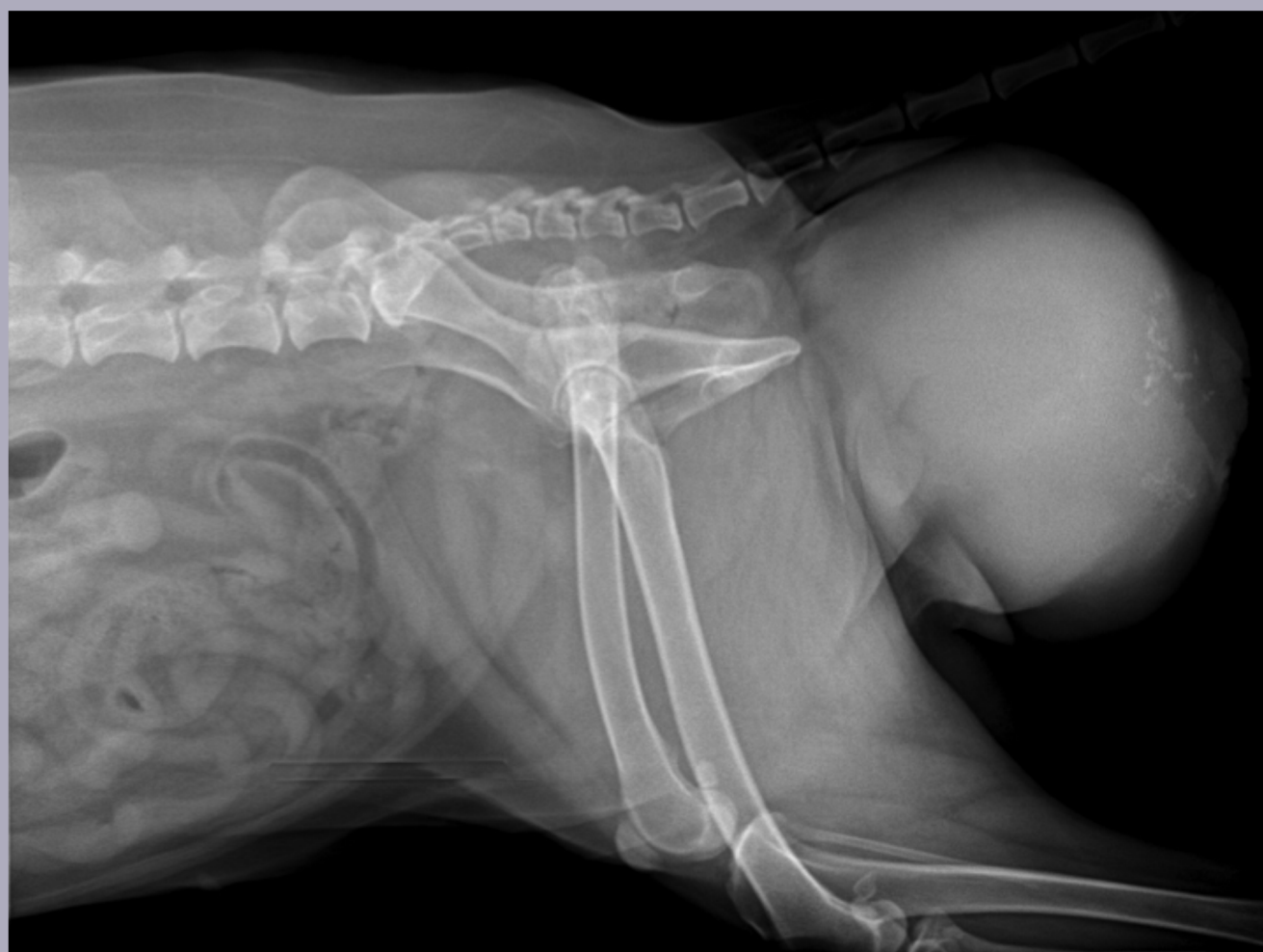


ANALECTA VETERINARIA



ISSN 0365514-8 Versión impresa
ISSN 1514-2590 Versión electrónica
ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 38 N° 2, 2018

Publicación de la

Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

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

Decano

Dr. Marcelo I. Pecoraro

Vicedecana

Dra. Sara I. Williams

Secretaria de Asuntos Académicos

Dra. Vanina L. Cambiaggi

Secretario de Posgrado

Dr. Rodolfo L. de la Sota

Secretaria de Ciencia y Técnica

Dra. María C. Venturini

Secretaria de Extensión

Dra. Alicia Antonini

Secretaria de Asuntos Estudiantiles

Med. Vet. Ana Belén Scuffi

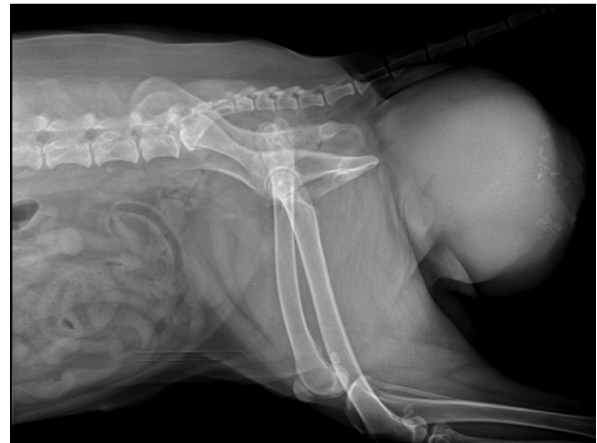


Foto de tapa: Proyección latero-lateral de una masa vulvar, bien delimitada, radiolúcida y con densidad homogénea. Osorio-Baños JC *et al.*

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Enrique L. Portiansky
Universidad Nacional de La Plata

Consejo Editorial

Editor Responsable

Dr. Marcelo I. Pecoraro
Universidad Nacional de La Plata

Editora Asociada

Dra. María C. Venturini
Universidad Nacional de La Plata

Coordinación Editorial

Dr. Julio R. Idiart
Universidad Nacional de La Plata

Dra. Mónica E. Diessler
Universidad Nacional de La Plata

Secretaría de Redacción

Dr. Gastón Moré
Universidad Nacional de La Plata

Dra. Carla García Mitacek
Universidad Nacional de La Plata

Acerca de ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA (ANALECTA VET) es una revista de publicación semestral (cubre los meses de enero/junio y julio/diciembre) y constituye el órgano oficial de comunicación científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Se reciben para su consideración trabajos que versen acerca de cualquiera de las áreas de las Ciencias Veterinarias, generados por profesionales de esta u otras Unidades Académicas, entes nacionales o de la actividad privada, escritos en español o en inglés.

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisión con modalidad doble ciego por parte de expertos del área de conocimiento que no pertenecen a las instituciones de origen del trabajo recibido.

About ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA is a biannual publication of the School of Veterinary Sciences of the National University of La Plata, Argentina. It is committed to the diffusion of scientific reports in the field of the Veterinary Sciences, generated both in this and other institutions. All works are subjected to double-blind review.

ISSN 1514-2590 Versión en línea

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

Registro Propiedad Intelectual 77383
Dirección postal: 60 y 118 (B1900AVW)
La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

Comité Científico

Dr. José I. Aguirre

Department of Physiological Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Florida, USA

Dra. María Barrandeguy

Instituto de Virología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina

Ph.D. Julián A. Bartolomé

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), Argentina

Dr. Carlos Campero

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Argentina

Dr. Rodolfo Cantet

Mejoramiento Genético Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Ph.D. Eduardo R. Cobo

Production Animal Health, Veterinary Medicine, University of Calgary, Canada

Dr. Guillermo M. Denegri

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Instituto de Investigaciones en Producción, Salud y Ambiente (IIPROSAM), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dr. Eduardo J. Gimeno

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dra. Nélide V. Gómez

Clínica Médica de Pequeños Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Ph.D. Alberto A. Guglielmone

Laboratorio de Parasitología, Departamento de Sanidad Animal, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina

Dr. Carlos Lanusse

Fisiología y Farmacología Veterinaria, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Argentina

Dr. Antonio Javier Masot Gómez-Landero

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

Dr. Dadín Prando Moore

Patología Veterinaria, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Unidad Integrada Balcarce, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Me. Eduardo V. Moras

Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Dr. Hugo H. Ortega

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Ph.D. Luis M. Ortega Mora

Grupo SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España

Ph.D. Pablo E. Piñeyro

Veterinary Diagnostic & Production Animal Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, USA

Dr. Martí Pumarola i Batle

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

Dr. Manuel Quezada Orellana

Departamento de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chile

Dr. Francisco Reynaldi

Micología Médica e Industrial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dr. Franklin Riet-Correa

Plataforma de Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA-La Estanzuela, Uruguay

Dr. Luis E. Samartino

Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Microbiología, Carrera de Veterinaria, Universidad del Salvador (USAL), Argentina

Dra. Analía I. Seoane

Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dra. Irma E. Sommerfelt

Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Dr. Nestor O. Stanchi

Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de La Plata (UNLP), Argentina

Ph.D. José M. Verdes García

Departamento de Patología, Área Patología y Departamento de Biología Molecular y Celular, Área Biofísica, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay

Equipo técnico

Revisión del idioma inglés: PhD. Magdalena Rambeaud
Maquetación: Dr. Enrique L. Portiansky

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&»

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

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

Opinions expressed by authors do not necessarily reflect those of this journal, nor those of their sponsoring entities or the institutions to which the authors belong.

El uso de nombres comerciales tiene como único objetivo facilitar la identificación de los productos mencionados y no implica el respaldo directo o indirecto de los Ministerios de la Nación Argentina ni de los países respectivos de donde provengan los trabajos. Tampoco se garantizan ni respaldan los productos promocionados en los avisos de publicidad.

ANALECTA VETERINARIA ha sido editada, desde 1905, por la Facultad de Ciencias Veterinarias, inicialmente con el nombre de Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de La Plata, pasando a denominarse Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria, desde 1922, y luego, a partir de 1959, como Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Finalmente, desde 1969, la revista adquirió su actual denominación. De esta manera, nuestra revista ha cumplido más de 100 años de ininterrumpida edición. Actualmente se publica sólo en su versión *en línea* (ISSN 1514-2590).

Licencia



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

ANALECTA VETERINARIA meets the international conditions of the Creative Commons CC-BY-NC-ND license. This type of license allows others to download the work and share it, as long as credit is given to the authors, but it does not allow to change them in any way or use them commercially.

Citación de la versión en línea

La citación de los artículos aparecidos en la versión electrónica de ANALECTA VETERINARIA deberá seguirse según el siguiente ejemplo:

Durante E, Marcos A, Ayerbe M, Chiricosta A, Segato L, Donato ME, Capellino F, D'Alessio F, Piskorz A, Carballo Longo M. 2017. Prevalencia de anticuerpos contra virus de influenza equina en equinos deportivos de la República Argentina durante 2015 y 2016. *Analecta Veterinaria*. 37(2):25-32. doi: 10.24215/15142590e013

ANALECTA VETERINARIA está indizada en:

Índice y catálogo Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX
<http://www.latindex.unam.mx>

Directory of Open Access Journals
<http://doaj.org>

SEDICI
<http://sedici.unlp.edu.ar>

BINPAR. CAICYT. CONICET
<http://binpar.caicyt.gov.ar>

Ulrich's International Periodicals Directory
<http://www.ulrichsweb.com>

REDIB (Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico)
<https://www.redib.org>

ROAD (Directory of Open Acces Scholarly Resources)
<http://road.issn.org>

Plataforma Open Access de Revistas Científicas Electrónicas Españolas y Latinoamericanas del CSIC
<http://bibliotecas.csic.es>

Princeton University Library
<https://catalog.princeton.edu>

Google Académico
<https://scholar.google.com.ar>

MIAR (Matriz de Información para el Análisis de Revistas)
<http://miar.ub.edu>

Citefactor
<http://www.citefactor.org>

JournalTOCs
<http://www.journaltocs.ac.uk>

Acceso en línea a ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA puede ser recuperada gratuitamente en internet en el repositorio institucional SeDiCi UNLP:

<http://sedici.unlp.edu.ar>

A partir del volumen 36(2), 2016, también se puede acceder desde el Portal de Revistas de la UNLP:

<http://revistas.unlp.edu.ar/analecta>

Si desea consultar los volúmenes previos (1969 en adelante) debe dirigirse a la siguiente dirección electrónica:

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

A partir del Volumen 18, los números de la revista se encuentran a disposición 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 esta posea una resolución mínima de 600 x 600 dpi.

ANALECTA VETERINARIA can be downloaded in PDF file format and can be printed on any printer that allows to differentiate grayscale or colors.

Evaluadores de trabajos de ANALECTA VETERINARIA

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

Se invita a todos los potenciales evaluadores a registrarse en el Portal de Revistas de la UNLP, en la siguiente dirección electrónica:

<https://revistas.unlp.edu.ar//user/register>

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisores externos. El Consejo Editorial se reserva el derecho de editar los artículos para clarificarlos y de modificarles el formato para adecuarlos al estilo de ANALECTA VETERINARIA.

All articles published in ANALECTA VETERINARIA are submitted to external scientific reviewers. The Editorial Staff reserves the right to edit articles for clarity and to modify the format to fit the publication style of ANALECTA VETERINARIA.

Contacto

Para cualquier comunicación oficial dirigirse al Sr. Director de la Revista ANALECTA VETERINARIA a la dirección: analecta@fcv.unlp.edu.ar

For any official communication, please contact the Director of ANALECTA VETERINARIA at: analecta@fcv.unlp.edu.ar

Trabajos de investigación / Research works

Evaluación *in vitro* de las actividades antimicrobiana, antioxidante y protectora del ADN, de un extracto etanólico de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

In vitro evaluation of the antimicrobial, antioxidant and DNA protective activities of an ethanolic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)

CECCHINI ME, ROMA DA, PUSSETTO L, IGLESIAS D, BASUALDO MC, AIASSA DE, MAÑAS TORRES FJ

doi.org/10.24215/15142590e026

1-9

Separación por sexo y caracteres productivos en un cruzamiento experimental de tres vías de pollo campero

Separation by sex and productive characters in an experimental cross-breeding three-way chicken

ANTRUERO AE, SAVOY JP, MONTENEGRO A, SAVOY JC, CANET ZE, DOTTAVIO AM, DI MASSO RJ

doi.org/10.24215/15142590e027

10-17

Comunicaciones cortas / Short communications

Aislamiento de serovariedades de *Salmonella enterica* a partir de heces de animales domésticos y silvestres en cautiverio

*Isolation of serovars of *Salmonella enterica* from feces of domestic and wild animals in captivity*

PIDONE CL, ZERPA C, CAFFER MI, MORONI MP, COMBA ER

doi.org/10.24215/15142590e028

18-21

Artículos de revisión / Reviews

Paracoccidioidomicosis en caninos y felinos: hallazgos clínicos, diagnóstico y tratamiento

Canine and feline paracoccidioidomycosis. Clinical findings, diagnosis and treatment

MARTÍNEZ CEPEDA GE, REVELO RUALES AP

doi.org/10.24215/15142590e029

22-31

Descripciones de casos / *Case reports*

Mielotoxicidad inducida por estrógenos de origen ovárico y leiomioma vulvar en una perra. Comunicación de caso

*Ovarian oestrogen-induced myelotoxicity and vulvar leiomyoma
in a bitch. Case report*

OSORIO-BAÑOS JC, SERVÍN TRUJILLO MA, GARRIDO BECERRIL IP

doi.org/10.24215/15142590e030

32-37

Información para autores/as

38-45

Evaluación *in vitro* de las actividades antimicrobiana, antioxidante y protectora del ADN, de un extracto etanólico de romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

In vitro evaluation of the antimicrobial, antioxidant and DNA protective activities of an ethanolic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)

CECCHINI MARIA EUGENIA¹, ROMA DARDO ANDRÉS¹, PUSSETTO LUCÍA¹, IGLESIAS DELVIS¹, BASUALDO MARÍA CLAUDIA², AIASSA DELIA ELBA³, MAÑAS TORRES FERNANDO JAVIER^{1*}

1. Laboratorio de Farmacología, Facultad de Agronomía y Veterinaria. 2. Laboratorio de Salud Pública, Facultad de Agronomía y Veterinaria. 3. Laboratorio de Genética y Mutagénesis Ambiental, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Argentina.

* Correo electrónico del autor de contacto: fmanas@ayv.unrc.edu.ar

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar *in vitro* algunos potenciales efectos terapéuticos del extracto etanólico de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), incluyendo sus actividades inhibitoria sobre la formación de biopelícula, antimicrobiana, antioxidante y protectora del ADN. La evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en pocillo y determinaciones de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM), empleando dos bacterias gram (+) y tres gram (-). La determinación de la actividad inhibitoria sobre la formación de biopelícula se realizó con el microorganismo que presentó mayor sensibilidad a la actividad antimicrobiana del romero, empleando una técnica en placa de 96 pocillos. La cuantificación de las actividades antioxidante y antigenotóxica se llevó a cabo sobre leucocitos caprinos, expuestos al extracto y a H₂O₂, mediante cuantificación de lipoperoxidación y daño en el ADN (ensayo cometa), respectivamente. Los resultados obtenidos indican mayor sensibilidad de los microorganismos gram (+) al extracto de romero (CIM/CBM 312,5/1250 y 312,5/2500 µg/ml para *S. aureus* y *S. epidermidis*, respectivamente), en tanto no se halló sensibilidad en los gram (-). Se encontró actividad inhibitoria sobre la formación de biopelícula aun a concentraciones subinhibitorias para *S. aureus* en placa de 96 pocillos. Finalmente, se demostró que el extracto de romero presenta actividad protectora del ADN en células caprinas que podría estar vinculada con un efecto antioxidante. Resulta necesario continuar investigando la capacidad antimicrobiana del extracto de romero para evaluar la posibilidad de emplearlo *in vivo* para el tratamiento de infecciones crónicas relacionadas con la presencia de biopelícula.

Palabras clave

Romero, antibiopelícula, antioxidante, antigenotóxico

Abstract

The aim of the present work was to evaluate the antimicrobial, antibiofilm, antioxidant and DNA protective activities of a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) ethanolic extract. The antimicrobial activity evaluation was carried out by the well diffusion method, and determinations of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) in 96-well plates using two gram (+) and three gram (-) bacteria. Determination of the inhibitory activity on biofilm formation was carried out with the microorganism which showed the highest sensitivity to the antimicrobial activity of rosemary, using a 96-well plate technique. Quantification of antioxidant and antigenotoxic activities was carried out on goat leukocytes exposed to the extract and to H₂O₂, by quantifying lipoperoxidation and DNA damage (comet assay), respectively. Results obtained indicate that there could be a greater sensitivity of the gram (+) microorganisms to the rosemary extract (MIC/MBC 312.5/1250 and 312.5/2500 µg/ml for *S. aureus* and *S. epidermidis*, respectively), while no sensitivity was evidenced in the gram (-) bacteria evaluated. An inhibitory activity on biofilm formation for *S. aureus* in 96-well plate, even at subinhibitory concentrations, was found. Finally, it was demonstrated that the extract of rosemary presents a DNA protective activity in goat cells, which could be linked to an antioxidant effect. Further research on the antimicrobial capacity of rosemary extract is required in order to evaluate the possibility of using it *in vivo* for the treatment of chronic infections related to the presence of biofilm.

