. Churchill Livingstone. Edinburgo. 1990; 747-869.
103. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995; 7:781-791.

## INDUCCIÓN DE CICLOS ESTRALES EN LA PERRA: ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA

M C Stornelli<sup>1</sup>, F Gimenez<sup>1</sup>, C M Tittarelli<sup>2</sup>, C A Savignone<sup>3</sup>,  
R L de la Sota<sup>1</sup>, M A Stornelli<sup>1</sup>

Instituto de Teriogenología<sup>1</sup>, Cátedra de Fisiología<sup>2</sup>, Cátedra de Histología y Embriología<sup>3</sup>,  
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

**Resumen:** La inducción de ciclos estrales puede implementarse en aquellas perras con diagnóstico de intervalos interestrales prolongados no relacionados con enfermedad subyacente. Así mismo la inducción de ciclos estrales puede también utilizarse para lograr nacimientos en épocas del año en que aumenta notablemente la demanda de cachorros en el mercado. Por otra parte la inducción y sincronización de ciclos son prerequisites para los programas de transferencia embrionaria. Los métodos comunicados para la inducción de estro en la perra incluyen: 1) combinación de gonadotrofinas (eCG y hCG o hMG), gonadotrofinas de la pituitaria (FSH y LH) o dietilestibestrol. y FSH, 2) Utilización de GnRH y sus agonistas (buserelina y cistorelina) o superagonistas (nafarelina, lutrelina),. 3) Utilización de prostaglandinas para inducir luteólisis y acortar el diestro. 4) Terminación del anestro mediante la utilización de los agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, cabergolina) que disminuyen los niveles séricos de prolactina acortando así los períodos interestrales. En este trabajo se discuten las ventajas y desventajas de los protocolos disponibles para la inducción de ciclos fértiles en la perra doméstica.

**Palabras clave:** perra, inducción de celo, agonistas GnRH, agonistas dopaminérgicos, gonadotrofinas

### Oestrus induction in the bitch a review

**Abstract:** Estrus induction in the bitch is indicated in many cases. It may be considered for treatment of primary or secondary anestrus in which there has not been found any underlying cause; it may be also used in cycling induction in order to synchronize pregnancy and whelping in the more convenient time. In addition, reliable synchronous estrus induction is really important for canine embryo transfer programs. Reported methods for canine estrus induction include the use of exogenous gonadotropins (luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, human chorionic gonadotropin, pregnant mare serum gonadotropin, and human menopausal gonadotropin) or their combination with synthetic estrogens (diethylstilbestrol), GnRH agonists (lutrelin, buserelin, fertirelin, deslorelin, and leuprolide), prostaglandin and dopamine agonists (bromocryptine and cabergoline). These methods have a widely difference in efficacy of induction as well as in fertility of the estus. This review will summarize published reports on estrus induction.

**Keywords:** bitch; Estrus induction; GnRH agonist; Dopamine agonist; Gonadotropin

Fecha de recepción: 18/08/06

Fecha de aprobación: 12/10/06

**Dirección para correspondencia:** Alejandra Stornelli, Cátedra de Reproducción. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296 (B1900AVW) La Plata. Argentina.

**E-mail:** astornel@fcv.unlp.edu.ar



## Introducción

Los avances logrados en los últimos años en el conocimiento de la biología reproductiva de la perra doméstica, junto a la disponibilidad de nuevos productos hormonales han permitido mejorar el manejo del ciclo estral de la hembra canina. Es así que se han evaluado diversos métodos para inducir ciclos fértiles y se han implementado nuevos protocolos de inducción en un intento de lograr mejores resultados. El aumento del valor y las posibilidades de comercialización de los cachorros de pura raza, así como la creciente importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado el estudio y desarrollo de diversos métodos orientados al manejo del ciclo estral de la perra. En concordancia con estos hechos, una práctica en continuo estudio y desarrollo es la inducción de ciclos fértiles que hagan posible el nacimiento de cachorros en relación a las necesidades del criador. La inducción de ciclos estrales puede implementarse en aquellas perras con diagnóstico de intervalos interestrales prolongados no relacionados con enfermedad subyacente que pueda considerarse la causa de los mismos. La mayoría de los protocolos utilizados fueron evaluados en perras normales, por esto al implementarse en hembras con problemas subyacentes que afecten el normal funcionamiento del eje hipotálamo-pituitaria-ovario los resultados son pobres (1).