Key words

Rosemary, antibiofilm, antioxidant, antigenotoxic

Fecha de recepción: 07/03/2018

ANALECTA VET 2018; Julio-Diciembre; 38(2):1-9

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

Fecha de aprobación: 03/07/2018

doi.org/10.24215/15142590e026

Introducción

Una de las actividades biológicas que se les atribuyen a diversas especies vegetales es la capacidad de actuar sobre la biopelícula, inhibiendo su formación o erradicándola. El término biopelícula fue utilizado por primera vez en 1978 para hacer referencia a una comunidad organizada de bacterias, algas, hongos, protozoarios, protegidos por una matriz formada por una mezcla de compuestos poliméricos, principalmente polisacáridos. Más del 99 % de los microorganismos de la Tierra viven en estas condiciones (Vu *et al.*, 2009), protegidos así de diversas condiciones ambientales adversas, incluyendo el contacto con los antimicrobianos tradicionales. Hasta la fecha, se ha hallado gran cantidad de extractos vegetales y fitoterápicos con capacidad de actuar sobre la biopelícula (Borges *et al.*, 2016; Sasirekha *et al.*, 2015).

Otra importante actividad terapéutica de muchas plantas medicinales se relaciona con su capacidad antioxidante. El estrés oxidativo ha sido asociado con el desarrollo de muchos procesos patológicos en animales, incluyendo enfermedades infecciosas como neumonías, enteritis y sepsis, mastitis, laminitis, enfermedades articulares en general, endotoxemia, endometritis, obstrucciones de las vías aéreas y diversas condiciones relacionadas con el ejercicio (Lykkesfeldt & Svendsen, 2007), por lo que el uso de plantas ricas en antioxidantes se presenta como un objetivo para explorar en el futuro en el ámbito de la nutrición animal (Celi & Gabai, 2015).

Una de las plantas que ha recibido atención en los últimos años, en cuanto a su capacidad antibacteriana, antibiopelícula y antioxidante, es el romero (*Rosmarinus officinalis* L.) (Ceylan *et al.*, 2014). Si bien las propiedades biológicas del romero han sido estudiadas, su potencial actividad terapéutica no ha sido completamente caracterizada (Issabeagloo *et al.*, 2012). Se ha reportado que tanto el extracto o su aceite esencial, así como algunos de sus constituyentes, podrían tener actividad antimicrobiana (Ulbricht *et al.*, 2010). Por otro lado, si bien ha sido estudiada la actividad antioxidante del romero (Afonso *et al.*, 2013), existe poca información disponible sobre los posibles efectos que esta actividad antioxidante podría tener sobre el material genético.

La validación de propiedades terapéuticas y evaluación toxicológica de plantas medicinales es sumamente importante debido a que el desarrollo de nuevos medicamentos desde principios activos de origen vegetal complementará el arsenal cada vez menor de antimicrobianos y antiparasitarios actualmente disponible (Toyang *et al.*, 2012), y a que los polifenoles presentes en muchas de ellas tendrían una gran capacidad antioxidante y antígenotóxica (Genena *et al.*, 2008). El objetivo del presente estudio fue evaluar, en modelos *in*

vitro, algunos de los potenciales efectos terapéuticos del extracto de romero, incluyendo su actividad inhibitoria sobre la formación de biopelícula y sus actividades antimicrobiana, antioxidante y protectora del ADN.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las hojas de romero fueron recolectadas en la localidad de Alpa Corral, Departamento de Río Cuarto, Provincia de Córdoba (32°41'24"S 64°43'16"O), durante el mes de octubre de 2015. La recolección se realizó en horas de la mañana, y las hojas fueron conservadas y posteriormente secadas a temperatura ambiente durante cinco días en hojas de papel absorbente. Una vez transcurrido el período de secado, las hojas se molieron manualmente, y el material molido se almacenó a 5 °C y al abrigo de la luz.

Preparación del extracto etanólico

Cinco gramos de hojas molidas de romero se sometieron a extracción con 100 ml de etanol de 96° al 80 % durante cinco días, al abrigo de la luz y con agitación periódica. Al cabo de esos cinco días se filtró con papel Whatman N° 1. Este extracto se concentró en evaporador rotatorio a 70 °C hasta sequedad y el residuo sólido se disolvió en DMSO o etanol absoluto a una concentración de 200 mg/ml. Las diluciones de trabajo fueron realizadas en solución de DMSO al 5 % en agua para los ensayos microbiológicos (difusión en agar, CIM, CBM, e inhibición en la formación de biopelícula) o en etanol absoluto para los ensayos toxicológicos (TBARs, azul de tripán y ensayo cometa).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Las cepas utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. fueron: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa* (cedidas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales) y *Escherichia coli* (FV 10188), provista por el Departamento de Anatomía de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, ambos departamentos pertenecientes a la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Ensayo de difusión en agar

La actividad antibacteriana del extracto de romero se evaluó empleando la técnica de difusión en agar. Las cepas fueron incubadas en caldo cerebro corazón durante 18 h a 37 °C; estos cultivos fueron luego ajustados a una densidad de 108 UFC/

ml según la escala de McFarland. Posteriormente, se sembraron 100 µl de cada cultivo en placas de Petri con agar Mueller-Hinton (AMH) distribuyéndolo uniformemente con espátula de Drigalsky. En cada placa se realizaron tres pocillos de 6 mm de diámetro perforando el agar con un sacabocado estéril. En uno de los pocillos se colocaron 50 µl del extracto de romero disuelto en DMSO a una concentración de 10 mg/ml, en otro pocillo se colocó idéntico volumen de DMSO como control del vehículo y el último se tomó como control positivo, empleando una solución de ciprofloxacina (Recalcine Laboratories, Chile) de grado HPLC con un 87 % de pureza, a una concentración de 200 µg/ml. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Las pruebas se realizaron por duplicado para cada cepa. La interpretación de los halos y la clasificación de los microorganismos se llevó a cabo siguiendo las directivas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Para el caso del extracto de romero y el DMSO (control de vehículo), se registraron los diámetros de los halos de inhibición con la finalidad de determinar presencia o ausencia de actividad inhibitoria. Esta fue luego cuantificada mediante la determinación de concentraciones inhibitoria y bactericida mínima.

Determinación de la CIM (concentración inhibitoria mínima) y la CBM (concentración bactericida mínima)

La cuantificación de concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas se llevó a cabo para ciprofloxacina y extracto de romero, empleando las cinco cepas en estudio. Para la determinación de la CIM se llevó a cabo el método de microdilución en placa de 96 pocillos descrito por el CLSI (2012). Se colocaron 100 µl de caldo Müeller-Hilton (CMH) en todos los pocillos, exceptuando las tres últimas columnas que fueron reservadas para los controles. En los pocillos de la primera columna se agregaron 10 µl del extracto disuelto en DMSO, logrando una concentración de 10 mg/ml, a partir de la cual se realizaron ocho diluciones seriadas para obtener las concentraciones a evaluar (10 000; 5000; 2500; 1250; 620; 310; 150; 80 y 40 µg/ml). Por último, se completó cada pocillo con 90 µl de la suspensión del microorganismo (108 UFC/ml según la escala de McFarland) y, en todos los casos, el DMSO quedó a una concentración final del 5 %. En la columna de control de vehículo, se colocaron 100 µl de CMH, 90 µl del inóculo y 10 µl de DMSO. La columna de control negativo se completó con CMH (190 µl) y DMSO (10 µl) como control de esterilidad. La columna de control positivo fue completada con 100 µl de CMH y 100 µl de inóculo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 horas.

La CIM para ciprofloxacina se llevó a cabo del mismo modo. En este caso, el antimicrobiano fue disuelto en el mismo caldo Müeller-Hilton y se

evaluaron las siguientes concentraciones: 98,00; 49,00; 24,50; 12,25; 6,12; 3,06; 1,53; 0,76 y 0,38 µg/ml. Se incluyeron un control de esterilidad (control negativo consistente en 200 µl de CMH) y un control positivo (100 µl de CMH y 100 µl de la suspensión del microorganismo).

En todos los casos, la CIM se determinó como la mínima concentración del compuesto evaluado que inhibe completamente el crecimiento bacteriano y se expresó en µg/ml. Para la determinación de la CBM, se tomaron 100 µl de cada uno de los tratamientos que no presentaron turbidez luego de la incubación, así como también de los controles, y se los inoculó sobre una placa con AMH, diseminando con espátula de Drigalsky. La CBM se calculó como la mínima concentración del compuesto que no permite el crecimiento visible de colonias en la placa de Petri.

Inhibición de la formación de biopelícula

La cuantificación de la formación de biopelícula en superficie abiótica fue determinada según el método descrito por Dubravka *et al.* (2010), con algunas modificaciones, para el microorganismo más sensible al extracto de romero según el método de microdilución en placas de 96 pocillos. Para la preparación del inóculo, el microorganismo fue multiplicado en caldo tripticasa-soya (CTS) durante 24 h, a 37 °C. Se tomaron alícuotas de 100 µl de la suspensión del microorganismo (108 UFC/ml según la escala de McFarland) y se inocularon en pocillos de placas de poliestireno de 96 pocillos. Se adicionaron cinco concentraciones del extracto de romero disueltas en DMSO (312,50; 156,25; 78,12; 39,06 y 19,53 µg/ml), y se incluyeron controles negativos (CTS y DMSO sin inóculo) y controles positivos (CTS y DMSO con inóculo). Todos los pocillos recibieron idénticas proporciones de DMSO y CTS. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h, tras lo cual se procedió a remover el contenido y enjuagar los pocillos tres veces con agua destilada estéril. Finalmente se adicionaron a cada pocillo 200 µl de metanol como fijador, y se realizó la tinción con 160 µl de una solución al 0,5 % de cristal violeta. La decoloración se llevó a cabo con una solución de ácido tricloroacético al 30 %, cuya densidad óptica (DO) se midió a 492 nm en un espectrofotómetro. Estas determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Evaluación del balance oxidativo y efectos sobre el ADN

Tratamiento de las muestras

Se obtuvieron muestras de sangre (16 ml en jeringa heparinizada) de tres caprinos machos, adultos y clínicamente sanos. Cada muestra de sangre entera se dividió en 8 tubos y se incubó a 37 °C en movimiento constante mediante agitador orbital con cinco concentraciones del extracto de

romero disuelto en etanol absoluto (312,5; 156,2; 78,1; 39,1 y 19,5 $\mu\text{g/ml}$), un control negativo (sangre con etanol) y un control positivo (sangre que luego fue expuesta únicamente a H_2O_2 30 μM) durante 15 minutos. Transcurrido este período se adicionó H_2O_2 (30 μM) a todos los tubos (excepto al control negativo) y volvió a incubarse a 37 °C durante 30 minutos. Tras el tratamiento de las muestras, estas se fraccionaron en dos tubos (1 ml cada uno), a los que se les realizó la cuantificación de los niveles de lipoperoxidación mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) y del daño en el ADN mediante el ensayo cometa. Este diseño se repitió en tres oportunidades diferentes, tomando las muestras de sangre a los tres animales, durante tres semanas consecutivas.

Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

La cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) se llevó a cabo en el plasma de las muestras de sangre tratadas, según el método descrito por Buege & Aust (1978), modificado por Marcincak *et al.* (2003), utilizando malondialdehído (MDA) como sustancia de referencia. Se utilizó una curva de calibración de concentraciones conocidas de MDA (1,3; 2,9; 4,3; 6,5; 9,7; 14,6 y 29,3 nmol de MDA/ml), obtenido mediante hidrólisis del 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Cada muestra fue analizada por triplicado en las tres muestras de sangre tomadas a cada uno de los tres animales, obteniéndose un total de 27 datos (nueve para cada animal). Los resultados se expresaron como nmol de MDA/ml de plasma.

Aislamiento de leucocitos de sangre periférica caprina

Se aislaron los leucocitos del paquete globular mediante lisis de los eritrocitos. Una vez separado el plasma, se resuspendió el paquete globular en una solución tamponada de lisis (8,3 g/l de NH_4Cl ; 0,5 g/l KHCO_3 y 18,5 mg/l de EDTA). Se dejaron reposar los tubos a 4 °C durante 10 minutos y se centrifugó nuevamente, repitiendo el procedimiento dos veces, para finalmente resuspender los glóbulos blancos obtenidos en PBS (Brendler-Schwaab *et al.*, 1994).

Viabilidad y recuento celular mediante la tinción con azul tripán

Se evaluó la viabilidad celular mediante la tinción con azul tripán (Freshney, 2000). El recuento celular fue realizado por dos observadores y se llevó la suspensión hasta una concentración de 3×10^6 células/ml para realizar el ensayo cometa.

Ensayo cometa

El ensayo fue realizado siguiendo el protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) con algunas modificaciones. Se mezclaron 250 μl de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) (Promega) con 50 μl de la suspensión de leucocitos. De esa mezcla, se colocaron 65 μl en un portaobjetos previamente tratado con 200 μl de agarosa de punto de fusión normal (APFN). Finalmente, se adicionó una tercera capa de ABPF y se depositaron los portaobjetos en recipientes con solución de lisis (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM y Tris 10 mM, 10 % de dimetilsulfóxido y 1 % de tritón) a 4 °C durante una hora. A continuación, se llevó a cabo la corrida electroforética durante treinta minutos a 30 V y 250 mA utilizando una solución alcalina (pH ≥ 11). Los portaobjetos fueron neutralizados mediante el goteo de una solución de neutralización (Tris 0,4 M) a pH 7,5. Por último, se colorearon los portaobjetos con bromuro de etidio y de inmediato se analizaron en el microscopio de fluorescencia. Se tomaron fotografías de, al menos, 100 nucleoides que fueron analizados mediante el programa Comet Score 1.5® Tri Tek Co. El parámetro elegido para evaluar el daño en el ADN fue el momento de la cola. Los cometas sin núcleo detectable o “nubes” no fueron considerados en el análisis.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos y se realizaron a posteriori las pruebas de Tukey y Dunn. El supuesto de normalidad fue corroborado mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizó el coeficiente de Pearson para determinar la relación existente entre la concentración de romero y los parámetros de cada uno de los ensayos utilizados (relación dosis-respuesta), y para evaluar una posible relación entre el daño en el ADN y la lipoperoxidación por especies reactivas del oxígeno.

Resultados

Actividad antimicrobiana

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de difusión en agar indican la existencia de actividad antimicrobiana del extracto de romero frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, obteniéndose halos de inhibición de 9 y 10 mm, respectivamente. No se observaron halos de inhibición para ninguna de las tres bacterias gram negativas evaluadas. Del mismo modo, no se visualizaron halos de inhibición en ninguna de las bacterias expuestas a DMSO como control de vehículo. El antimicrobiano ciprofloxacina produjo un efecto inhibitorio sobre las cinco bacterias evaluadas, obteniéndose halos de inhibición con los siguien-

tes diámetros: *S. aureus*, 10 mm; *S. epidermidis*, 12 mm; *P. aeruginosa*, 21 mm; *E. coli*, 40 mm; *E. coli* (FV 10188), 36 mm.

Fue posible obtener valores de CIM y CBM del extracto de romero únicamente para las bacterias gram positivas. Se observó una CIM de 312,5 y una CBM de 1250 µg/ml para el *S. aureus*, mientras que para el *S. epidermidis* los valores fueron de 312,5 y 2500 µg/ml para la CIM y CBM, respectivamente. La ciprofloxacina no inhibió el crecimiento de *S. aureus* en las concentraciones ensayadas, por lo que no se obtuvieron valores de CIM y CBM para este microorganismo. Para el *S. epidermidis*, se obtuvieron valores de 3,1 y 12,5 µg/ml para CIM y CBM, respectivamente. En cuanto a las bacterias gram negativas, *P. aeruginosa* fue la que exhibió el valor de CIM más bajo, de 1,6 µg/ml; en tanto la CBM llegó a 50 µg/ml. Para las bacterias *E. coli* analizadas, los valores fueron idénticos en ambos casos, obteniéndose valores de CIM de 6,2 µg/ml y CBM de 12,5 µg/ml (Tabla 1).

| Microorganismo | Antimicrobiano | |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| | Ciprofloxacina CIM/CBM (µg/ml) | Extracto de romero CIM/CBM (µg/ml) |
| <i>E. coli</i> | 6,2/12,5 | NI |
| <i>E. coli</i> (FV 10188) | 6,2/12,5 | NI |
| <i>P. aeruginosa</i> | 1,6/50 | NI |
| <i>S. aureus</i> | NI | 312,5/1250 |
| <i>S. epidermidis</i> | 3,1/12,5 | 312,5/2500 |

NI: No inhibió.

Tabla 1. Método de dilución en caldo en placa de 96 pocillos.

De acuerdo con los resultados de CIM y CBM del extracto de romero para los distintos microorganismos analizados, se procedió a seleccionar a *S. aureus* para evaluar la capacidad del extracto de romero de inhibir la formación de biopelícula en placa de 96 pocillos.

La figura 1 muestra una disminución estadísticamente significativa de la formación de biopelícula en cultivos de *S. aureus* tratados con 78,12 (p ≤ 0,01; prueba de Tukey); 156,25 y 312,5 µg/ml (p ≤ 0,001; prueba de Tukey) del extracto de romero en placas de 96 pocillos durante 24 h. También se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el control negativo (sin inóculo) y los pocillos tratados con DMSO (p ≤ 0,001; prueba de Tukey), lo que demuestra que el DMSO en la concentración empleada no inhibe la formación de biopelícula en superficies abióticas.

En la figura 2 se observa una disminución dosis-respuesta (R: -0,9112, prueba de Pearson, p ≤ 0,05) en la formación de biopelícula por *S. aureus* expuesto a distintas concentraciones del extracto etanólico de romero disuelto en DMSO.

Actividad antioxidante

En la tabla 2 se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación en los niveles

de lipoperoxidación en plasma de sangre caprina tratada simultáneamente con H₂O₂ y extracto de romero. No fue posible obtener resultados para la concentración más elevada (312,5 µg/ml) del extracto de romero debido a interferencias en la lectura espectrofotométrica de las muestras provocadas por la generación de hemólisis durante la incubación. Se obtuvieron un total de 9 datos por cada concentración ensayada.

| Extracto de romero (µg/ml) | Nmoles de MDA por ml de plasma | | | | | | | | | Media±DE |
|----------------------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|-------|------|-------|-----------|
| 156,25 | 2,21 | 1,61 | 2,16 | 3,32 | 0,93 | 1,21 | 3,90 | 3,35 | 2,63 | 2,36±1,02 |
| 78,25 | 0,87 | 1,33 | 3,56 | 4,94 | 3,40 | 2,02 | 3,94 | 2,17 | 3,27 | 2,83±1,31 |
| 39,06 | 1,63 | 2,83 | 2,10 | 2,95 | 1,57 | 2,69 | 4,26 | 7,83 | 1,80 | 3,07±1,97 |
| 19,53 | 1,26 | 1,89 | 3,38 | 2,22 | 2,82 | 1,83 | 2,46 | 5,93 | 5,29 | 3,00±1,60 |
| 0,00 | 2,84 | 0,45 | 3,85 | 2,92 | 2,83 | 1,15 | 5,740 | 6,29 | 2,830 | 3,21±1,89 |

Tabla 2. Niveles de malondialdehído (MDA) por ml de plasma en sangre caprina tratada con H₂O₂ y cuatro concentraciones de extracto de romero disuelto en etanol.

Si bien no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, en la figura 3 puede observarse una correlación negativa entre los niveles de MDA/ml de plasma y las concentraciones crecientes de extracto de romero (R: -0,9812, p ≤ 0,01; prueba de Pearson).

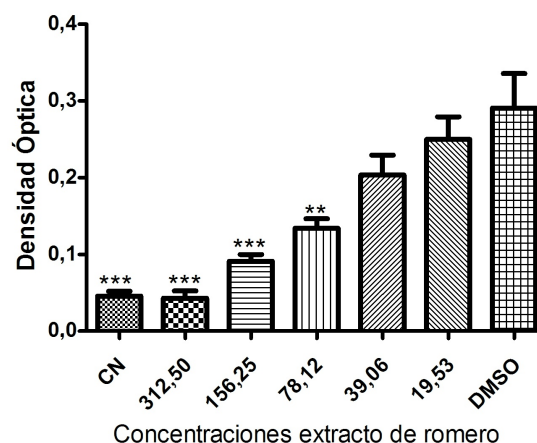


Figura 1. Cuantificación en la formación de biopelícula por *S. aureus* expuesto a distintas concentraciones de extracto de romero en placa de 96 pocillos. Concentraciones expresadas en µg/ml. CN: control negativo. DMSO como control de vehículo. *** p ≤ 0,001; ** p ≤ 0,01; prueba de Tukey.

Viabilidad celular

Los resultados del ensayo de azul tripán arrojaron una viabilidad superior al 90 % en todos los casos.

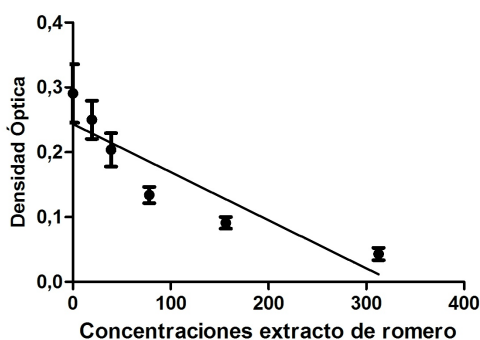


Figura 2. Correlación entre niveles de formación de biopelícula (D.O.) y concentraciones de extracto de romero en cultivos de *S. aureus* en placas de 96 pocillos. R: -0,9112, prueba de Pearson, $p \leq 0,05$.

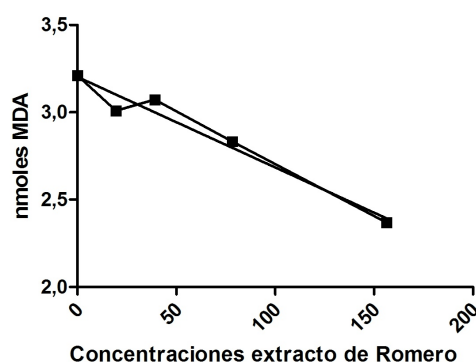


Figura 3. Nmoles de Malondialdehído (MDA) versus concentraciones de extracto de romero en sangre caprina expuesta a H_2O_2 (30 μM). Concentraciones expresadas en $\mu g/ml$. CN: control negativo. Etanol como control de vehículo.

Actividad protectora del ADN

Con respecto al efecto del extracto de romero sobre la integridad del ADN evaluado mediante el ensayo cometa, se encontró una disminución estadísticamente significativa en los niveles de daño en leucocitos expuestos a H_2O_2 y tratados con 156,25 y 312,5 $\mu g/ml$ de extracto de romero ($p \leq 0,05$ y 0,001, respectivamente; prueba de Dunn), con respecto a aquellas células expuestas únicamente a H_2O_2 (Figura 4).

Se observó una disminución dosis-respuesta en los niveles de daño en el ADN en leucocitos expuestos a H_2O_2 y tratados con distintas concentraciones del extracto de romero (R: -0,9247, $p \leq 0,01$; prueba de Pearson) (Figura 5).

Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el extracto etanólico de romero posee actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*. Estos datos concuerdan con los publicados en la bibliografía disponible,

que sugieren que *S. aureus* es uno de los microorganismos más sensibles a los efectos antimicrobianos de los extractos de romero (Klančnik *et al.*, 2009; Santoyo *et al.*, 2005). Balouiri *et al.*, (2014) reportan, del mismo modo, una actividad remarcable de romero contra bacterias gram (+) (*Bacillus subtilis* y *S. aureus*), pero una notable resistencia al mismo extracto por parte de bacterias gram (-) (Balouiri *et al.*, 2014). *S. aureus* es uno de los agentes productores de mastitis de mayor prevalencia, y se cree que aquellas cepas de *S. aureus* con habilidad de producir biopelícula tendrían una mayor capacidad de colonizar las glándulas mamarias que aquellas variantes no productoras de biopelícula (Dubravka *et al.*, 2010). En este sentido, la adhesión a las superficies mucosas sería un paso determinante en el establecimiento de las infecciones persistentes y/o crónicas (Fox *et al.*, 2005).

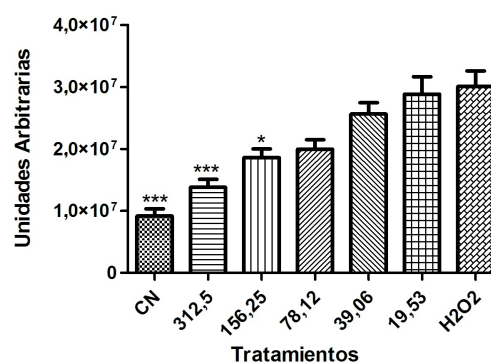


Figura 4. Magnitud del daño en el ADN en leucocitos expuestos a H_2O_2 y tratados con distintas concentraciones de extracto de romero. * $p \leq 0,05$. *** $p \leq 0,001$. Concentraciones expresadas en $\mu g/ml$.

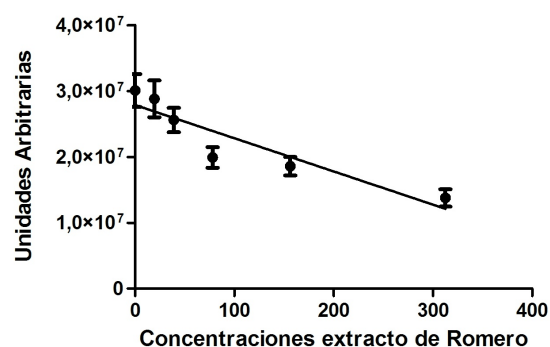


Figura 5. Correlación entre el daño en el ADN en leucocitos expuestos a H_2O_2 y distintas concentraciones de extracto de romero. R: 0,9247, $p \leq 0,01$; prueba de Pearson.

Estudios *in vitro* sugieren que el efecto antimicrobiano del romero podría ser atribuido, al menos en parte, a su habilidad para prevenir la adhesión celular o la producción de biopelícula. El aceite de romero exhibe una potente capacidad de

inhibir la percepción de cuórum (*quorum sensing*), lo cual reduciría la patogenicidad y la resistencia a los antimicrobianos (Ulbricht *et al.*, 2010). En el presente estudio, fue posible demostrar que el extracto etanólico de romero produce una disminución concentración dependiente, en la formación de biopelícula por parte de *S. aureus* en placas de 96 pocillos. Se halló también una diferencia estadísticamente significativa entre el control negativo y los pocillos tratados con DMSO como control de vehículo. Esto demuestra que el DMSO, en la concentración empleada, no tiene efecto sobre la producción de biopelícula y no sería, por lo tanto, el responsable de los efectos hallados. Un aspecto que refuerza la evidencia del efecto inhibitorio del extracto de romero sobre la producción de biopelícula es que tal efecto tiene un comportamiento concentración-efecto demostrando, por tanto, que a mayores concentraciones del extracto la inhibición sobre la producción de biopelícula es mayor. Por último, es importante resaltar que el efecto inhibitorio sobre la formación de biopelícula se consigue aun con concentraciones subinhibitorias (78,12 y 156,25 µg/ml), con las que no se observó ningún efecto sobre el crecimiento planctónico de *S. aureus*.

Se ha investigado también la actividad antioxidante de hojas y extractos de romero, e incluso debido a su contenido en sustancias antioxidantes se los utiliza para reemplazar antioxidantes sintéticos como butilhidroxianisol y butilhidroxitolueno (Martín Zurro, 2004). Algunos de los constituyentes activos del romero son el ácido cafeico, el ácido rosmarínico, el carnosol y el ácido carnósico, todos ellos con aparente actividad antioxidante (Ulbricht *et al.*, 2010). Existe evidencia de que los compuestos antioxidantes del romero, incluyendo polifenoles y flavonas, están presentes en extractos hidroalcohólicos (Avila-Sosa *et al.*, 2011). La actividad antioxidante de los compuestos presentes en la planta y los extractos de romero es atribuida a su habilidad de actuar como agentes reductores y “atrapadores” de radicales libres, así como a la capacidad de formar complejos iones metálicos prooxidantes (Aherne *et al.*, 2007). Ensayos en ratas sugieren que los compuestos fenólicos encontrados en el romero protegen contra el estrés oxidativo, incrementando la actividad de enzimas antioxidantes y reduciendo la oxidación lipídica (Afonso *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se halló una correlación negativa, estadísticamente significativa, entre las concentraciones de romero ensayadas y los niveles de lipoperoxidación cuantificados mediante el ensayo de TBARs. Si bien las diferencias entre los distintos tratamientos no fueron estadísticamente significativas, la relación hallada entre el incremento de concentraciones de extracto de romero y la disminución en los niveles de oxidación lipídica sugiere que este extracto podría tener algún efecto protector sobre las células, evitando por ejemplo el daño oxidativo sobre el ADN.

En ese sentido, y empleando una técnica de gran sensibilidad como el ensayo cometa, fue posible poner en evidencia un efecto protector del extracto de romero sobre el ADN de leucocitos expuestos a H_2O_2 . Del mismo modo, otros autores reportan un efecto antígenotóxico del extracto de romero en cultivos celulares expuestos a peróxido de hidrógeno. En este caso, el efecto protector sobre el ADN fue logrado con concentraciones menores (15 µg/ml) a las determinadas como antígenotóxicas en el presente estudio (Aherne *et al.*, 2007). Esta diferencia podría explicarse debido que el tiempo de exposición al extracto de romero empleado por estos autores fue de 24 horas, en tanto que en nuestro caso el tiempo de exposición previo fue de tan solo 15 minutos. Otros autores sugieren que el efecto protector del extracto de romero sobre el ADN podría deberse a su efecto antioxidante o a la capacidad de disminuir la formación de aductos, entre otros (Ulbricht *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el extracto de romero tiene la capacidad de actuar contra una bacteria de interés en medicina veterinaria como el *S. aureus*, y de impedirle (aún a concentraciones subinhibitorias) la producción de biopelícula. Este aspecto es sumamente importante si consideramos que una de las posibles causas por las que se producen infecciones crónicas, por ejemplo en la glándula mamaria de animales productores de leche, es justamente la capacidad de este microorganismo de generar biopelículas in vivo (Dubravka *et al.*, 2010). Por otro lado, fue posible demostrar que el extracto de romero, a las mismas concentraciones que presenta actividad antimicrobiana, produce también un efecto protector del material genético, disminuyendo los niveles de daño en el ADN generados por la exposición a peróxido de hidrógeno. Teniendo en cuenta lo expuesto, se hace necesario continuar investigando la capacidad antimicrobiana del extracto de romero contra bacterias productoras de mastitis, con la finalidad de evaluar la posibilidad de emplear el extracto de romero in vivo en forma local para el tratamiento de infecciones crónicas relacionadas con la presencia de biopelícula.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Res. Rectoral 344/15.

Conflicto de intereses

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

Bibliografía

Aboelmaaty AM, Mansour MM, Ezzo OH, Hamam AM. 2008. Some reproductive and metabolic responses to food restriction and re-feeding in Egyptian native goats. *Global Veterinaria*. 2:225-32.

Afonso MS, de O Silva AM, Carvalho EB, Rivelli DP, Barros SB, Rogero MM, Lottenberg AM, Torres RP, Mancini-Filho J. 2013. Phenolic compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. *Nutrition and Metabolism (Londres)*. 10:19-25.
doi: [10.1186/1743-7075-10-19](https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-19)

Aherne A, Kerry J, O'Brien N. 2007. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*. 97:321-28.
doi: [10.1017/S0007114507250469](https://doi.org/10.1017/S0007114507250469)

Avila-Sosa R, Navarro-Cruz AR, Vera-López O, Dávila-Márquez RM, Melgoza-Palma N, Meza-Pluma R. 2011. Romero (*Rosmarinus officinalis*): Una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*. 52:23-6.

Balouiri M, Sadiki M, Ouedrhiri W, Farah A, Abed SEL, Koraichi SI. 2014. Antibacterial activity of extracts from *Salvia officinalis* and *Rosmarinus officinalis* obtained by sonication and maceration methods. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6:167-70.

Borges A, Abreu AC, Dias C, Saavedra MJ, Borges F, Simões M. 2016. New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. *Molecules*. 21 (7):1-41.
doi: [10.3390/molecules21070877](https://doi.org/10.3390/molecules21070877)

Brendler-Schwaab SY, Schmezer P, Liegibel U, Weber S, Michalek K, Tompa A, Pool-Zobel BL. 1994. Cells of different tissues for in vitro and in vivo studies in toxicology: Compilation of isolation methods. *Toxicology in Vitro*. 8:1285-302.
doi: [10.1016/0887-2333\(94\)90122-8](https://doi.org/10.1016/0887-2333(94)90122-8)

Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52:302-10.

Celi P, Gabai G. 2015. Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: the role of protein oxidation. *Frontiers in Veterinary Sciences*. 2:1-13.
doi: [10.3389/fvets.2015.00048](https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00048)

Ceylan O, Ugur A, Sarac N, Ozcan F, Baygar T. 2014. The *in vitro* antibiofilm activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil against multiple antibiotic resistant *Pseudomonas* sp. and

Staphylococcus sp. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 12:82-6.

Clinical and Laboratory Standard Institute. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – 9^o Ed.*, Wayne, Pennsylvania.

Dubravka M, Lazic S, Branka V, Jelena P, Bugarski D, Zorica S. 2010. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta Veterinaria Brunensis*. 60:217-26.
doi: [10.2298/AVB1003217M](https://doi.org/10.2298/AVB1003217M)

Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology*. 107:295-9.
doi: [10.1016/j.vetmic.2005.02.005](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.02.005)

Freshney RI. 2000. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 4^o Ed. Wiley.

Genena AK, Hense H, Smania Junior A, de Souza SM. 2008. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 28:463-9.
doi: [10.1590/S0101-20612008000200030](https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000200030)

Issabeagloo E, Kermanizadeh P, Taghizadieh M, Foroughi R. 2012. Antimicrobial effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils against *Staphylococcus* spp. *African Journal of Microbiology Research*. 6:5039-42.
doi: [10.5897/AJMR12.741](https://doi.org/10.5897/AJMR12.741)

Klancnik A, Guzej B, Kolar MH, Abramovic H, Mozina SS. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*. 72:1744-52.
doi: [10.4315/0362-028X-72.8.1744](https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1744)

Lykkesfeldt J, Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal*. 173:502-11.
doi: [10.1016/j.tvjl.2006.06.005](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.06.005)

Marcincak S, Sokol J, Turek P, Rozanska H, Dicakova Z, Mate D, Popelka P, Korim P. 2003. Comparative evaluation of analytical techniques to quantify malondialdehyde in broiler meat. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 47:491-6.

Martín Zurro A. 2004. Efecto del uso de ultrasonidos en la extracción de plantas labiadas combinando etanol y CO₂ supercrítico. *Atención Primaria*. 34 (8):1-46.

Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibañez E, Señoráns FJ, Reglero G. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*. 68:790-5.
[doi: 10.4315/0362-028X-68.4.790](https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.4.790)

Sasirekha BM, Megha DS, Sharath M, Soujanya R. 2015. Study on effect of different plant extracts on microbial biofilms. *Asian Journal of Biotechnology*. 7:1-12.
[doi: 10.3923/ajbkr.2015](https://doi.org/10.3923/ajbkr.2015)

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175:184-91.
[doi: 10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

Toyang NJ, Ateh EN, Keiser J, Vargas M, Bach H, Tane P, Sondengam LB, Davis H, Bryant J, Verpoorte R. 2012. Toxicity, antimicrobial and

anthelmintic activities of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) crude extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 144:700-4.
[doi: 10.1016/j.jep.2012.10.016](https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.016)

Ulbricht C, Abrams TR, Brigham A, Ceurvels J, Clubb J, Curtiss W, Kirkwood CD, Giese N, Hoehn K, Iovin R, Isaac R, Rusie E, Serrano JMG, Varghese M, Weissner W, Windsor RC. 2010. An evidence-based systematic review of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of Dietary Supplements*. 7:351-413.
[doi: 10.3109/19390211.2010.525049](https://doi.org/10.3109/19390211.2010.525049)

Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*. 14:2535-54.
[doi: 10.3390/molecules14072535](https://doi.org/10.3390/molecules14072535)

Separación por sexo y caracteres productivos en un cruzamiento experimental de tres vías de pollo campero

Effect of separate sex growing on productive traits in a three-way experimental cross of the free-range chicken

ANTRUEJO ALEJANDA EDIT^{1*}, SAVOY JUAN PABLO¹, MONTENEGRO AGUSTINA²,
SAVOY JULIO CESAR¹, CANET ZULMA EDIT^{2,4}, DOTTAVIO ANA MARÍA^{2,3},
DI MASSO RICARDO JOSÉ^{2,3}

1. Cátedra de Producción Avícola y Pilíferos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. 2. Cátedra de Genética. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. 3. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Pergamino “Ing. Agr. Walter Kugler” (INTA-EEA Pergamino). 4. Carrera del Investigador Científico de la Universidad Nacional de Rosario (CIC-UNR).