La inducción de ciclos estrales para lograr nacimientos en épocas del año en que aumenta notablemente la demanda de cachorros en el mercado (navidad, día del niño, etc), permite concentrar las pariciones de un gran número de perras en estos períodos del año. Este hecho se encuentra íntimamente relacionado con la obtención de mejores precios por la venta de cachorros.

Existe suficiente evidencia de la presencia de un "efecto dormitorio" en cánidos. Puede observarse que perras en anestro medio o tardío que conviven con hembras en proestro u estro acortarán la duración de su anestro en al menos 30 días (2). Este fenómeno "natural" de inducción de estros es mediado por feromonas, pero el mecanismo mediante el cual aumenta la secreción de gonadotrofinas es aún desconocido. Sin embargo desde 1939 se han investigado más de 40 protocolos de inducción farmacológica del estro en perras (3).

## Particularidades fisiológicas del ciclo estral canino

El ciclo estral de los cánidos difiere de manera considerable del de otras especies. En la perra doméstica, la fase folicular y ovulación espontánea son seguidas de una fase lútea con una duración promedio de 75 días (1). Un periodo

de anestro no estacional y de duración variable, (2-10 meses), le sigue a cada ciclo estral (4). Los factores que regulan la duración del anestro, la terminación del mismo y el comienzo de una nueva fase folicular en las perras aún no se comprenden en su totalidad. En perras normales la progresión desde el anestro temprano al tardío, se asocia con el incremento en la concentración plasmática de FSH, luego de un aumento de la pulsatilidad de GnRH siendo este un evento crítico para la iniciación de la foliculogénesis (5). También se ha observado durante esta transición un aumento en la sensibilidad de la pituitaria a la GnRH (1), un aumento en la respuesta ovárica a las gonadotrofinas (6), un incremento en las concentraciones plasmáticas de LH hacia el final del anestro (7), relacionadas con un breve período de aumento de la secreción pulsátil de LH (8), considerándose a estos eventos determinantes en el inicio de una nueva fase folicular.

Por otra parte se ha sugerido que los cambios en la secreción de LH pueden ser más importantes que los cambios en la secreción de FSH para el inicio de una nueva fase folicular que conducirá a la ovulación (1, 9). Es también importante observar que se produce un aumento en las concentraciones de estradiol antes del comienzo del proestro, unos 30 días antes del estro, el significado de este incremento aún no está bien entendido, pero puede ser el principal estímulo sobre el eje hipotálamo-pituitaria-ovario para iniciar la liberación pulsátil de LH (6). Este mecanismo de acción es confirmado por la inducción de celos fértiles lograda en perras luego de la administración de dietilestibestrol (10).

## Inducción de ciclos fértiles

La inducción de ciclos y la reducción del intervalo interestro en la perra pueden realizarse mediante cuatro alternativas (11). La primera alternativa incluye la utilización de una combinación de gonadotrofinas (eCG y hCG o hMG), gonadotrofinas de la pituitaria (FSH y LH) o dietilestibestrol y FSH. La segunda alternativa incluye la utilización de GnRH y sus agonistas (buserelina y cistorelina) o superagonistas (nafarelina, lutrelina), para estimular la liberación de hormonas gonadotrópicas endógenas de la hipófisis. La tercera alternativa incluye la utilización de prostaglandinas para inducir luteólisis y acortar el diestro. La cuarta y última alternativa incluye la terminación del anestro mediante la utilización de los agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, cabergolina, metergolina) que actúan inhibiendo la prolactina y acortando así los períodos interestrales (1).