* Correo electrónico de la autora de contacto: aantruej@fveter.unr.edu.ar

Resumen

El pollo Campero INTA es un ave con menor velocidad de crecimiento que los parrilleros comerciales cuya producción se encuentra protocolizada, si bien dicho protocolo no establece condiciones referidas a la modalidad de crianza mixta o con separación de sexos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de dicha práctica sobre el patrón dinámico de crecimiento, la uniformidad por precisión, la conformación corporal y los caracteres a la faena en el cruzamiento experimental de tres vías Campero Casilda. Las aves se criaron en confinamiento como un único grupo hasta los 35 días y bajo dos modalidades (lotes mixtos y lotes de un único sexo) durante la etapa con acceso a parque, entre los 36 días y la faena a los 77 días de edad. La separación por sexo fue ventajosa para los machos, en tanto al crecer solos lo hicieron hacia un mayor peso asintótico y con menor tasa de maduración, lo que implica mayor eficiencia alimenticia. Este patrón no afectó el peso a la edad de faena ni el rendimiento y se tradujo en mayor proporción de los cortes de valor carnicero y menor proporción de grasa. Las hembras criadas en lotes por separado crecieron hacia un menor peso asintótico, con mayor tasa de maduración, relación desfavorable en términos de eficiencia alimenticia, alcanzaron menor peso a la edad de faena y, si bien, presentaron menor contenido de grasa e igual proporción de pata muslo, manifestaron una leve reducción en la proporción de pechuga y en el rendimiento.

Palabras clave

Crecimiento, uniformidad, conformación, caracteres a la faena

Abstract

Campero INTA is a type of bird with a slower growth rate than commercial broilers with a standardised production protocol; however, the protocol does not establish conditions related to sex separation during breeding. The aim of this work was to evaluate the effect of sex separation on body growth pattern, uniformity by precision, body conformation and slaughter traits in the three-way experimental cross Campero Casilda chickens. The birds were kept in confinement as a single group until 35 days of age and then separated into two treatments (mixed and single sex) during the free-range stage, between 36 days and slaughter at 77 days of age. Sex separation was advantageous for males which evidenced greater asymptotic weight and lower maturation rate, suggesting better feed efficiency. In addition, sex separation in males did not affect body weight at slaughter age or carcass yield and resulted in a greater proportion valuable muscle cuts and a lower proportion of body fat. On the other hand, females raised alone, evidenced lower asymptotic weight, and a higher maturation rate, suggesting lower feed efficiency. In addition, they reached a lower weight at slaughter age and, although they had a lower fat content and an equal proportion of thigh, showed a slight decrease in the proportion of breast and a reduction in yield.

Key words

Growth, uniformity, body conformation, slaughter traits

Fecha de recepción: 08/06/2018

ANALECTA VET 2018; Julio-Diciembre; 38(2):10-17

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

Fecha de aprobación: 03/11/2018

doi.org/10.24215/15142590e027

Introducción

La estrategia de mejoramiento genético para la denominada producción avícola orgánica, ecológica y/o de campo incluye opciones que van desde el diseño de programas independientes con producción de biotipos especiales hasta la integración de genotipos convencionales de la avicultura industrial a las nuevas propuestas de manejo (Dottavio & Di Masso, 2010). El pollo Campero INTA es un ave con menor velocidad de crecimiento que los parrilleros comerciales, apto para su utilización en estos sistemas alternativos, cuya producción se encuentra protocolizada (Bonino, 1997). Dicho protocolo establece condiciones por cumplir para la certificación del producto obtenido, similares a las descritas para el pollo Label Rouge francés (Sauveur, 1997). Entre ellas, pueden mencionarse las densidades de aves permitidas y las edades mínimas y máximas de faena, sin referirse específicamente a la modalidad de crianza mixta o con separación de sexos. En los sistemas intensivos dedicados a la producción de pollos parrilleros se considera deseable que las aves expresen, con un elevado grado de ajuste, el patrón de crecimiento promedio propio de su estirpe. Es por ello que, si bien el manejo pretende maximizar la ganancia de peso, es esperable que este objetivo se logre con la menor dispersión posible, de manera tal que pueda asegurarse una alta uniformidad del lote (van de Ven, 2008). Si bien en los sistemas alternativos la uniformidad es menos trascendente que en la avicultura industrial, ya que la imagen del pollo de campo está asociada con una cierta variabilidad en el tamaño y, por ende, en el peso corporal, esta sigue siendo una característica deseable por su vinculación con aspectos de manejo. Uno de los factores que atenta contra la uniformidad de los lotes mixtos es el dimorfismo sexual evidente en las aves para carne, incluido el pollo campero (Librera *et al.*, 2012) y observable en el Campero Casilda (Canet *et al.*, 2017; Savoy *et al.*, 2014), un tipo de ave que se faena en una edad que duplica la de los pollos parrilleros actuales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la separación por sexos versus la cría en lotes mixtos sobre el patrón dinámico de crecimiento, la uniformidad por precisión del peso corporal, la conformación corporal y los caracteres a la faena en un cruzamiento experimental de tres vías de pollo campero.

Materiales y métodos

Se evaluaron machos y hembras del híbrido experimental de tres vías Campero Casilda, producto del cruzamiento de gallos de la población sintética AH' (50 % Hubbard 50 % estirpe Anak grises) con hembras derivadas del cruzamiento simple entre gallos de la población sintética ES (87,5 % Cornish Colorado, 12,5 % Rhode Island Red) y gallinas de la población sintética A (75 %

Cornish Colorado 25 % Rhode Island Red). Las poblaciones mencionadas se generaron y mantienen en la Sección Aves de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) "Ing. Agr. Walter Kugler" del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Pergamino, donde se llevaron a cabo los cruzamientos y las incubaciones. En el momento del nacimiento, los pollitos se sexaron por cloaca, se identificaron con banda alar numerada y se vacunaron contra la enfermedad de Marek. Las aves del ensayo se criaron en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario (UNR) de acuerdo con las especificaciones del protocolo para la producción de pollos camperos (Bonino, 1997) como un único grupo, en confinamiento, hasta los 35 días de edad y bajo dos modalidades (lotes mixtos y lotes de un único sexo; n= 16 aves de cada sexo por modalidad de crianza) durante la etapa con acceso a parque, entre los 36 días y la faena a los 77 días de edad.

Patrón dinámico del peso corporal

Se registró el peso corporal individual de todas las aves con intervalos semanales entre el nacimiento y la faena. Los datos longitudinales peso corporal-edad cronológica se ajustaron por regresión no lineal con la función sigmoidea de Gompertz (Fitzhugh, 1976):

$$W_t = A \exp(-b \exp(-kt))$$

donde: W_t = peso corporal (g) en el tiempo t , A = peso corporal maduro o asintótico (g), b = parámetro de posición (constante de integración sin significado biológico), k = tasa de maduración o de aproximación al valor asintótico A (g^{-1}) y t = edad en semanas. Para la evaluación de la bondad de los ajustes se utilizaron tres criterios: la convergencia de las iteraciones en una solución, el valor del coeficiente de determinación no lineal ajustado (R^2) y la aleatoriedad en la distribución de los residuales determinada con un test de rachas o ciclos (Sheskin, 2011). A los efectos del análisis estadístico los valores individuales de los estimadores de los dos parámetros con significado biológico (A y k) se consideraron nuevas variables aleatorias.

Uniformidad en peso corporal

La uniformidad del peso corporal de cada grupo en los mismos intervalos de tiempo (11 valores) se evaluó a partir del cálculo del coeficiente de variación para peso corporal [desvío estándar fenotípico relativizado por el valor del promedio del carácter y expresado como porcentaje (Toudic, 2009)]. Los lotes se categorizaron en: muy uniformes ($CV < 8\%$), uniformes ($CV = 8-10\%$), de uniformidad moderada ($CV = 10-12\%$) y de uniformidad deficiente ($CV > 12\%$) tomando

como base una escala utilizada por una compañía comercial (Aviagen, 2010). A partir de los 35 días de edad se trabajó con tres grupos experimentales: machos solos, hembras solas y lotes mixtos. Los grupos controlados a partir de los 35 días estuvieron conformados por 32 aves. Dado que el lote mixto contó con 16 machos y 16 hembras, para los efectos de los cálculos solo se consideraron 16 de las 32 aves totales controladas en los lotes de un único sexo.

Conformación corporal prefaena

El día previo a la faena se registraron las siguientes variables sobre el animal vivo (Latshaw & Bishop, 2001):

- longitud de la caña,
- longitud de la tibia,
- longitud de la pechuga (distancia en cm entre el vértice de la quilla del esternón y el sitio de unión de las clavículas),
- ancho de la pechuga (ancho del tórax, en cm, a la altura de la unión de las clavículas, según Mallo *et al.*, - 1999),
- longitud dorsal (longitud en cm medida con cinta métrica y con el ave de pie, desde el nadir de la curva que forma el cuello con el cuerpo hasta la base de la cola),
- longitud dorsal parcial (porción de la longitud anterior tomada en su inicio a la altura del húmero y en su porción final a la altura del fémur),
- distancia interhúmeros,
- distancia interfémures,
- circunferencia corporal (longitud, en cm, a la altura de la porción anterior del borde del esternón, pasando por debajo de las alas y por delante de las patas).

Sobre la base de dichas mediciones, para cada ave se calcularon cuatro índices de conformación (Dottavio *et al.*, 2010): índice 1 (longitud de la tibia/longitud de la caña), índice 2 (longitud de la pechuga/ancho de la pechuga, indicador de la forma de dicho corte), índice 3 (ancho entre húmeros/ancho entre fémures, indicador de la conformación del ave vista desde dorsal) e índice 4 (circunferencia corporal/longitud dorsal, indicador de la conformación volumétrica del ave).

Caracteres en la faena

A la faena se registró, en 16 aves de cada sexo por modalidad de crianza, el peso corporal PC (g), el peso eviscerado PE (g), el peso (g) de dos cortes valiosos (pechuga con hueso y pata muslo derecho) y el peso (g) de la grasa abdominal. El porcentaje de cada corte (pechuga: PP y pata muslo: PM) y de la grasa abdominal (G) se calculó como proporción del peso eviscerado. El rendi-

miento se calculó como [(peso eviscerado/peso pre-faena) x 100].

Análisis estadístico

El efecto del sexo, del tipo de crianza y de la interacción entre ambos factores principales sobre los estimadores de los parámetros de la función de Gompertz con significado biológico (A y k) y los índices de conformación corporal, el peso eviscerado, las proporciones de pechuga, de pata muslo y de grasa y sobre el rendimiento a la faena se evaluaron con un análisis de la variancia correspondiente a un diseño completamente aleatorizado con un experimento factorial 2x2 (dos sexos x dos modalidades de crianza).

Resultados

Patrón dinámico del peso corporal

La Tabla 1 resume el comportamiento de los estimadores de la función de Gompertz con significado biológico. Se observaron efectos significativos de la interacción entre sexo y modalidad de crianza sobre el peso corporal asintótico ($F = 16,0$; $P = 0,0002$) y sobre la tasa de maduración para el peso corporal ($F = 17,5$; $P < 0,0001$). Esta observación relativiza la interpretación de los resultados sobre los efectos principales, si bien la modalidad de crianza no afectó en forma significativa el comportamiento de ninguno de los dos parámetros (A: $F = 0,58$; $P = 0,448$; k: $F = 3,0$; $P = 0,088$) y el sexo afectó a ambos de acuerdo con lo esperado: mayor peso corporal asintótico en machos (machos: 4820 g vs. hembras: 3346 g - $F = 173$; $P = 0,0002$) y mayor tasa de maduración promedio para peso corporal en hembras (machos: 0,0308 vs. hembras: 0,0331; $F = 8,52$; $P = 0,005$). En la figura 1 se observan las trayectorias de las curvas de crecimiento de machos y hembras bajo las dos modalidades de crianza.

Tabla 1. Estimadores de los parámetros de la función de Gompertz de machos y hembras Campero Casilda criados en lotes mixtos y con separación de sexos.

| | Machos | | Hembras | |
|--|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | Cria mixta | Sexos separados | Cria mixta | Sexos separados |
| A: Peso corporal asintótico (g) | 4639±145 | 5001±110 | 3612±106 | 3079±74 |
| k: Tasa de maduración (g ⁻¹) | 0,0317±0,00075 | 0,0299±0,00063 | 0,0308±0,00085 | 0,0353±0,0008 |

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± Error Estándar. Tamaño muestral: n = 16 aves por grupo experimental.

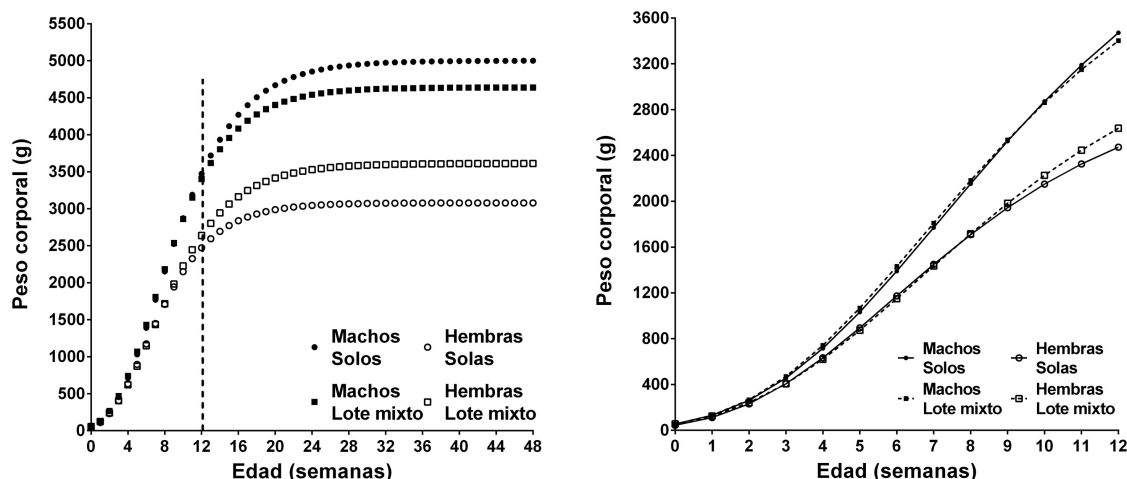


Figura 1. Curvas de crecimiento de aves machos y hembras Campero Casilda bajo dos modalidades de crianza durante las etapas de recría y terminación (Izquierda: crecimiento teórico hasta la madurez. Derecha: crecimiento durante el ciclo de producción).

Uniformidad en peso corporal

En la figura 2 se observa el comportamiento del indicador de uniformidad por precisión para peso corporal en las aves de cada sexo bajo las dos modalidades de cría durante las etapas de recría y terminación. De acuerdo con el criterio mencionado, el lote mixto mostró, a lo largo de todo el ciclo, una uniformidad deficiente ($CV > 12\%$) explicable en términos del dimorfismo sexual propio de la especie. Cuando, a partir de los 35 días de edad, coincidentemente con el pasaje de la cría en confinamiento a la cría con acceso a parque, las aves se separaron en lotes por sexo, se constató una mejora sustancial en los valores del indicador, mostrando, tanto el lote de machos como el lote de hembras, valores del CV inferiores al 8% (lotes muy uniformes), particularmente en el caso de los machos con valores iguales o menores al 6%. Las aves criadas en lotes mixtos durante esta etapa mantuvieron bajos niveles de uniformidad con valores crecientes del coeficiente de variación del peso corporal.

Conformación corporal prefaena

La Tabla 2 resume los valores de los índices de conformación evaluados en el día previo a la faena. El efecto de la interacción entre el sexo y la modalidad de crianza solo fue significativo en el caso del índice 1 ($F = 6,33$; $P = 0,015$), atribuible a un aumento del mismo en las hembras criadas en lotes mixtos, efecto no evidente en los machos. Independientemente del manejo, los machos presentaron mayor valor promedio del índice 2 que las hembras (2,140 vs. 1,910; $F = 23,5$; $P < 0,0001$) e independientemente del sexo, las aves en lotes mixtos presentaron menor valor promedio del índice 2 (2,048 vs. 2,002; $F = 16,0$; $P = 0,0002$) y

a mayor valor del índice correspondieron pechugas más alargadas. No se observó efecto significativo del sexo sobre el valor promedio del índice 3 ($F = 0,011$; $P = 0,931$) que en todos los casos fue menor a 1, indicando aves que tienden a ensancharse hacia caudal. Independientemente del sexo, las aves criadas en lotes mixtos presentaron menores valores promedio del índice (0,914 vs. 0,931; $F = 4,65$; $P = 0,0352$) con cuerpos más angostos hacia craneal. La modalidad de crianza no afectó en forma significativa ($F = 0,021$; $P = 0,878$) los valores del índice 4. Independientemente del manejo de la alimentación las hembras presentaron cuerpos más voluminosos y los machos cuerpos más estilizados (1,390 vs. 1,268; $F = 38,3$; $P < 0,0001$).

Tabla 2. Índices de conformación a la edad de faena, de machos y hembras Campero Casilda criados en lotes mixtos y con separación de sexos.

| | Machos | | Hembras | |
|----------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | Cría mixta | Sexos separados | Cría mixta | Sexos separados |
| Índice 1 | 1,429 ± 0,0223 | 1,431 ± 0,0148 | 1,586 ± 0,0293 | 1,486 ± 0,0083 |
| Índice 2 | 2,211 ± 0,0549 | 2,068 ± 0,0591 | 1,792 ± 0,0181 | 2,028 ± 0,0461 |
| Índice 3 | 0,916 ± 0,0070 | 0,928 ± 0,0097 | 0,912 ± 0,0090 | 0,934 ± 0,0058 |
| Índice 4 | 1,274 ± 0,0174 | 1,261 ± 0,0151 | 1,384 ± 0,0202 | 1,395 ± 0,0238 |

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± Error Estándar. Tamaño muestral: $n = 16$ aves por grupo experimental.

Caracteres productivos a la faena

Los valores correspondientes a los caracteres productivos evaluados en el momento de la faena se presentan en la Tabla 3. Se observó un efecto no significativo de la interacción ($F = 1,62$; $P = 0,208$) y efectos significativos del sexo ($F = 239$; $P < 0,0001$) y del manejo ($F = 3,88$; $P =$

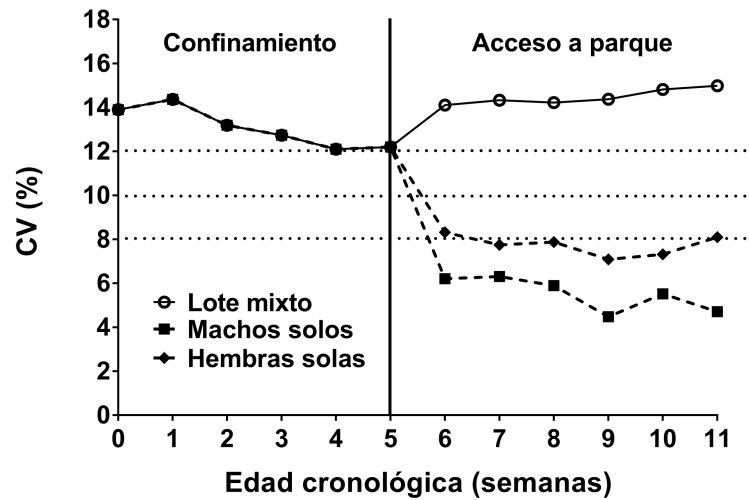


Figura 2. Uniformidad por precisión para peso corporal en aves machos y hembras Campero Casilda bajo dos modalidades de crianza durante las etapas de recría y terminación.