## Gonadotropinas:

Las gonadotrofinas disponibles comercialmente y utilizadas en perros son la FSH, la eCG, la LH porcina, la hCG y la hMG (11, 12).

Existen tejidos diferentes a los de la hipófi-

sis que son capaces de producir gonadotrofinas, a estas hormonas se las conoce como hormonas del tipo hipófisis anterior. Las dos fuentes más importantes de tales hormonas, de interés en medicina veterinaria, son el suero de yegua gestante y la orina de mujer embarazada. Del primero se obtiene la eCG, y de la segunda la hCG.

La eCG es una glicoproteína, con un peso molecular de 68.000 y una vida media de aproximadamente 26 horas. Esta hormona se forma en las copas endometriales del útero de yegua gestante y está presente en la sangre del animal entre los días 40 y 140 de gestación, alcanzando un máximo el día 80 (13).

En la mayoría de las especies la actividad biológica de la eCG es similar a la de FSH, presentando también algunas acciones semejantes a LH. Por lo tanto la eCG puede sustituir a la FSH. Su período de acción es largo debido a que no pasa el filtro renal y se mantiene en circulación tanto si ha sido inyectada como si ha sido producida por el mismo animal. En la yegua la eCG tiene actividad luteotrófica, provee estimulación para el mantenimiento de los cuerpos lúteos primarios y es responsable del control de la formación y mantenimiento de los cuerpos lúteos accesorios. Con el incremento de la eCG, a menudo la yegua ovulará generándose los cuerpos lúteos accesorios. La ovulación inducida por esta hormona ocurrirá entre los días 40 y 70 de preñez, ocurriendo también luteinización en los folículos antrales que no ovularon. Por lo tanto la eCG posee en la yegua, un importante impacto sobre la habilidad del ovario para producir P<sub>4</sub>. Esta hormona atraviesa la placenta por lo que también son estimuladas la gónadas del feto. En adición a su acción luteotrófica, la eCG posee una fuerte acción semejante a FSH cuando es administrada a hembras de otras especies. En realidad esta hormona causará un marcado desarrollo folicular en la mayoría de las especies y es utilizada para inducir superovulación (14).

La eCG es utilizada ampliamente en medicina veterinaria como un método eficaz y de bajo costo para inducir el desarrollo folicular en los ovarios inactivos de animales sexualmente maduros. Por otra parte, esta hormona posee suficiente actividad LH para provocar ovulación en la mayoría de los casos. Los ovarios inactivos que por cualquier causa se encuentran en estado quiescente pueden entrar en actividad luego de la administración de eCG. Una sola administración por vía subcutánea de eCG suele producir crecimiento folicular en la vaca luego de 2 a 5 días. Con dosis elevadas se puede producir super-ovulación. Se han evaluado en detalle varios procedimientos de inducción de la ovulación en vacas, yeguas, ovejas, cabras y cerdas.

La hCG es una proteína que consta de dos cadenas peptídicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y que contiene galactosa y hexosamina, su peso molecular es de

30.000 y posee una vida media de 8 a 12 horas. Es químicamente diferente de la hormona luteinizante pero su acción biológica es muy semejante, teniendo también cierta actividad semejante a FSH. La hCG se forma en los citotrofoblastos de las vellosidades coriónicas de la placenta humana y aparece en la orina a las pocas semanas de la concepción, alcanzando su valor máximo hacia el día 50 de gestación, a partir del cual decrece hasta valores casi nulos. Desde el punto de vista farmacológico la hCG es un producto de bajo costo que causa ovulación en la hembra y estimula las células de Leydig aumentando la producción de andrógenos en el macho. Su uso en medicina veterinaria es amplio, para provocar ovulación en la yegua en el momento de ser servida, como agente terapéutico para inducir luteinización y posible ovulación en quistes ováricos en el ganado vacuno y en la terapéutica para el criptorquidismo en todas las especies. La administración de hCG puede estimular los ovarios de cualquier especie animal (13).