0,054) sobre el peso corporal prefaena y el peso eviscerado: los mayores valores promedio correspondieron a los machos y a las aves criadas en lote mixto. La interacción (sexo x manejo) fue estadísticamente significativa en el caso de la proporción de pechuga ($F = 4,89$; $P = 0,031$) y, en menor medida, sobre el peso de pata muslo ($F = 3,54$; $P = 0,065$) atribuible a que la modalidad de crianza sólo afectó el valor promedio del carácter en machos. Con respecto a la proporción de grasa abdominal, ningún efecto estadísticamente significativo (sexo: $F = 0,51$; $P = 0,480$; manejo: $F = 1,13$; $P = 0,292$; interacción: $F = 0,01$; $P = 0,991$). No se observó interacción (sexo x manejo) sobre el rendimiento a la faena ($F = 2,08$; $P = 0,154$). El valor promedio de este carácter no se vio afectado por la modalidad de crianza ($F = 2,00$; $P = 0,162$) pero sí por el sexo ($F = 5,13$; $P = 0,027$), de manera que el mayor rendimiento a la faena correspondió a las hembras (72,6 % vs. 71,8 %)

Discusión

El pollo Campero INTA es un tipo de ave para carne producido a partir de cruzamientos entre poblaciones sintéticas propias del núcleo genético de la Sección Aves en la EEA de INTA en Pergamino. El protocolo para su producción (Bonino, 1997) no incluye restricciones, ni tampoco recomendaciones, acerca de la conveniencia o no de criar a las aves de ambos sexos como un único lote o, por el contrario, hacerlo en lotes por separado.

El pollo Campero Casilda es un cruce experimental, en evaluación como potencial genotipo doble propósito destinado para propuestas de avicultura alternativa con respecto al modelo intensivo. En este contexto, se requiere de información que posibilite una toma de decisiones fundadas con respecto a las prácticas de manejo. Las hembras que se utilizan como ponedoras deben criarse separadas de los machos, ya que por su condición de aves pesadas deben ser restringidas en el aporte de nutrientes, mientras que si su destino es la producción de carne se las podría criar conjuntamente con ellos, con alimentación a voluntad. Los principales efectos de la práctica de cría de machos y hembras en conjunto o por separado se relacionan con potenciales modificaciones en el patrón global de crecimiento (peso corporal, uniformidad y conformación) y en el rendimiento, total y por cortes, en la faena. El efecto de la interacción entre sexo y modalidad de crianza sobre los estimadores de los parámetros de la función de Gompertz puso de manifiesto la diferente respuesta de machos y hembras ante el cambio de manejo. La cría en lotes mixtos afectó en forma negativa el peso corporal asintótico estimado en el caso de los machos y en forma positiva en el caso de las hembras. En consecuencia, el dimorfismo sexual en peso resultó ser mayor

Tabla 3. Caracteres a la faena de machos y hembras Campero Casilda criados en lotes mixtos y con separación de sexos.

| | Machos | | Hembras | |
|-----------------------------------|-------------|-----------------|------------|-----------------|
| | Cría mixta | Sexos separados | Cría mixta | Sexos separados |
| Peso corporal prefaena (g) | 3204± 51 | 3186±37 | 2475±52 | 2339±45 |
| Peso corporal eviscerado (g) | 2300± 39 | 2287±25 | 1811±44 | 1685±30 |
| Proporción de pechuga (%) | 24,6± 0,36 | 26,4±0,33 | 27,5±0,59 | 27,0±0,62 |
| Proporción de pata-muslo (%) | 15,5± 0,34 | 16,3±0,20 | 14,5±0,12 | 14,5±0,13 |
| Proporción de grasa abdominal (%) | 2,39± 0,184 | 2,13±0,178 | 2,22±0,328 | 1,96±0,247 |
| Rendimiento a la faena (%) | 71,8± 0,37 | 71,8±0,22 | 73,1±0,49 | 72,1±0,26 |

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± Error Estándar. Tamaño muestral: n = 16 aves por grupo experimental.

en las aves criadas en lotes de sexo separado (peso de las hembras = 62 % del peso de los machos) que en aves criadas en lotes mixtos (peso de las hembras = 78 % del peso de los machos). El efecto de la interacción sobre la tasa de maduración, por su parte, se explica porque los machos criados en lotes mixtos presentaron mayor tasa de maduración que aquellos criados en lotes separados por sexo, mientras que en las hembras se observó la respuesta inversa (menor tasa de maduración en lotes mixtos). Como resultado de estos comportamientos, las hembras presentaron mayor tasa de maduración que los machos criados por separado mientras que dicha diferencia se hizo no significativa cuando las aves se criaron en lotes mixtos. Por lo tanto, en lo que al patrón de crecimiento se refiere, este fue más favorable (mayor peso asintótico y menor tasa de maduración) para los machos cuando se los crió solos. En el caso de las hembras, si bien cuando se las crió en lotes mixtos crecieron hacia un mayor peso asintótico lo hicieron con menor velocidad, lo que redujo el efecto final sobre el peso corporal desde un 17 % en la asíntota hasta un 5,8 % en la edad de sacrificio. Esta evidencia indica la conveniencia de separar a las aves por sexo, separación que podría llevarse a cabo al trasladarlas a los alojamientos con acceso a parque. En ese momento la expresión de caracteres sexuales secundarios posibilita llevar a cabo la selección obviando la necesidad del sexado por inspección de la cloaca en el nacimiento, que requiere de personal adiestrado y supone un aumento en el costo del pollito BB. Esta separación, como es evidente dado el dimorfismo sexual de la especie, se traduce en una mayor uniformidad de los lotes. Las aves de uno y otro sexo criadas en lotes mixtos tienden a mostrar una reducción en las medidas lineales que definen su conformación, por lo que la modalidad de manejo afectó la conformación corporal de las aves evaluada a partir del cálculo de cuatro índices. Pese a los significativos estadísticos observados en los índices de conformación, la trascendencia biológica de tales modificaciones queda minimizada ante lo exiguo de las diferencias observadas y, en tal sentido, la importancia productiva de tales modificaciones está vinculada con un potencial impacto sobre los cortes de interés carnívoros y el rendimiento en la faena. Al respecto, la cría de las aves de uno y otro sexo por separado no afecta ni el rendimiento ni la proporción de grasa en la faena. Independientemente del sexo, la cría por separado afecta negativamente el valor del peso corporal prefaena y del peso eviscerado con una reducción de mayor magnitud en el caso de las hembras (5,8 % y 7,5 %, respectivamente) que en los machos (0,6 %). La presencia de interacciones significativas determina una respuesta favorable sobre la proporción de pechuga en las hembras (aumento) y desfavorable en el caso de los machos (disminución) tanto sobre este corte como sobre la proporción de pata muslo.

Sam *et al.* (2010), trabajando con pollos parrilleros, no encontraron evidencia de que la

separación por sexos presentara ventajas cuando el ciclo productivo finalizaba a las 8 semanas de edad. Por el contrario, cuando dicho ciclo se extendía más allá de la edad mencionada la práctica de criar a los machos separados de las hembras se presentaba como ventajosa debido a un mejor desempeño de los machos. En coincidencia con esta última observación, y tomando en consideración la duración del ciclo productivo del pollo campero, se concluye que la práctica de separar a las aves Campero Casilda por sexo es ventajosa para los machos. Al crecer solos, lo hacen hacia un mayor peso asintótico y con menor tasa de maduración, lo que implica una mayor eficiencia alimenticia, patrón que, sin afectar el peso a la edad de faena ni el rendimiento, se traduce en una mayor proporción de los cortes de valor carnívoros y menor proporción de grasa. Este comportamiento es coincidente con el informado por Laseinde y Oluyemi (1994) quienes, si bien concluyen que la diferencia no se traduce en ventajas significativas de la práctica, observaron mayor superioridad porcentual de los machos cuando se los cría separados de las hembras. Por su parte, las hembras criadas en lotes por separado crecen hacia un menor peso asintótico y con mayor tasa de maduración, relación desfavorable en términos de eficiencia alimenticia, alcanzan un peso menor a la edad de faena y, si bien, presentan menor contenido de grasa y la misma proporción de pata muslo, presentan un leve deterioro en la proporción de pechuga y una reducción en el rendimiento. La mayor relación de conversión de las aves criadas en sistemas semiextensivos representa un aspecto determinante para la adopción de dicha modalidad productiva por parte de aquellos interesados en aprovechar un nicho del mercado que demanda productos generados sobre la base del respeto por el bienestar animal. El alimento representa el mayor componente de los costos y ello torna imprescindible contar con un mayor precio de venta para asegurar la rentabilidad del emprendimiento. En este sentido, el sexo de las aves de crecimiento lento juega un papel de mayor impacto que su genotipo. Dottavio *et al.* (2013) estimaron la eficiencia alimenticia de machos y hembras de los híbridos experimentales de tres vías Campero Casilda y Campero Pergamino en comparación con el cruzamiento simple Campero INTA como genotipo de referencia, entre los 42 y los 77 días de edad. Independientemente del sexo, no observaron diferencias significativas en la eficiencia ni en sus variables asociadas (ganancia de peso y consumo acumulado de alimento) entre genotipos pero, en los tres grupos genéticos, los machos fueron más pesados y si bien tuvieron mayor consumo medio diario también presentaron mayor aumento medio diario de peso, por lo que mostraron mayor eficiencia alimenticia y menor relación de conversión que las hembras.

En términos generales, la evidencia empírica indica que la separación por sexos sería la modalidad de cría más recomendada. Si el pollo

Campero Casilda se utiliza como genotipo doble propósito, las hembras deben ser restringidas a partir de la 5ª semana de vida para asegurar un correcto desempeño reproductivo (Barbato, 1999). Bajo este esquema los sexos deben ser criados, necesariamente, por separado. Si, por el contrario, todas las aves se destinan a producción de carne, la cría con separación de sexos favorece a los machos, mientras que la cría en lotes mixtos favorece a las hembras. En caso de ser este el destino de las aves, y dado que el protocolo de producción de pollos Campero INTA (Bonino, 1997) establece un rango de edades de sacrificio entre 75 y 90 días, en el caso de trabajar con sexos separados, las hembras pueden ser faenadas a mayor edad que los machos si la ventaja de prolongar el ciclo en términos de peso a la faena compensa la pérdida esperable en la eficiencia de producción de esa ganancia de peso.

Agradecimientos

Se agradece la responsable colaboración de los alumnos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario, cuyo trabajo contribuyó con la concreción de este Proyecto, y al INTA Pergamino, en cuyas instalaciones se llevó a cabo la faena de las aves.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses, incluyendo entre estos últimos las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

Aviagen. Manual de manejo del pollo de carne Ross, pág.72. 2010. Disponible en: http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_TechDocs/Manual-del-pollo-Ross.pdf. [Consultado 24/09/2018].

Barbato GF. 1999. Genetic relationships between selection for growth and reproductive effectiveness. *Poultry Science* 78(3):444-52. doi: 10.1093/ps/78.3.444

Bonino MF. 1997. Pollo Campero. Protocolo para la certificación. INTA. EEA Pergamino.

Canet ZE, Savoy JP, Antruejo AE, Martines A, Romera BM, Dottavio AM, Di Masso RJ. Dimorfismo sexual para crecimiento dimensional en el híbrido experimental de tres vías Campero Casilda. XIX Congreso y XXXVII Reunión Anual

de la Sociedad de Biología de Rosario. 2017. Disponible en: https://www.sbr.org.ar/Libros/libro_resumenes_2017.pdf. [Consultado 24/09/2018].

Castelló Llobet JA, Pontes Pontes M, Franco González F. 1989. Producción de huevos. Real Escuela de Avicultura, Barcelona, España. pp. 85.

Cobb Breeder Management Guide. 1998. Cobb-Vantress, Inc., Siloam Spring, AR.

Dottavio AM, Amoroto I, Romera BM, Álvarez M, Canet ZE, Di Masso RJ. 2010. Conformación corporal en poblaciones de pollos para carne con diferente velocidad de crecimiento. *Revista FAVE, Sección Ciencias Veterinarias*, 9(2):25-36. doi: 10.14409/favecv.v9i2.1500

Dottavio AM, Di Masso RJ. 2010. Mejoramiento avícola para sistemas productivos semi-intensivos que preservan el bienestar animal. *BAG, Journal of Basic and Applied Genetics*. 21(2).Art. 12:1-10.

Hudson BP, Lien RJ, Hess JB. 2001. Effects of body weight uniformity and pre-peak feeding programs on broiler breeder hen performance. *Journal of Applied Poultry Research*. 10:24-32. doi: 10.1093/japr/10.1.24

Laseinde EAO, Oluyemi JA. 1994. Effect of sex separation at the finisher phase on the comparative growth performance, carcass characteristics and breast muscle development between male and female broiler chicken. *Nigerian Journal of Animal Production*. 21:11-18.

Latshaw JD, Bishop BL. 2001. Estimating body weight and body composition of chickens by using noninvasive measurements. *Poultry Science* 80:868-73. doi: 10.1093/ps/80.7.868

Librera JE, Álvarez M, Lucach S, Serrano C, Velázquez J, Canet Z E, Dottavio AM, Di Masso RJ. 2012. Comportamiento del dimorfismo sexual en peso corporal en función de la edad en híbridos experimentales de pollos camperos. XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. pp 272. Disponible en: http://www.sbr.org.ar/Libros/libro_resumenes_2012.pdf. [Consultado 23/09/2018].

Mallo G, Villar E, Melo J, Miquel MC, Capelletti C, Paoletta M. 1999. Correlaciones fenotípicas y ecuaciones de regresión para estimaciones del peso y proporción de la pechuga. XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura. 435-39.

Sam IM, Akpa GN, Alphonsus C, Iyeghe-Erakpotobor GI, Agubosi OCP. 2010. Effect of sex separation on growth performance and carcass characteristics of broilers raised to maturity. *Continental Journal of Animal And Veterinary*

Research 2:35-40.

doi: [10.5281/zenodo.818029](https://doi.org/10.5281/zenodo.818029)

Sauveur B. 1997. Les critères et facteurs de la qualité des poulets Label Rouge. INRA Production Animal 10: 219-26.

Savoy JP, Canet ZE, Dottavio AM, Antruejo AE, Di Masso RJ. 2014. Dimorfismo sexual para peso corporal temprano y tasa de crecimiento exponencial pre-inflexión en pollos Campero Casilda. VIII Jornada de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Rosario.

Sheskin DJ. 2011. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. Chapman & Hall, USA.

Terraes JC, Sindik M, Revidatti F, Rigonatto T, Sandoval GL, Simón J. 2008. Efectos de la composición de la ración sobre el porcentaje de uniformidad en pollos parrilleros. XXVIX Sesión de Comunicaciones Científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNNE.

Terraes JC, Sindik M, Sandoval L, Revidatti F, Fernández R, Simón J. 2007. Efectos de dos dietas de diferente composición sobre el porcentaje de uniformidad de pollos parrilleros hembras. XXVIII Sesión de Comunicaciones Científicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNNE.

Toudic C. Evaluating uniformity in broilers. Factors affecting variation. Disponible en <https://wenku.baidu.com/view/aef8d034eefdc8d376ee32db.html> [Consultado 24/09/2018].

van de Ven L. 2008. Maximizando la uniformidad del lote con técnicas de alto nivel. WorldPoultry.net. 26(7):10-13.

Veerapen DS, Driver BMF. 1999. Separate sex growing of Ross 208 broilers and effects on broiler performance and carcass quality. Science and Technology (4):145-59.

Aislamiento de serovariedades de *Salmonella enterica* a partir de heces de animales domésticos y silvestres en cautiverio

Isolation of serovars of Salmonella enterica from feces of domestic and wild animals in captivity

PIDONE CLAUDIO LUIS^{1*}, ZERPA CORINA³, CAFFER MARÍA INÉS⁴,
MORONI MIRIAN PATRICIA⁴, COMBA EDUARDO RUBÉN²

1. Cátedra de Enfermedades Infecciosas. 2. Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. 3. Servicio Veterinario, Zoológico de Mendoza. 4. Servicio de Enterobacterias, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS. Dr. Carlos G. Malbrán. Argentina.

* Correo electrónico del autor de contacto: cpidone@fveter.unr.edu.ar

Resumen

Se recolectaron muestras de materia fecal correspondientes a 27 especies de animales en cautiverio pertenecientes al Jardín Zoológico de Mendoza (Argentina), con el fin de encontrar portadores asintomáticos de *Salmonella*. Las muestras de materia fecal obtenidas con hisopos se sembraron en caldo tetracionato base de Müller-Kauffmann y se incubaron a 43 °C en baño María durante 24 h. Alícuotas de este medio se sembraron en agar xilosa-lisina-desoxicolato y, finalmente, las colonias desarrolladas se identificaron utilizando pruebas bioquímicas convencionales. Como resultado, se aisló *Salmonella* serovar Meleagridis a partir de muestras de un oso polar y *Salmonella* serovar Give a partir de las de un oso pardo y un mono carayá. Ambas serovariedades están asociadas con casos de salmonelosis en humanos.

Palabras clave

Salmonella, zoológico, serovariedades, zoonosis

Abstract

Fecal samples corresponding to 27 species of animals in captivity in the Mendoza Zoo (Argentina) were collected, in order to find asymptomatic carriers of *Salmonella*. The fecal samples obtained with swabs were seeded in Müller-Kauffmann base tetrathionate and incubated at 43 °C in a water bath for 24 h. Then, aliquots of this medium were seeded on xylose-lysine-deoxycholate agar and, finally, formed colonies were identified using conventional biochemical tests. As a result, *Salmonella* serovar Meleagridis was isolated from a polar bear and *Salmonella* serovar Give from a brown bear and a carayá monkey samples. Both serovars are associated with cases of salmonellosis in humans.

Key words

Salmonella, zoo, serovars, zoonoses

Introducción

La salmonelosis puede afectar a un sinnúmero de especies y es muy común en animales domésticos: aves de corral, cerdos, bovinos y equinos; es menos frecuente en caninos y felinos. Las personas y los animales contraen la enfermedad comúnmente al ingerir agua de bebida contaminada, alimentos de origen animal crudos y también por contacto directo con las heces de animales infectados. En humanos son frecuentes los casos de gastroenteritis provocados por distintas cepas de *Salmonella*, la mayor parte de las veces debido al consumo de alimentos contaminados. Es frecuente aislar esta bacteria a partir de distintos productos de origen animal (Eng *et al.*, 2015). Muchos animales silvestres también pueden ser portadores de *Salmonella* y, por lo tanto, posibles fuente de infección para el hombre y otros animales. Las especies confinadas en zoológicos han sido objeto de estudios de esta índole, y a partir de ellos se han aislado salmonelas (Lima *et al.*, 2012; Silva Hidalgo *et al.*, 2010). El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Salmonella* en la materia fecal de animales domésticos y silvestres en cautiverio e identificar las serovariedades presentes.