Los métodos de inducción utilizando gonadotrofinas exógenas comprenden: 1) administración seriada de FSH o eCG para inducir el desarrollo de los folículos y el proestro. 2) administración seriada de FSH o eCG para inducir el desarrollo folicular seguida de la administración de LH o hCG para provocar la ovulación de los folículos desarrollados. 3) protocolos similares a los descritos en el punto 1 y 2 precedidos por tratamientos con estrógenos para lograr la sensibilización estrogénica del eje hipófisis/ovario. 4) LH porcina purificada. 5) hMG (12, 15).

En la perra se ha estudiado la eficacia de varios protocolos combinando eCG y hCG habiéndose observado diferentes resultados. La eCG se utilizó con dosis de 20 UI/kg/d vía IM o SC durante 5 o 10 d o con una dosis de 44UI/kg/d durante 9 d. En ambos casos la inducción de la ovulación se obtuvo con una dosis IM o SC de 500 UI de hCG (1, 16). Los resultados comunicados fueron la inducción de ciclos en el 60 al 100% de los casos, la ovulación en el 40 al 80% de los casos y la preñez en el 9 al 56 % de los casos. Por otra parte cuando se utilizaron altas dosis de eCG, como 250 UI/kg SC durante 20 d o hasta aparición de proestro, seguida de 500 UI de hCG y 500 UI sc durante 10 d seguida de la administración de 500 UI SC de hCG, se observaron signos de proestro en el 90% a 100% de las perras tratadas pero las tasas de preñez fueron de alrededor del 20%(17, 18). En líneas generales y como conclusión de la revisión de diversos trabajos, cuanto menos fueron los días de administración de la eCG, mayor fue el porcentaje de preñez (e.g 5 d, 50-56% vs. 9-10 d 9-35%; (1). De hecho, se ha comunicado trombocitopenia debido a hiperestrogenismo en el 29% de las perras tratadas con una dosis de 20 UI/kg/d durante 10 d (19). En aquellas perras que fueron tratadas con 500 UI/kg IM durante 10 d seguido de una dosis de GnRH de 50  $\mu$ g se observaron signos proestro en el 100% de

las perras mientras que las tasas de preñez fueron del 0% (1).

Puede observarse que, durante las décadas de los 70 y 80 se trabajó intensamente en protocolos de inducción de celos con eCG y hCG. Sin embargo con dichos protocolos se obtuvo una mediana a baja fertilidad con rango muy amplio de variabilidad de los mismos. Una posible explicación de dichos resultados es la utilización de dosis de eCG muy elevadas (44UI/kg/d) y durante un período muy prolongado (9-10 d). Por ejemplo una perra de 25 kg recibía una dosis diaria de 1100 UI/d y una dosis total de 11000 UI. La dosis recomendada para la vaca es de 500-1000 UI en una sola dosis. De esto se desprende que tal vez la dosis utilizada en la perra es demasiado alta y el hiperestrogenismo que se produce es el resultado de administrar una dosis superovulatoria. De hecho, la utilización de un protocolo con dosis más reducidas (29 UI/kg/d, 500 UI, perra 25 kg) y durante un período más corto (5 d) alcanzó resultados cercanos al 50% de preñez. (1). Otros autores observaron falla luteal prematura con acortamiento del diestro y pérdida de la preñez luego del uso de eCG (20, 21, 22).

Los protocolos que utilizan FSH como estímulo foliculotrópico tienen menos éxito en el logro de inducción de ovulación y gestación que los que utilizan eCG (23). Se utilizaron protocolos de inducción combinando FSH y LH en un intento de asemejar lo que ocurre en condiciones naturales hacia el final del anestro, pero sin buenos resultados (2, 23). Sin embargo, la utilización de inyecciones seriadas de FSH o LH después de un régimen de preparación con estrógenos usando dietilestilbestrol ha tenido éxito en la inducción del estro y ovulaciones fértiles. Cuando se utilizó dietilestilbestrol a dosis de 5 mg diarios durante 5 a 7 d para producir signos de proestro y luego se administró 5mg de LH vía intramuscular el d 5 después del comienzo del proestro o 10 mg de FSH por vía intramuscular los d 9 y 11 a partir del primer día del proestro, todas las perras quedaron preñadas (24). En un estudio en el que se sustituyó LH por hCG la fertilidad y la incidencia de comportamiento estral no fueron tan exitosos (25).