Materiales y métodos

En el período comprendido entre octubre de 2014 y septiembre de 2016, y sobre la base de las normas de la Asociación Mundial de Zootecnia y Acuicultura (2018), se recolectaron un total de 51 muestras correspondientes a 27 especies animales en cautiverio pertenecientes al Jardín Zoológico de Mendoza (Argentina). Las especies estudiadas se consignan en la Tabla 1. Los hisopos con la materia fecal se colocaron en medio de transporte de Stuart (Laboratorio Britania SA, CABA, Argentina), se conservaron a 4 °C y se procesaron dentro de las 24 h. Cada una de las muestras obtenidas se sembró en tubos que contenían 10 ml de caldo tetraciónato base de Müller-Kauffmann (Laboratorio Britania SA, CABA, Argentina) y se incubaron a 43° C en baño María durante 24 h. Posteriormente, con un ansa de siembra se tomó una alícuota de la superficie de cada uno de los tubos y se sembró en agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD – Biokar Diagnostics, Francia), incubándose durante 24-48 h a 37 °C (Manual Oxoid, 2006). Las colonias sospechosas (rojas con centro negro) se identificaron utilizando pruebas bioquímicas convencionales tales como: agar TSI, IMViC, ONPG y ureasa (Caffer *et al.*, 2007). La confirmación y posterior serotipificación de la cepa de *Salmonella* aislada se realizó en el Servicio de Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán.

Resultados

Se logró el aislamiento de *Salmonella* a partir de las heces de tres animales. Las especies estudiadas y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1.

Se aisló *Salmonella* a partir de un oso polar (*Ursus maritimus*). La bacteria aislada se identificó como *Salmonella enterica* serovar Meleagridis. Un año después de este resultado, y dentro del período de estudio, se tomó una segunda muestra a partir del mismo animal, la cual resultó negativa.

También se aisló *Salmonella* a partir de las heces de un oso pardo (*Ursus arctos*) y de un mono carayá (*Alouatta caraya*). Ambos aislamientos se identificaron como *Salmonella* serovariedad Give. Se repitió dos veces más la toma de muestras a partir de estos mismos animales dentro del período de estudio, siendo todos los resultados negativos.

Discusión

En el caso del oso polar, no manifestaba signos de enfermedad en el momento de la toma de la muestra que resultó positiva, pero se informó que en días previos había tenido diarrea. Esto, sin embargo, se creyó asociado con la dieta. La fuente de infección se desconoce y se cree que podría relacionarse con la alimentación; en este sentido, se determinó que el oso comía pescado, pollo, carne con hueso, corazón bovino, frutas y verduras. El pollo provenía de diferentes proveedores.

Las otras dos especies infectadas con la serovariedad Give no manifestaron ningún tipo de signos clínicos en el momento de la toma de las muestras. En un principio, se analizó la posibilidad de que ambos animales fueran portadores crónicos asintomáticos, pero los resultados obtenidos en los análisis posteriores fueron negativos. Sin poder descartar una infección crónica asintomática, se cree que una fuente de infección común desconocida pudo haber sido la causa de estas infecciones, quizá algún elemento de uso común, como los alimentos consumidos por ambos, o la contaminación del carro que transportó dichos alimentos. Los animales no eran convivientes, pero se hallaban en jaulas no muy distantes una de otra.

Salmonella Meleagridis ha sido aislada previamente de personas con diarrea (Zaidi *et al.*, 2006) y *Salmonella* Give a partir de materia fecal de bovinos con diarrea (Higgins *et al.*, 1997), de heces de una persona con síndrome diarreico (Noseda *et al.*, 2002) y de un absceso esplénico de un paciente humano inmunocompetente, que posiblemente haya estado asociado con el consumo de carne picada cruda (Girardin *et al.*, 2016). La presencia de estas serovariedades de carácter zoonótico implica un problema de salud pública,

Tabla 1. Cantidad de muestras totales y positivas por especie animal

| Especie | Cantidad de muestras | Muestras positivas |
|--|----------------------|--------------------|
| Águila coronada (<i>Harpyhaliaetus coronatus</i>) | 1 | - |
| Búfalo de la India (<i>Bubalus bubalis</i>) | 2 | - |
| Cabra de Juan Fernández (<i>Capra aegagrus</i>) | 1 | - |
| Camello bactriano (<i>Camelus bactrianus</i>) | 2 | - |
| Cebra (<i>Equus quagga</i>) | 1 | - |
| Chimpancé (<i>Pan troglodytes</i>) | 1 | - |
| Elefante africano (<i>Loxodonta africana</i>) | 1 | - |
| Elefante asiático (<i>Elephas maximus</i>) | 2 | - |
| Gamo (<i>Dama dama</i>) | 3 | - |
| Ganso (<i>Anser anser</i>) | 2 | - |
| Hipopótamo (<i>Hippopotamus amphibius</i>) | 3 | - |
| Llama (<i>Lama glama</i>) | 1 | - |
| Mara (<i>Dolichotis patagonum</i>) | 1 | - |
| Mono carayá (<i>Alouatta caraya</i>) | 5 | 1 (S. Give) |
| Ñandú (<i>Rhea americana</i>) | 2 | - |
| Oso pardo (<i>Ursus arctos</i>) | 6 | 1 (S. Give) |
| Oso polar (<i>Ursus maritimus</i>) | 2 | 1 (S. Meleagridis) |
| Oveja somalí (<i>Ovis aries steatopigas</i>) | 1 | - |
| Papión sagrado (<i>Papio hamadryas</i>) | 1 | - |
| Pavo real (<i>Pavo cristatus</i>) | 1 | - |
| Pecarí de collar (<i>Pecari tajacu</i>) | 1 | - |
| Pichi (<i>Zaedyus pichiy</i>) | 1 | - |
| Poni (<i>Equus ferus caballus</i>) | 2 | - |
| Puma (<i>Puma concolor</i>) | 3 | - |
| Tejú/lagarto overo (<i>Tupinambis teguixin</i>) | 1 | - |
| Tortuga terrestre argentina (<i>Chelonoidis chilensis</i>) | 3 | - |
| Zorro gris patagónico (<i>Lycalopex griseus</i>) | 1 | - |

siendo un riesgo para personas y animales, en especial para el personal que trabaja en jardines zoológicos y que está en contacto con los animales. Además, fortalece la importancia de controlar potenciales reservorios de éste y quizá de otros agentes infecciosos zoonóticos en este tipo de parques.

Conclusiones

En este trabajo se aisló *Salmonella* serovar Meleagridis a partir de un oso polar y *Salmonella* serovar Give a partir de un oso pardo y de un mono carayá, portadores asintomáticos confinados en un parque zoológico, con las implicancias epidemiológicas que esto pudiera llegar a tener.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Bibliografía

Asociación Mundial de Zoos y Acuarios: código de ética y bienestar animal. Disponible en: http://www.waza.org/files/webcontent/1.public_site/5.conservation/animal_welfare/waza%20code%20of%20ethics%20sp.pdf (consultado 06/05/2018).

Caffer MI, Terragno, R. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Disponible en: <https://docplayer.es/12601568-Manual-de-procedimientos-para-la-caracterizacion-de-salmonella.html> (consultado 05/04/ 2018)

Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG & Lee LH. 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*. 8(3):284-93. doi: 10.1080/21553769.2015.1051243

Girardin F, Mezger N, Hächler H, Bovier PA. 2006. *Salmonella* serovar Give: An unusual

pathogen causing splenic abscess. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 25:272-4.

doi: [10.1007/s10096-006-0122-2](https://doi.org/10.1007/s10096-006-0122-2)

Higgins R, Desilets A, Cantin M, Messier S, Khakhria R, Ismail J, Mulvey MR, Daignault D, Caron H. 1997. Outbreak of *Salmonella GIVE* in the province of Quebec. *Canadian Veterinary Journal*. 38:780-1.

Lima DCV, Siqueira DB, Mota RA, Rameh-de-Albuquerque LC, Souza SD, Santos AS, Silva LBG. 2012. Microbiologia de swabs retais e otológicos em carnívoros silvestres do zoológico do Parque Estadual de Dois Irmãos, Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32(2):159-64.

Manual Oxoid. 2006. 9th Edition. Basingstoke (Inglaterra), Oxoid Limited.

Nosedá RP, Bigalli MC, Andrich MG, Cordeviola JM, Bardón JC, Martínez AH, Combessies GM.

2002. Aislamiento de *Salmonella* en muestras clínicas humanas, animales y alimentos, durante 1988-2001. *Veterinaria Argentina*. 19:752-9.

Silva-Hidalgo G, López-Moreno HS, Ortiz-Navarrete VF, Alpuche-Aranda C, Rendón-Maldonado JG, López-Valenzuela JA, López-Valenzuela M, Juárez-Barranco F. 2013. Prevalence of *Salmonella enterica* serovar Albany in captive zoo wild animals in the Culiacán Zoo in Mexico. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 44(1):8-14. doi: [10.1638/1042-7260-44.1.8](https://doi.org/10.1638/1042-7260-44.1.8)

Zaidi MB, McDermott PF, Fedorka-Cray P, Leon V, Canche C, Hubert SK, Abbott J, León Zhao S, Headrick M, Tollefson L. 2006. Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, México. *Clinical Infectious Diseases*. 1: 42(1):21-8. doi: [10.1086/498508](https://doi.org/10.1086/498508)

Paracoccidioidomicosis en caninos y felinos: hallazgos clínicos, diagnóstico y tratamiento

Canine and feline paracoccidioidomycosis. Clinical findings, diagnosis and treatment

MARTÍNEZ CEPEDA GALO ERNESTO^{1,2*}, REVELO RUALES ALEXANDRA PAOLA³

1. Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guayaquil. 2. Centro de Diagnóstico Veterinario "Santo Domingo". 3. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, Cuenca-Ecuador.

* Correo electrónico del autor de contacto: galomartinez88@gmail.com

Resumen

La paracoccidioidomicosis es una micosis profunda endémica de América Latina. Se ha identificado *Paracoccidioides* spp. en diferentes especies animales. En caninos y felinos, se presenta con una signología inespecífica con alteraciones de los sistemas respiratorio y nervioso y, menos frecuentemente, con alteraciones cutáneas. La presentación leve y de resolución espontánea de la enfermedad depende del estado inmunológico del animal; una respuesta inmune deficiente permite que se disemine y pueda llegar hasta la muerte. Existen varias técnicas disponibles para su diagnóstico. El diagnóstico definitivo se realiza identificando a *Paracoccidioides* spp. mediante cultivo, aislamiento y posterior identificación molecular. La realización de esta revisión bibliográfica tuvo la finalidad de recopilar información sobre esta enfermedad de interés en caninos y felinos.

Palabras clave

Paracoccidioidomicosis, signos clínicos, diagnóstico, tratamiento, caninos, felinos

Abstract

Paracoccidioidomycosis is an endemic deep mycosis of Latin America. *Paracoccidioides* spp. has been identified in different animal species. Clinical signs of paracoccidiomycosis in dogs and cats are non-specific and include alterations of the respiratory and nervous system, and less frequently, cutaneous alterations. The mild presentation and spontaneous resolution of the disease depends on the immune status of the animal, and a poor immune response results in pathogen dissemination and possibly death. Several techniques are available for diagnosis; definitive diagnosis is based on identification of *Paracoccidioides* spp. by culture, isolation and subsequent molecular characterization. This review aimed to collect relevant information on this canine and feline disease.

Key words

Paracoccidioidomycosis, clinical signs, diagnosis, treatment, canine, feline

Introducción

La paracoccidioidomicosis es una micosis de curso crónico, causada por el hongo dimórfico *Paracoccidioides*, del cual se han identificado cinco especies: *P. brasiliensis*, *P. americana*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis*, y *P. lutzii* (Hrycyk *et al.*, 2018). *P. brasiliensis* está distribuido ampliamente en América del Sur y se ha asociado con la mayoría de los casos de paracoccidioidomicosis detectados hasta la actualidad, mientras que *P. lutzii* se ha encontrado en el centro, suroeste y norte de Brasil y Ecuador (Teixeira *et al.*, 2014).

La paracoccidioidomicosis es una enfermedad endémica de áreas rurales y subtropicales de América del Sur. Sin embargo, en Chile y las Guayanas no se han presentado casos. El país con mayor cantidad de casos informados es Brasil. En Argentina, las áreas endémicas están ubicadas en las provincias de Chaco, Formosa, Misiones, Corrientes, norte de Entre Ríos, Sante Fe, Tucumán y Salta (Ballesteros *et al.* 2014).

La mayoría de los casos se presentan en humanos, en quienes se considera una enfermedad ocupacional (Pérez *et al.*, 2014). Los caninos, felinos (con menor frecuencia), bovinos, equinos y pequeños rumiantes como la oveja son las especies domésticas afectadas (Corte *et al.*, 2012).

Historia de la enfermedad

Fue informada por primera vez en humanos por Adolf Lutz en Brasil (Marques, 2012). En Argentina, Brasil, Colombia, Ecuador y Venezuela, la enfermedad se circunscribe a las áreas rurales (Brummer & Castaneda 1993).

El primer caso en humanos fue estudiado por Lutz en 1908 al realizar el diagnóstico diferencial en dos pacientes que presentaban múltiples lesiones en la mucosa orofaríngea muy similares a un carcinoma de células escamosas. Además de las lesiones en la mucosa oral, los individuos presentaban adenopatías cervicales. Lutz tomó muestras de las lesiones y observó células levaduriformes grandes y esféricas, multibrotantes; esas células no eran conocidas hasta el momento como agente etiológico de ninguna enfermedad, por lo que se denominó "micosis pseudococcídica" (Conti Díaz, 2010; Marques, 2012).

En 1912, Splendore estudió la micromorfología del hongo, lo consideró como un ascomiceto y lo denominó *Zimonema brasiliensis* (Conti Díaz 2010). En 1930, Almeida le asignó el nombre de *Paracoccidioides brasiliensis* y esclareció las diferencias morfológicas entre las fases micelial y levaduriforme al compararlo con las mismas fases del *Coccidioides* spp. (Conti Díaz, 2010).

La enfermedad era mortal hasta el descubrimiento de la eficacia de las sulfonamidas. Asimismo, entre los antifúngicos, la anfotericina B fue utilizada por primera vez para el tratamiento de esta enfermedad en 1958 y, en 1980, se incluyeron

los azoles en el esquema terapéutico (Marques, 2012).

Agente etiológico

La paracoccidioidomicosis, también conocida como blastomicosis sudamericana, blastomicosis latinoamericana, enfermedad de Lutz-Splendore-Almeida o granuloma paracoccidioidal, es causada por el hongo *P. brasiliensis*, sus variantes S1, PS2, PS3, PS4 y *Paracoccidioides lutzii* (Machado *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2014). El hongo presenta dimorfismo termal. En cultivos a 37 °C crece en forma de levadura y forma colonias blancas y brillantes, de aspecto cremoso en medios sólidos (Brummer & Castaneda, 1993). En medio de cultivo líquido crece formando acúmulos de distinto tamaño. El tiempo de incubación fluctúa entre 10 y 15 días. Las células miden entre 4 y 30 µm, poseen una forma oval alargada y son refractarias a la luz.

La forma micelial presenta colonias de color blanquecino, de forma irregular con micelios aéreos cortos. El tiempo de incubación es de 20 a 30 días a temperatura de 20 a 26 °C (Brummer & Castaneda, 1993; Marques, 2012). En algunos cultivos es posible observar la producción de un pigmento marrón. Microscópicamente el hongo posee hifas delgadas, hialinas y septadas; en medios de cultivo comunes suele formar clamidosporas. Los medios utilizados con mayor frecuencia para el cultivo son el agar Sabouraud y el medio infusión cerebro corazón (BHI).

Además, es posible aislar el hongo de tejidos de monos ardilla (*Saimiri sciureus*), murciélagos frugívoros (*Artibeus lituratus*) y pingüinos (*Pygoscelis adeliae*). El armadillo (*Dasypus novemcinctus*) suele estar infectado pero no manifiesta los signos de la enfermedad. Otras especies de animales en las cuales se pudo identificar la presencia del hongo por medio de técnicas moleculares son: cuis (*Cavia aperea*), puerco espín (*Sphiggurus spinosus*), mapache (*Procyon cancrivorus*), grisón (*Galictis vittata*) y armadillos (*D. novemcinctus* y *Dasypus septemcinctus*) (Brummer & Castaneda, 1993; Rojas-Jaimes *et al.*, 2015).

Los modelos animales de experimentación como el cobayo, el hámster y el conejo son los de elección para reproducir al hongo in vivo. La inoculación del hongo en los modelos animales se realiza utilizando inóculos de concentración elevada por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intratesticular (Brummer & Castaneda, 1993).

Paracoccidioides spp. es un hongo ampliamente distribuido en zonas subtropicales y húmedas con temperaturas fluctuantes entre 18 y 23 °C. En Brasil y Venezuela fue posible aislar el hongo a partir de suelos de cultivo de café, aunque su hábitat natural no está completamente dilucidado (Brummer & Castaneda, 1993).

Clasificación taxonómica

División: *Ascomycota*
 Clase: *Endomycetes*
 Orden: *Onygenales*
 Familia: *Onygenaceae*
 Género: *Paracoccidioides*
 Especies: *P. brasiliensis*, *P. americana*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis* y *P. lutzii*

El estado teleomorfo de este hongo es desconocido hasta el momento.

Aspectos clínicos

La paracoccidioidomicosis es una micosis sistémica que afecta primordialmente a los pulmones desde donde se disemina por vía linfohemática a los linfonodos, piel, ojos, huesos y otros órganos. Los perros machos jóvenes de razas grandes (en especial las razas de deporte y caza) que habitan o pasan la mayor parte de su tiempo cerca del agua, presentan mayores posibilidades de contraer la enfermedad (Morgan *et al.*, 2004).

La infección se produce por la inhalación de los conidios infectantes presentes en el ambiente. La inoculación directa puede, raramente, ocasionar enfermedad cutánea localizada. Los conidios ingresan al organismo, alcanzan el pulmón y son fagocitados por los macrófagos alveolares, luego de lo cual ocurre la transformación a levaduras, lo que produce una respuesta supurativa o piogranulomatosa. Las levaduras, al sobrevivir intracelularmente, son transportadas por los sistemas hemático y linfático; así, se diseminan y causan enfermedad sistémica (Thompson, 2008). Los órganos comúnmente afectados son los linfonodos, los ojos, la piel, los huesos, la próstata y también el tejido celular subcutáneo. En los gatos, la piel, el tejido subcutáneo, los ojos, los órganos del sistema nervioso central (SNC) y los linfonodos son los más afectados (Ettinger & Feldman, 2004; Morgan *et al.*, 2004; Thompson, 2008).

El periodo de incubación es variable, y suele ser de entre 5 y 12 semanas, dependiendo del grado de competencia del sistema inmunitario del huésped. La severidad de la enfermedad también depende de la magnitud de la respuesta inmunitaria (Morgan *et al.*, 2004). Si la respuesta inmunitaria es adecuada se desencadena una enfermedad respiratoria leve de resolución espontánea, o bien un compromiso de otros sistemas, sin lesiones pulmonares. Cuando la respuesta inmunitaria es inadecuada o deficiente, es posible que la enfermedad progrese hasta la diseminación y, además, pueda causar enfermedad pulmonar grave (Morgan *et al.*, 2004; Thompson, 2008). Se ha reportado un caso de shock séptico fatal en una persona a causa de *P. brasiliensis* S1, mientras que en animales no se han reportado casos similares (Macedo *et al.*, 2018).

Manifestaciones clínicas en caninos

En perros, el hemograma a menudo es normal. Pueden presentarse, sin embargo, anemia normocítica, normocrómica, neutrofilia y eosinofilia, pero ninguna de estas alteraciones guarda correlación con la severidad de la enfermedad (de Farias *et al.*, 2011).

El análisis químico de la sangre frecuentemente no presenta alteraciones; las más comunes son hipalbuminemia e hipercalcemia, aunque solo se presentan en el 10 % de los casos (Ettinger & Feldman, 2004).

Con respecto a las manifestaciones clínicas, suelen ser poco específicas, se presentan como anorexia, depresión, pérdida de peso, caquexia y fiebre, y están presentes en un 40 % de los casos. Los signos clínicos en perros suelen ser tos y dificultad respiratoria, desde leve hasta con disnea grave. En pocos casos se observa cianosis. Por lo general, hay aumento de tamaño de los linfonodos perihiliares, con la consiguiente compresión de los bronquios principales. La enfermedad broncointersticial y alveolar es la causa de tos seca (Morgan *et al.*, 2004).

Algunos estudios demostraron que, en caninos, entre 30 y 50 % de los casos presenta lesiones cutáneas, mientras que en los gatos estas lesiones son las habituales (Morgan *et al.*, 2004). El sistema reproductor se encuentra afectado en, aproximadamente, 5-10 % de los perros enfermos, mientras que el compromiso del sistema nervioso puede ser menor al 5 % de los casos (Ettinger & Feldman, 2004). Los signos y lesiones oculares incluyen: conjuntivitis, edema corneal, vascularización corneal, anisocoria, uveítis anterior, glaucoma secundario, exoftalmos, coriorretinitis granulomatosa, desprendimiento de retina y neuritis óptica (Schaer, 2006).

En un estudio realizado en Brasil con suero proveniente de 836 perros se demostró la coinfección con *P. brasiliensis* y *Leishmania* spp. (Silveira *et al.*, 2006). Asimismo, los perros positivos para *Leishmania* spp. mostraron mayor reactividad para la glicoproteína 43 -gp43- (79,9 %) que aquellos que fueron negativos (54 %).

Tanto en perros con paracoccidioidomicosis como en perros con leishmaniasis se constata una respuesta inmunitaria de tipo Th1, lo que indicaría que los animales más propensos a contraer leishmaniasis también lo serían para desarrollar paracoccidioidomicosis (Silveira *et al.*, 2006).

Los caninos presentan anticuerpos contra la gp43 detectables mediante la prueba de inmunodifusión, aunque no presenten signología clínica; esto no se observa en pacientes humanos, que no resultan reactivos a la prueba cuando no presentan síntomas (Silveira *et al.*, 2006). La edad fue otro factor de riesgo analizado en el estudio de Silveira. Así, los perros menores de un año presentaron baja reactividad a la gp43 y los mayores de un año mostraron elevada reactividad

a la glicoproteína de *P. brasiliensis* (Silveira *et al.*, 2006).

En los exámenes radiográficos se observa un patrón intersticial en aproximadamente el 70 % de los perros, y un patrón mixto intersticial/alveolar en un 20 %. En algunos casos se presenta linfadenopatía tráqueobronquial. En un 30 % son poco frecuentes los nódulos mediastínicos o formaciones pulmonares aisladas. En ocasiones, no se observan nódulos pulmonares debido a la colecta pleural que sucede en el 7 % de los casos; es muy raro que se presente neumotórax (Ettinger & Feldman, 2004; Morgan *et al.*, 2004).

Las lesiones óseas que se presentan en los huesos largos son de tipo osteolítico. La proliferación perióstica y la inflamación de los tejidos blandos adyacentes se aprecia en un 50 % de las lesiones (Ettinger & Feldman, 2004).

Manifestaciones clínicas en felinos

La paracoccidiodomicosis no es frecuente en gatos. La mayoría de los signos clínicos observados en perros pueden observarse también en gatos. Es destacable en los gatos el desarrollo de lesiones cutáneas: pueden observarse pápulas, nódulos o placas solitarias o múltiples, que eventualmente se ulceran o forman grandes abscesos (Morgan *et al.*, 2004). Los órganos del sistema nervioso resulta más afectado en los gatos que en los perros (Morgan *et al.*, 2004; Ettinger & Feldman, 2004).

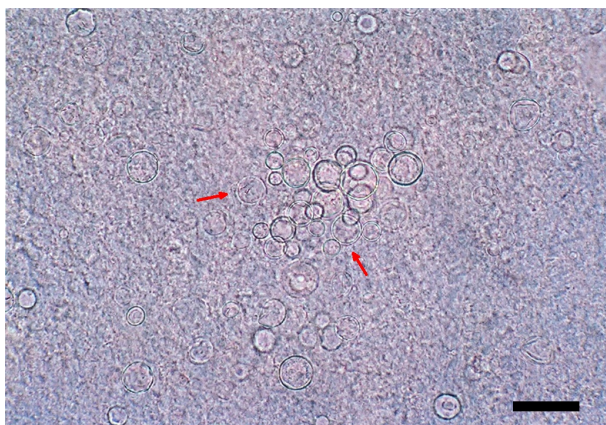


Figura 1. Fase levaduriforme de *P. brasiliensis* (flechas). Barra = 50 μm . Punción de linfonódulo. Gentileza del Dr. Gustavo Giusiano.

En un estudio realizado en el norte del estado de Paraná, Brasil, sobre un total de 136 muestras de suero (86 de gatos de zonas rurales y, 50, de zonas urbanas), se demostró que los gatos de zonas rurales son especialmente susceptibles a contraer la infección (48,8 %), comparados con aquellos de zonas urbanas (2 %). El sexo de los animales no fue un factor de riesgo. Además, se determinó una menor susceptibilidad de los gatos

(48 %), comparada con la de los perros de la misma región rural (89,5 %). Los investigadores consideran que el hábito de hojar es un factor predisponente que favorece el ingreso del hongo al organismo (Oliveira *et al.*, 2013). Asimismo, en ese estudio, los gatos fueron más susceptibles a desarrollar las formas encefálica y urinaria (Oliveira *et al.*, 2013).

Diagnóstico diferencial

Los principales son: coccidiodomicosis, esporotricosis, micetomas, eumicetomas, cromomicosis, nocardiosis, leishmaniasis, tularemia y tuberculosis u otras micobacteriosis.

Métodos de diagnóstico

Métodos directos

Examen directo

El objetivo es la búsqueda de levaduras esféricas de 12 a 20 μm con doble pared refringente, vacuolas lipídicas intracitoplasmáticas y, sobre todo, el hallazgo de gemación múltiple. Las gemas adheridas a la levadura forman una figura característica llamada: “rueda de timón” (Espinoza *et al.*, 2014). Esta figura es considerada patognomónica y de esta manera puede formularse un diagnóstico definitivo. Las gemas o brotes suelen medir entre 1 y 10 μm de diámetro.

Para observar la fase de levadura de *Paracoccidioides* spp. se puede utilizar el calco-flúor, el cual facilita la visualización del hongo. Las tinciones de Gram, Ziehl Neelsen y Giemsa no siempre facilitan la observación de las levaduras. Las técnicas de plata metenamina (Gomori-Grocott) y la reacción de PAS, en cortes histológicos, permiten observar levaduras esféricas, con o sin brotes. Las muestras ideales para la observación del agente son aquellas que se toman a partir de lesiones, de pus o mediante lavado bronquial o broncoalveolar.

Cultivo

El estándar de oro es el cultivo de *P. brasiliensis* (Marques, 2012). Dependiendo de la temperatura de incubación desarrolla su fase micelial (28 °C) o levaduriforme (37 °C) y es de crecimiento lento. El desarrollo en cultivos se observa en un porcentaje apreciable de los casos (60 a 80 %) (Winn *et al.*, 2008).

Es recomendable sembrar la muestra en varios medios de cultivo, a 28 °C y 37 °C. En muestras libres de contaminación, como aquellas de líquido cefalorraquídeo, incubadas a 37 °C, las colonias comienzan a ser visibles alrededor del décimo día, son de consistencia cerosa o pastosa, de aspecto cerebriforme, blanca y glabra. A 28 °C, en agar Sabouraud, se observa una colonia de desa-

rollo lento, rugosa o membranosa, cubierta por un micelio aéreo blanco y por vellosidades cortas, con un tiempo de incubación de 2 a 4 semanas. El reverso de la colonia en este medio generalmente es marrón, en la mayoría de los primocultivos desarrolla colonias rugosas y cerebriformes, previo agregado de cicloheximida al medio. El aislamiento y desarrollo del hongo en cultivo son confirmatorios para el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis en pacientes humanos y caninos con manifestaciones clínicas de la enfermedad (Brummer & Castaneda, 1993; Pérez *et al.*, 2014; Carrasco-Zuber *et al.*, 2016).

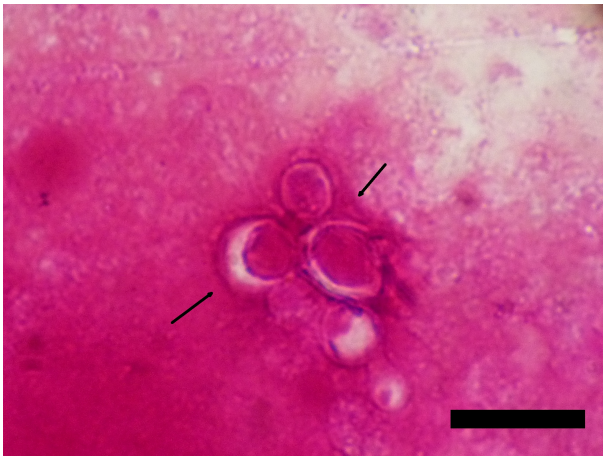


Figura 2. *P. brasiliensis* (flechas). Reacción de PAS. Barra = 50 μ m. Gentileza del Dr. Roberto Suárez-Álvarez. Depto. de Micología. ANLIS-INEI "Dr. Carlos G. Malbrán".

Histopatología

Microscópicamente, pueden observarse lesiones inflamatorias de tipo purulento o piogranulomatoso. Los hongos pueden colorearse mediante técnicas especiales, tales como PAS y plata metenamina (Ettinger & Feldman, 2004).

Técnicas de biología molecular

La paracoccidioidomicosis es una enfermedad de difícil diagnóstico en sus etapas iniciales. En medicina humana, una de las técnicas de diagnóstico utilizadas actualmente es la PCR. Se desarrolló una PCR dirigida a la amplificación de la gp43, presente en el 90 % de los pacientes con la enfermedad. Los cebadores diseñados resultaron de mucha especificidad y sensibilidad, superando a las pruebas de diagnóstico serológico. Se utilizaron muestras de esputo provenientes de pacientes con paracoccidioidomicosis comprobada mediante pruebas serológicas y examen directo positivo para *P. brasiliensis*. Todas las muestras evaluadas resultaron positivas para *P. brasiliensis*, lo que demostró la utilidad de la técnica para su utilización a partir de la muestra clínica, para la

obtención de un diagnóstico temprano de la enfermedad, así como también por su mayor especificidad y sensibilidad con respecto a los métodos de diagnóstico convencionales (Gomes *et al.*, 2000).

Pitz *et al.* (2013) propusieron la utilización de una PCR semianidada en un tubo (OTsn-PCR) para la detección de *P. brasiliensis* en muestras clínicas. La técnica demostró tener igual o mayor efectividad para el diagnóstico de la enfermedad, comparada con las técnicas clásicas de PCR anidada o semianidada, descritas años atrás por Imai *et al.* (2000).

Métodos indirectos

Inmunoserología

Los estudios inmunoserológicos para la detección de anticuerpos específicos contra *P. brasiliensis* se realizan con el uso de antígenos específicos. Estos métodos se recomiendan en pacientes sin lesiones mucocutáneas, que son las que permiten el examen directo y el cultivo.

En 1916, Moses, por primera vez, publicó una prueba de inmunodiagnóstico, mediante la utilización de un antígeno citoplasmático (Brummer & Castaneda 1993). En 1955, Fava Netto, en Brasil, empleó por primera vez un antígeno de naturaleza polisacárida para las pruebas de fijación del complemento y de precipitinas en tubo. En 1973, Yarzabal *et al.* utilizaron la inmunoelectroforesis (IEF) para el diagnóstico de paracoccidioidomicosis. Restrepo *et al.* (1974) fueron los primeros en proponer la técnica de doble difusión en agar o inmunodifusión simple (ID) para el diagnóstico serológico de la enfermedad; esta técnica fue posteriormente utilizada en muchos países. La ID es una prueba de *screening* y de diagnóstico, con 89 a 91 % de sensibilidad y especificidad, respectivamente (Mendes-Giannini & Camargo, 1984; Brummer & Castaneda, 1993; Conti Díaz, 2010).

En 1972, Restrepo utilizó la inmunofluorescencia indirecta como técnica de diagnóstico, con una especificidad del 90 % y una sensibilidad del 65 % (Restrepo, 1972).

La prueba de aglutinación en látex ha sido descrita para el serodiagnóstico de la paracoccidioidomicosis, demostrando, en las pruebas a campo, valores de 61-69,5 % de sensibilidad (Brummer & Castaneda, 1993). La aglutinación en látex demostró una sensibilidad del 73 % y una especificidad del 79 % sin previo tratamiento de la muestra. Sin embargo, en las muestras pretratadas con buffer (2,05 % glucosa, 0,8 % citrato trisódico, 0,42 % sodio clorhídrico, 0,1 % Tween® 20 en agua, pH 6,4), en una dilución 50:50 e incubadas durante 30 minutos a 37 °C, se produjo un incremento de la especificidad y de la sensibilidad de la prueba hasta un 90 % (Silveira-Gomes, 2012).

El Western blot (WB) es una de las pruebas más sensibles y específicas para detectar respuesta humoral mediada por anticuerpos anti-

gp43 específicos de paracoccidiodomicosis en caninos (Canteros *et al.*, 2010). En un estudio se demostró que la técnica de WB en humanos es más sensible y rápida que la inmunodifusión doble en gel (Perenha-Viana & Gonzales, 2012).

En un estudio realizado mediante la prueba de ELISA y la intradermorreacción con el antígeno gp43 de *P. brasiliensis*, se observó que el 80,5 % de los perros de zonas rurales presentaron anticuerpos anti gp43, y que ese resultado fue estadísticamente significativo al compararlo con el 53,6 % de los perros serorreactivos de zonas urbanas (Fontana *et al.*, 2010).

En Brasil se realizó un estudio en perros para detectar anticuerpos específicos contra la glicoproteína gp43 de *P. brasiliensis* mediante el uso de ELISA e inmunodifusión. Se encontró un 54,8 % de positividad con la prueba de ELISA, indistintamente del sexo, mientras que, cuando las muestras se evaluaron mediante inmunodifusión, se observó un 52,7 % y 57,6 % de positividad al antígeno purificado de la gp43 en machos y hembras, respectivamente (Corte *et al.*, 2012).

En una evaluación realizada en gatos en Brasil, mediante el uso de la prueba de ELISA indirecta, la serorreactividad fue del 31,6 %; sin embargo, no se detectaron animales serorreactivos mediante inmunodifusión (Oliveira *et al.*, 2013).

En la última década se han sumado nuevas técnicas, como la detección rápida del genoma y la microscopía de alta resolución con rayos láser (Conti Díaz, 2010).

Tratamiento

El itraconazol, administrado durante 6 a 18 meses, es el tratamiento de elección para la forma leve a moderada de la enfermedad. Este antimicótico es un azol de tercera generación que actúa sobre el citocromo P450 y depende de la 1,4- α -demetilasa para prevenir la conversión de lanosterol a ergosterol en la membrana del hongo (de Farias *et al.*, 2011).

Se recomienda una dosis de ataque de 5 mg/kg/v.o. cada 12 h durante los primeros 3 a 5 días de tratamiento. En perros, la dosis es de 5 mg/kg/v.o. cada 24 h, durante los primeros 2 a 3 meses o hasta que desaparezcan los signos de la enfermedad activa. Los gatos pueden requerir 5 mg/kg/v.o. cada 12 h hasta constatar la desaparición de los signos (Ettinger & Feldman 2004).

Se deben realizar controles mensuales de la concentración sérica de enzimas hepáticas mientras se administra el itraconazol. Es posible que se produzcan incrementos leves a moderados de la alanina transaminasa, la aspartato transaminasa y la fosfatasa alcalina, en un 50 % de los perros y gatos tratados con itraconazol, en especial cuando la dosis alcanza los 10 mg/kg. El tratamiento se debe suspender si el paciente presenta elevación de enzimas hepáticas, anorexia, vómitos o dolor abdominal. El tratamiento puede ser

reinstaurado con el 50 % de la dosis cuando las enzimas hepáticas alcanzan sus valores normales.

Con respecto a la anorexia, este es uno de los efectos colaterales usuales del fármaco y es más frecuente en los gatos que en los perros. Deben suministrarse estimulantes del apetito a los gatos o perros que lo necesiten (Morgan *et al.*, 2004). Por otra parte, se comprobó en un estudio prospectivo de 200 pacientes tratados con itraconazol, la elevación de la bilirrubina total y de la γ -glutamyl-transferasa en un 6,2 % y en un 32,6 %, respectivamente (Levorato *et al.*, 2017).

El itraconazol no atraviesa la barrera hematoencefálica, hematoocular o hematóprostática, aunque alcanza concentraciones adecuadas en la piel; por tal motivo, es uno de los mejores fármacos para tratar la infección cutánea de la enfermedad (Ettinger & Feldman, 2004; Morgan *et al.*, 2004).

Otro fármaco que suele utilizarse es el ketoconazol, que debe administrarse en dosis de 5-15 mg/kg/v.o. cada 12 h tanto en perros como en gatos, durante 3 meses. El tiempo de respuesta es mucho menor y las recaídas son frecuentes en comparación con los tratamientos con el itraconazol. Entre los efectos indeseables del ketoconazol se destacan la marcada hepatotoxicidad, la neurotoxicidad y la teratogenicidad (Morgan *et al.*, 2004). No obstante, esto se demostró, mediante pruebas de sensibilidad, en las que la mayoría de los aislamientos (73,7 %) fueron sensibles a este fármaco (Cermeño *et al.*, 2015).

El fluconazol es otra droga recomendada para el tratamiento, en dosis de 2,5-5 mg/kg/v.o. o de forma intravenosa, cada 24 horas. Este fármaco no requiere la administración de antiácidos y no se ve afectado por la presencia o ausencia de alimentos. Se excreta por vía urinaria, es hidrofílico y atraviesa bien las barreras hematoencefálica, hematoocular y hematóprostática (Ettinger & Feldman, 2004). El uso de anfotericina B por vía intravenosa es de elección para el tratamiento de las formas sistémicas o graves.