Por otra parte fue estudiado también el rol de la LH en el inicio de la fase folicular en perros. Se evaluaron protocolos con LH porcina purificada en perras en anestro. Los resultados demostraron que la LH puede utilizarse para inducir estro en perras en anestro con ciclos estrales normales (26).

### **GnRH y sus agonistas:**

Otros métodos de inducción implican la administración de GnRH exógena o agonistas de GnRH para producir la liberación de gonadotrofinas endógenas desde la hipófisis, crecimiento fo-

licular y estro. La ovulación en estos casos ocurre como resultado de la oleada endógena de gonadotrofinas, el crecimiento folicular y secreción de estrógenos. Sin embargo no se disponen de datos sobre la administración de LH o hCG para facilitar la ovulación de los folículos inducidos. En condiciones naturales, la secreción pulsátil de GnRH cada 70-90 min media la síntesis y liberación de FSH y LH de la pituitaria. La administración pulsátil de GnRH a dosis de 0.2-0.4 µg/kg cada 90 min es suficiente para obtener incrementos de LH semejantes a los pulsos endógenos que ocurren hacia el final del proestro.

Los protocolos descritos incluyen 1) administración endovenosa pulsátil de GnRH cada 90 min durante 6 o 12 d (27), 2) goteo subcutáneo constante de un agonista de la GnRH durante 14 d (28) y 3) administración por vía subcutánea de un agonista de GnRH 3 veces por d durante 14 d (29).

En perras en anestro, la administración de GnRH en forma pulsátil utilizando 40 a 400 ng/kg cada 90 min produjo la aparición de proestro en 3 a 6 d seguido de estro y ovulación en 2 semanas con tasas de fertilidad del 37% al 85% (27, 29). Sin embargo el costo que insume la utilización de bombas de infusión, lo hace impráctico para su uso rutinario. El goteo subcutáneo también indujo proestro y estro, con tasas de fertilidad del 25% si se lo administraba después del final de la lactación y del 50% si se administraba durante el anestro después de ciclos sin gestación (28). Este método también carece de practicidad ya que la implantación y extracción subcutánea de las bombas de infusión osmóticas requieren una cirugía menor. La administración subcutánea de un agonista de GnRH (DTrp-6 GnRH), a dosis de 1 ng/kg cada 8 h, durante 3 d, dio lugar a estro entre los 9 y 11 d en el 80% de las perras, quedando todas preñadas. A pesar del inconveniente de las tres inyecciones diarias este protocolo parece presentar la mejor combinación de eficacia y utilidad clínica en la utilización de hormona liberadora de gonadotropina (27, 28, 29).

Existen en la actualidad más de 700 agonistas GnRH los que poseen mayor afinidad por el receptor y mayor estabilidad. Uno de ellos es Deslorelin, cuyas aplicaciones en medicina veterinaria fueron introducidas por Trigg para realzar supresión del estro. Ovuplant® (Fort Dodge Animal Health, Overland Park, KS, USA) es un implante subdérmico biodegradable, de liberación sostenida, que contiene 2,1 mg de deslorelin y que posee licencia para su utilización en yeguas. Los estudios preliminares en perras mostraron que podía ser eficaz en la inducción y sincronización de ciclos estrales (30). Sin embargo debido al escaso número de perras incluida en los estudios es necesario realizar investigaciones futuras con estas formulaciones (3).

Luego de la inducción de ciclos con agonis-

tas GnRH se observó falla lútea prematura con acortamiento del diestro y subsecuente pérdida de la preñez (28, 30, 31). Por otra parte la administración prolongada de estos fármacos resultó en sobre-estimulación de la pituitaria, supresión de la secreción de LH, disminución de la respuesta lútea a la LH y disminución de la secreción de progesterona (3, 31).

### **Prostaglandina y sus análogos:**

La prostaglandinas administradas durante el diestro pueden ser utilizadas con éxito para acortar el intervalo interestral mediante la inducción de luteólisis y acortamiento de la fase lútea. Fenprostalene, un análogo de las prostaglandina f (2) (alpha) de larga acción, utilizado 25 días después de la ovulación, a dosis de 50 ug totales produjo regresión temprana del cuerpo y acortamiento del intervalo interestral en 80 días (32).

### **Agonistas dopaminérgicos**

La prolactina juega un rol importante en la duración del intervalo interestral, posiblemente afectando la liberación de gonadotropinas y/o la respuesta del ovario a las mismas. La supresión de la secreción de prolactina por la administración de agonistas dopaminérgicos, acorta la duración del anestro o induce estro en perras con anestro prolongado (33, 34).

Los agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina y cabergolina, han sido utilizados con éxito para la inducción de ciclos estrales. La dopamina inhibe la liberación de prolactina desde la pituitaria anterior, concomitantemente el tratamiento con inhibidores de la prolactina disminuye el intervalo interestral e induce el estro en perras con anestro prolongado (35). La administración de bromocriptina y cabergolina, administrados en la fase lútea y anestro, reduce la duración de ambos (36). Algunos investigadores han reportado la terminación del anestro dentro de los 50 días de tratamiento, mientras que otros dentro de los 28 días (2, 37, 38). Bromocriptina, es un agonista del receptor dopaminérgico D2, pero también afecta los receptores serotoninérgicos y adrenérgicos (38), este compuesto también atraviesa la barrera sangre-cerebro. Por otra parte, cabergolina posee una mayor bio-potencia y afinidad por el receptor D2 que la bromocriptina, una menor afinidad por los receptores serotoninérgicos y una duración de acción mayor. Conjuntamente posee menos efectos en el sistema nervioso central (38).

Los agonistas dopaminérgicos han sido utilizados satisfactoriamente en muchas perras, pero este método de inducción de estro puede requerir más de treinta días de tratamiento, dependiendo del estadio del anestro (temprano o tardío) en el que se encuentra la perra (38).

La bromocriptina está disponible comercialmente para la utilización en humanos y se

ha utilizado en dosis de 20 a 250 µg/kg observándose una incidencia de aparición de signos de estro y tasas de preñez del 71 al 100% y 100% respectivamente. Pueden ser necesarios tratamientos de 1 a 3 meses antes de observar los signos de proestro. Rara vez se observan efectos secundarios importantes pudiendo aparecer vómitos cuando se utilizan dosis altas (36, 39). La cabergolina es el agonista dopaminérgico con el que se obtuvieron los mejores resultados, está disponible para su utilización en medicina veterinaria y utilizado a dosis de 5 ug/kg se lograron tasas de preñez del 83 a 93% (5). Sin embargo es importante destacar que el tiempo transcurrido entre la realización del tratamiento y la ocurrencia del proestro post tratamiento es sumamente variable (entre 1 y 3 meses). Este hecho hace que no puedan utilizarse estas drogas para sincronizar los ciclos en las perras, de tal manera que las pariciones ocurran en la épocas de mayor demanda de cachorros. Así mismo el tiempo prolongado de administración se relaciona con el incremento del costo del tratamiento, la complicación de la administración diaria de la droga y el desaliento del propietario.

### **Conclusiones**

El escaso número de animales con el que se realizan los ensayos hace difícil realizar una adecuada evaluación de los protocolos de inducción en la perra. Investigaciones futuras orientadas a la evaluación de los diversos protocolos de inducción así como de las dosis y periodos de administración utilizados permitirán alcanzar mejores resultados en la inducción de ciclos fértiles, lográndose altas tasas de ovulación y de preñez evitando efectos colaterales indeseables en la madre. De esta manera podrá darse una respuesta adecuada a la insistente demanda de los criadores en relación a la obtención de cachorros en épocas determinadas del año en las que aumenta considerablemente la demanda de los mismos. En la actualidad, no se puede responder de manera adecuada a esta necesidad de los productores caninos y esto se relaciona con importantes pérdidas de dinero. Sin embargo es importante destacar que si bien la inducción de ciclos puede mejorar el manejo productivo de un criadero, de ninguna manera deben olvidarse los derechos del animal. Debe impedirse que la hembra se convierta en una "máquina" productora de cachorros sin tener en cuenta el bienestar animal.

### **Bibliografía**

1. Johnston SD, Kuztritz MVR, Olson P. Canine and feline Theriogenology, Ed. WB Saunders. Philadelphia (United States), 2001; p. 262-264.
2. Concannon P W. Biology of gonadotropin secretion

## A. Stornelli y col.

- in adult and prepubertal female dogs *J Reprod Fertil* (1993) 47 pp3-27.
3. Kutzler M A. Induction and synchronization of estrus in dog. *Theriogenology* (2005). (64) 766-775.
  4. Bouchard GF, Youngquist RS, Vaillancourt D. Seasonality and variability of the interestrus interval in the bitch. *Theriogenology* 1991; 36:41-50.
  5. Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, van Haaften B, Dieleman SJ, Schoemaker J. Bromocriptine -induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches. *J Reprod Fertil* 1999; 117: 387-393.
  6. Jeffcoate IA. Endocrinology of anestrus bitches. *J Reprod Fertil*; 1993, 47(Suppl.):69-76.
  7. Olson P N, Bowen R A, Behrendt M D. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Biol Reprod* 1982; 27:1196-1206.
  8. Concannon PW, Whaley S, Anderso SP. Increased LH pulse frequency associated with termination of anestrus during the ovarian cycle of the dog. *Biol. Reprod* 1986; 34: 119.
  9. Feldman E, Nelson R. Feline reproduction. In canine and feline endocrinology and reproduction, 2<sup>nd</sup> ed. WB Saunders, Philadelphia. 1996; p. 741-768.
  10. Bouchard G F, Gross S, Ganjam V K. Oestrus induction in the bitch with the synthetic oestrogen diethylstilbestrol. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1993; 47: 515-516.
  11. Concannon PW, Lasley B, Vanderlip S. LH release, induction of oestrus and fertile ovulations in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs. *J Rep Fert* 1997; 51:1-54.
  12. De La Sota RL, Soto AT, Gobello MC. Farmacología del estro y del parto. En Botana Lopez LM, Landoni MF, Martin-Jimenez T. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana. 2002; p. 423-432.
  13. McDonald LE. Hormonas de la hipófisis. En Booth NH, McDonald LE. *Farmacología y terapéutica veterinaria*. Primera Edición. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza España. 1996; p. 599-600.
  14. Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. Second Edition. Current Conception, INC. Washinton. EE. UU. 2003.
  15. Wanke MM, Farina J, Loza MH. Induction of estrus in bitches with normal and persistent anestrus using human menopausal gonadotropin (hMG). *Theriogenology* 1997; 47: 935-942.
  16. Wrigth P J. The induction of oestrus in the bitch using daily injections of pregnant mare serum gonadotrophin. *Aust Vet J* 1982; 59: 123-124.
  17. Archabal LF, Baker BA, Clooney LC. A surgical method for collecting canine embryos after induction of estrus and ovulation with exogenous gonadotropins. *Vet Med Small Anim Clin*. 1980; 75: 228-238.
  18. Chaffaux S, Locci D, Pontois. M. Induction of ovarian activity in anoestrous beagle bitches. *Br Vet J*; 1984; 140: 191-195.
  19. Arnold S, Arnold P, Concannon PW, Weilenmann R, Hubler M, Casal M, Dobeli Fairburn A, Eggenberger E, Rusch P. Effect of duration of PMSG treatment on induction of estrus, pregnancy rates, and the complications of hyperoestrogenism in dogs. *J Reprod Fertil*; 39 (Suppl) 1989; 115-122.
  20. Nakao T, Aoto Y, Fukushima S. Induction of estrus in bitches with exogenous gonadotropins, and pregnancy rate and blood progesterone profiles. *Jpn J Vet Sci* 1985; 47: 17-24.
  21. Tsuda T, Nakao S, Nakao T. The induction of superovulation in the bitch with pregnancy mare serum gonadotropin and human chorionic gonadotropin. *J Reprod Dev* 1995; 41: j89-j95.
  22. Weilenman R, Arnold S, Dobeli M, Rusch P, Zerobin K. Estrus induction in bitches by the administration of PMSG and hCG. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1993; 135: 236-41.
  23. Shille VM, Thatcher MJ, Simmons KJ. Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *JAVMA* 1984; 184: 1469-1473.
  24. Moses DL, Shille VM. Induction of estrus in greyhound bitches with prolonged idiopathic anestrus or with suppression of estrus after testosterone administration. *JAVMA* 1988; 192: 1541-1545.
  25. Shille VM, Thatcher MJ, Lloyd ML. Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch. *J Rep Fert* 1989; 39: 103-113.
  26. Verstegen J, Onclin K, Silva LDM. Use of ultra-pure porcine LH to induce follicular growth, estrus and pregnancy in the bitch. *Biol Reprod* 1993; 48 (Suppl 1): 127.
  27. Vanderlip SL, Wing AE, Felt P. Ovulation induction in anestrus bitches by pulsatile administration of gonadotropin-releasin hormone. *Lab Anim Sci* 1987; 37:459-464.
  28. Concannon PW. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist *J Rep Fert*; 1989; 39:149-160.
  29. Cain JL, Cain GR, Feldman, EC. Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasin hormone to induce fertile estrus in bitches. *Amer J Vet Res*; 1988; 49:1993- 1996.
  30. Kutzler, M A, Wheeler and R, Volkmann D.H. Canine estrus induction using the GnRH agonist, deslorelin, *Proc Ann Meet Eur Vet Soc Small Anim Reprod, Eur Vet Soc Small Anim Reprod*. 2001; pp. 147-148 [abstract].
  31. Mc Rae, G.I, Roberts B.B, Worden A.C, Bajka A, Vickery B.H Long-term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J Reprod Fertil* 74 1985; pp. 389-397.
  32. Hori T, Akikawa, T.; Kawakami, F.; Tsuitsui, F. Effects of administration of prostagrandin F(2)(alpha)-analogue fenprostalene on canine corpus luteum and subsequent recurrence of estrus and fecundity. *J. Vet. Med Sci* 2002 Sep;64(9):807-11

33. Onclin K, Verstegen J, Silva L.D.M and Concannon P. Patterns of circulating prolactin, LH and FSH during dopamine-agonist induced termination of anestrus in beagle dogs. *Biol. Reprod.* 52 Suppl. 1995; p. 314
34. Okkens A.C, Kooistra H.S, Dieleman S.J and Bevers M.M. Dopamine agonistic effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on duration of anoestrus in bitches. *J. Reprod. Fertil.* 51 Suppl. 1997; pp. 55-58.
35. Jochle W, Arbeiter K, Post, K. Effect of pseudo pregnancy, pregnancy and interestrus interval of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1989; 39: 199-207.
36. Okkens AC, Bevers MM, Dieleman SJ. Shortening of the interestrus interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocryptine treatment. *Vet Q* 1985; 7: 173-175.
37. Van Haften B, Dieleman SJ, Okkens A C. Induction of oestrus and ovulation in dogs by treatment with eCG and/or bromocriptine. *J Reprod Fertil* 1989(Suppl); 39: 303-339 (Abstract).
38. Verstegen J, Onclin K, Silva L, Concannon P. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology* 1999; 51:597-611.
39. Zoldag L, Fekete S, Csaky I, Bersenyi A. Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology* 2001; 55:1657-66.