Otra droga de elección es la trimetoprima en asociación con sulfametoxazol. La duración del tratamiento varía según la severidad del caso (12-24 meses) (Ettinger & Feldman, 2004).

En los últimos años, los investigadores hicieron foco en el desarrollo de vacunas de diversos tipos para la prevención de la enfermedad. La inhibición de la inmunidad Th-2 o la estimulación de las citoquinas Th-1 incrementan la eficacia del tratamiento (Travassos & Taborda, 2012).

Por otra parte, la proteína gp43, el principal antígeno estudiado de *P. brasiliensis*, estimula al IFN- γ dependiente de Th-1, responsable de generar protección intratraqueal frente a las levaduras virulentas de *P. brasiliensis*. Los epítopes de T-CD4+ fueron atribuidos a P10, un péptido interno de gp43 (Travassos & Taborda, 2012).

P10 ha sido validado como antígeno protector luego de desarrollar distintos protocolos, con distintos adyuvantes y combinación de

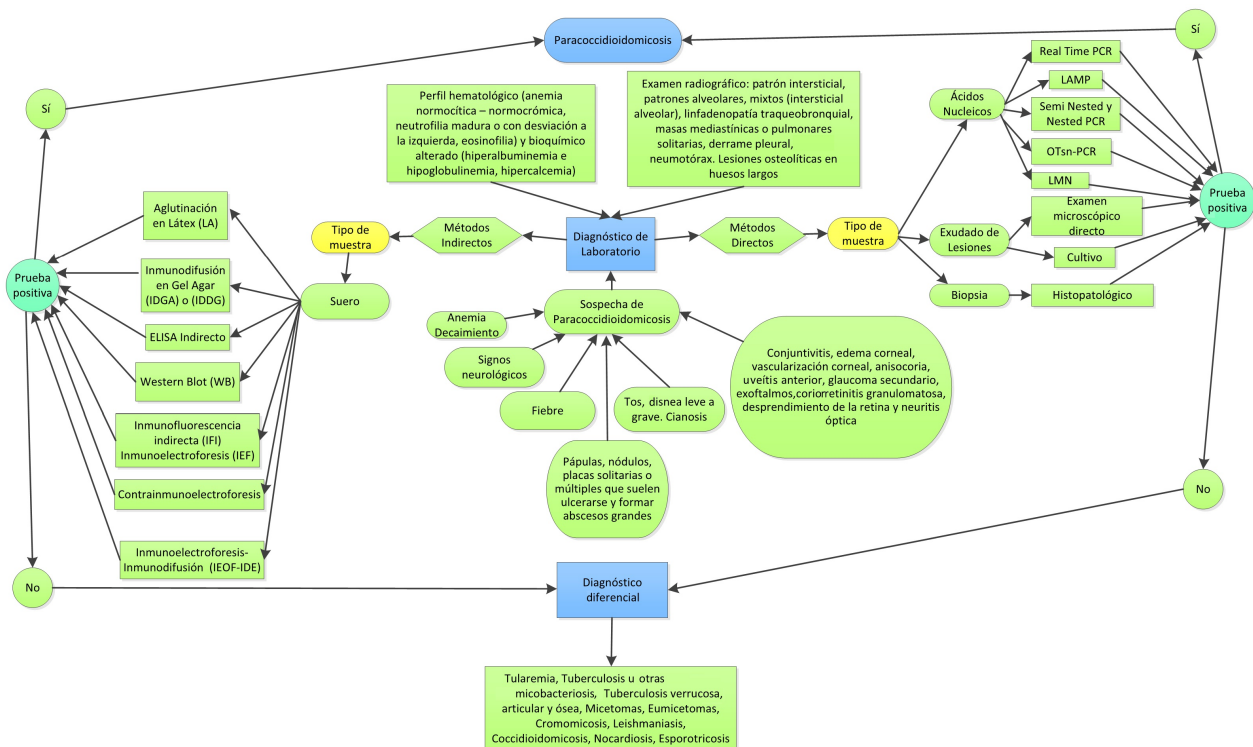


Figura 3. Algoritmo de diagnóstico de la paracoccidioidomicosis.

tratamientos en modelos animales (ratones Balb/c y B10.A). El rol protector de P10 frente a la infección experimental se presenta como una potencial alternativa para alcanzar la inmunización de individuos vulnerables a la infección (Travassos & Taborda, 2012).

En otro trabajo, se utilizó la inoculación de DNA-hsp65 intramuscular en ratones Balb/c, que indujo un aumento de los niveles de citoquinas Th1. Así, se logró una reducción de la carga fúngica, además de una marcada reducción del grado de fibrosis. En ese estudio, se sugirió que el DNA-hsp65 sería un importante aliado en la prevención y terapia de esta micosis (Ribeiro *et al.*, 2009).

Años más tarde, Ribeiro *et al.* utilizaron liposomas para la distribución del DNA-hsp65 en el organismo y para tratar la infección fúngica pulmonar. La formulación moderó la respuesta inmune protectora y produjo reducción de la carga fúngica. Una ventaja importante de este ensayo fue que la administración de la formulación se realizó vía intranasal, aceptada más fácilmente por los ratones en estudio (Ribeiro *et al.*, 2013).

Algoritmo de diagnóstico

En la figura 3 se muestra un algoritmo

simple para arribar al diagnóstico de la paracoccidioidomicosis. Es recomendable que se obtengan resultados positivos de tres o más pruebas para confirmar el diagnóstico.

Discusión y conclusiones

Las técnicas de diagnóstico basadas en la glicoproteína de 43 kDa han demostrado su utilidad para la identificación de *Paracoccidioides brasiliensis*, S1 y PS2. Sin embargo, en el caso de *P. lutzii* se han observado falsos negativos, por lo cual es recomendable emplear más de un antígeno para detectar paracoccidioidomicosis, debido a que esta enfermedad es causada por un complejo de especies (da Silva *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2013).

Aunque en caninos los signos cutáneos solo se presentan en un 30-50 % de los casos, recientemente en Brasil se describió un caso de paracoccidioidomicosis en una perra Labrador con linfadenitis y lesiones cutáneas. En este caso se emplearon técnicas serológicas, citológicas y moleculares (Headley *et al.*, 2017).

Se deben obtener resultados positivos en, al menos, tres pruebas diferentes para un correcto diagnóstico, ya que existen pruebas que presentan falsos positivos por reacción cruzada con otras

micosis, entre las que se pueden mencionar la histoplasmosis o la aspergilosis (da Silva *et al.*, 2016).

Se necesitan más investigaciones para comprender el papel de los perros en el ciclo epidemiológico de *P. brasiliensis*, o determinar si simplemente se trata de un hospedador accidental (Headley *et al.*, 2017), ya que los casos diagnosticados en perros y gatos son escasos.

La disponibilidad de varias técnicas diagnósticas favorecerá la realización de investigaciones en animales para conocer mejor la ecología y la biogeografía de la enfermedad. De esta manera se podrá evaluar adecuadamente el riesgo para las personas y, sobre esta base, implementar estrategias de prevención y control (Arantes *et al.*, 2013; De Sousa *et al.*, 2016; Macalupú, 2014).

Las manifestaciones clínicas en caninos y felinos son inespecíficas. Una correcta anamnesis y el empleo de las pruebas diagnósticas disponibles son herramientas que permiten instaurar prontamente el tratamiento, lo que podrá evitar la forma diseminada de esta micosis con sus graves consecuencias.

Conflicto de intereses

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

Bibliografía

Arantes TD, Theodoro RC, Da Graca Macoris SA, Bagagli E. 2013. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. *Medical Mycology*. 51:83-92.
[doi: 10.3109/13693786.2012.698444](https://doi.org/10.3109/13693786.2012.698444)

Ballesteros A, Beltrán S, Patiño J, Bernal C, Orduz R. 2014. Paracoccidioidomycosis juvenil diseminada diagnosticada en una niña en área urbana. *Biomédica*. 34:21-8.
[doi: 10.7705/biomedica.v34i1.1637](https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1637)

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical Microbiology Reviews*. 6:89-117.

Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, Rivas M C, Davel G, Iachini R. 2010. Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: seroepidemiological study in dogs. *Revista Iberoamericana de Micología*. 27:14-9.
[doi: 10.1016/j.riam.2009.11.002](https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.11.002)

Carrasco-Zuber JE, Navarrete-Dechent C, Bonifaz A, Fich F, Vial-Letelier V, Berroeta-Mauriziano D.

2016. Afectación cutánea en las micosis profundas: una revisión de la literatura. Parte 2. Micosis sistémicas. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 107:806-15.

Cermeño JR, Alvarado P, Mendoza M, Hernández de Cuesta I. 2015. Sensibilidad in vitro de aislados del complejo *Paracoccidioides* spp. a antifúngicos sistémicos utilizando el método de microdilución. *Investigación Clínica*. 56:243-64.

Conti-Díaz IA. 2010. A propósito del centenario del descubrimiento de la paracoccidioidomycosis. Principales hitos de la evolución de su conocimiento con especial énfasis en las contribuciones científicas nacionales. *Revista Médica Uruguaya*. 26:45-50.

Corte AC, Gennari SM, Labruna MB, Camargo LMA, Itano EN, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. 2012. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 32:649-52.
[doi: 10.1590/S0100-736X2012000700011](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700011)

da Silva JF, de Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. 2016. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 84:87-94.
[doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004)

de Farías MR, Condas LA, Ribeiro MG, Bosco S de M, Muro M D, Werner J, Theodoro RC, Bagagli E, Marques SA, Franco M. 2011. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*. 172:147-52.
[doi: 10.1007/s11046-011-9412-z](https://doi.org/10.1007/s11046-011-9412-z)

De Sousa L, Borges A, Badell-Lara M, D' Onofrio Pasaporte M, Di Cumpli-Zaghlul M, Díaz-Ortega A, García-Romero F, Machado-Villarreal V. 2016. Morbilidad causada por contacto con animales en Venezuela (2005-2009). Saber. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*. 28:865-71.

Espinoza Pérez J, Agüero Balbín R, Martínez Meñaca A, Ciorba C, Mora Cuesta V. 2014. Micosis pulmonares. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 11:3949-62.

Ettinger SJ, Feldman EC. 2004. *Veterinary internal medicine*. 6ta edición. Missouri, EE.UU., Elsevier.

Fontana FF, Dos Santos CT, Esteves FM, Rocha A, Fernandes GF, do Amaral CC, Domingues MA, De Camargo ZP, Silva-Vergara ML. 2010. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*.

169:159-65.

doi: [10.1007/s11046-009-9241-5](https://doi.org/10.1007/s11046-009-9241-5)

Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, De Camargo ZP. 2000. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:3478-80.

Headley SA, Pretto-Giordano LG, Di Santis GW, Gomes LA, Macagnan R, da Nobrega DF, Leite KM, De Alcántara BK, Itano EN, Alfieri AA, Ono MA. 2017. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. *Mycopathologia*. 182:425-34.

doi: [10.1007/s11046-016-0075-7](https://doi.org/10.1007/s11046-016-0075-7)

Hrycyk MF, García Garcés H, Bosco SMG, de Oliveira SL, Márques SA, Bagagli E. 2018. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. *Medical Mycology*. doi: [10.1093/mmy/myx142](https://doi.org/10.1093/mmy/myx142)

Imai T, Sano A, Mikami Y, Watanabe K, Aoki FH, Branchini ML, Negroni R, Nishimura K, Miyaji M. 2000. A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5 x 8S regions. *Medical Mycology*. 38:323-6.

Levorato AD, Moris DV, de Souza Cavalcante R, Sylvestre TF, de Azevedo PZ, de Carvalho LR, Mendes RP. 2018. Evaluation of the hepatobiliary system in patients with paracoccidioidomycosis treated with cotrimoxazole or itraconazole. *Medical Mycology*. 56:531-40.

doi: [10.1093/mmy/myx080](https://doi.org/10.1093/mmy/myx080)

Macedo PM, Almeida-Paes R, Almeida MA, Coelho RA, Oliveira Filho MA, Medeiro DM, Gomes-Silva A, Lima JR, Da-Cruz AM, Zancope-Oliveira RM, Valle A. 2018. Fatal septic shock caused by *Paracoccidioides brasiliensis* phylogenetic species S1 in a young immunocompetent patient: a case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 51:111-4.

doi: [10.1590/0037-8682-0318-2017](https://doi.org/10.1590/0037-8682-0318-2017)

Machado GC, Moris DV, Arantes TD, Silva LRF, Theodoro RC, Mendes RP, Vicentini AP, Bagagli E. 2013. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108:637-43.

Marques SA. 2012. Paracoccidioidomycosis. *Clinics in Dermatology*. 30:610-5.

doi: [10.1016/j.clindermatol.2012.01.006](https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.01.006)

Mendes-Giannini MJS, Camargo ME, Lacaz, CS, Ferreira AW. 1984. Immunoenzymatic absorption

test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 20:103-8.

Morgan R, Bright R, Swartout M. 2004. Clínica de pequeños animales. Madrid-España, Elsevier.

Oliveira GG, Belitardo DR, Balarin MR, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. 2013. Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats. *Mycopathologia*. 176:299-302. doi: [10.1007/s11046-013-9681-9](https://doi.org/10.1007/s11046-013-9681-9)

Perenha-Viana MC, Gonzales IA, Brockelt SR, Machado LN, Svidzinski TI. 2012. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis through a Western blot technique. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19:616-9. doi: [10.1128/CVI.05693-11](https://doi.org/10.1128/CVI.05693-11)

Pérez D, Oviedo J, Gill S. 2014. Paracoccidioidomycosis: características clínicas de 94 casos. *Revista Americana de Medicina Respiratoria*. 14:20-7.

Pitz A de F, Koishi AC, Tavares ER, De Andrade FG, Loth EA, Gandra RF, Venancio EJ. 2013. An optimized one-tube, semi-nested PCR assay for *Paracoccidioides brasiliensis* detection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 46:783-5.

Restrepo A, Moncada LH. 1972. Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Applied Microbiology*. 24:132-7.

Restrepo A, Moncada LH. 1974. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. *Applied Microbiology*. 28:138-44.

Ribeiro AM, Bocca AL, Amaral AC, Faccioli LH, Galetti FC, Zarate-Blades CR, Figueiredo F, Silva CL, Felipe MS. 2009. DNAhsp65 vaccination induces protection in mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Vaccine*. 27:606-13.

Ribeiro AM, Souza AC, Amaral AC, Vasconcelos NM, Jerónimo MS, Carneiro FP, Faccioli LH, Felipe MS, Silva CL, Bocca AL. 2013. Nanobiotechnological approaches to delivery of DNA vaccine against fungal infection. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 9 (2):221-30.

Rojas-Jaimes J, Castillo-Córdova R, Tárraga-González D. 2015. Paracoccidioidomycosis en el sistema nervioso central: reporte de un caso. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 32:183-6.

Schaer M. 2006. Medicina clínica del perro y del gato. Barcelona, España, Masson.

Silveira-Gomes F, Marques-da Silva SH. 2012. Effects of pretreating serum samples on the performance of a latex agglutination test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19:386-90. doi: [10.1128/CVI.05274-11](https://doi.org/10.1128/CVI.05274-11)

Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EN, Silva EA, Landgraf VO, Werneck SM, Camargo ZP, Ono MA. 2006. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*. 162:325-9. doi: [10.1007/s11046-006-0046-5](https://doi.org/10.1007/s11046-006-0046-5)

Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. 2014. Paracoccidioides species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathogens*, 10: e1004397. doi: [10.1371/journal.ppat.1004397](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004397)

Thompson MS. 2008. Diagnóstico diferencial clínico en pequeños animales. Madrid-España, Elsevier-Saunders.

Travassos L, Taborda, CP. 2012. Paracoccidioidomycosis vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 8:1450-3. doi:[10.4161/hv.21283](https://doi.org/10.4161/hv.21283)

Winn WC, Allen SD, Janda WA, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, Woods GL. 2008. Koneman. Diagnóstico microbiológico texto y atlas en color. Buenos Aires, Médica Panamericana.

Yarzabal LA, Biguet J, Vaucelle T, Andrieu S, Torres JM, Da Luz S. (1973). Analisis Inmunoquimico de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 11(1), 80-8. doi: [10.1080/00362177385190171](https://doi.org/10.1080/00362177385190171)

Zurita Macalupú S. 2014. Esporotricosis y paracoccidioides en Perú: experiencias en prevención y control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 31:352-7.

Mielotoxicidad inducida por estrógenos de origen ovárico y leiomiocarcinoma vulvar en una perra.

Comunicación de caso

Ovarian oestrogen-induced myelotoxicity and vulvar leiomyosarcoma in a bitch. Case report

OSORIO-BAÑOS JULIO CESAR^{1, 2, *}, SERVÍN TRUJILLO MIGUEL ÁNGEL³,
GARRIDO BECERRIL INGRID PATRICIA³

1. Unidad de Posgrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 2. Laboratorio de Cáncer Pulmonar, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”, México. 3. Centro Médico Veterinario de Tulancingo, Hidalgo. México.

* Correo electrónico del autor de contacto: juliocesarosba@hotmail.com

Resumen

Las elevadas concentraciones sanguíneas de estrógenos resultan tóxicas para la médula ósea, contribuyendo al desarrollo de hipoplasia medular severa. En estados crónicos, esta puede ser irreversible. Los estrógenos influyen en el desarrollo de tumores del músculo liso en útero, vagina y vulva. Los sarcomas primarios representan solamente el 1-3 % de las neoplasias malignas vulvares en perras; el leiomiocarcinoma es el más común. En este trabajo se describe un caso de mielotoxicidad inducida por estrógenos de origen ovárico y un leiomiocarcinoma vulvar en una perra pit bull de 7 años. El animal presentaba hiporexia, depresión, dificultad para desplazarse, disnea, dolor a la palpación en la región inguinal, disuria, edema vulvar, alopecia simétrica bilateral, agrandamiento de glándulas mamarias y ciclos reproductivos anormales, así como una masa localizada en el labio vulvar izquierdo. Mediante estudios de laboratorio se demostró pancitopenia severa asociada a mielotoxicidad y una concentración de 17 β -estradiol sérico de 185,6 pg/ml. Mediante el examen citológico de la médula ósea se determinó hipoplasia medular. Se realizaron escisión quirúrgica de la masa tumoral y ooforosalingectomía, encontrándose un quiste folicular en el ovario derecho. Se realizaron estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos y se formuló un diagnóstico definitivo de mielotoxicidad inducida por estrógenos y leiomiocarcinoma vulvar.

Palabras clave

anemia, estrógenos, leiomiocarcinoma vulvar, inmunohistoquímica

Abstract

High blood oestrogen concentration leads to bone marrow toxicity contributing to the development of severe and sometimes irreversible bone marrow hypoplasia. Oestrogens also play a role in the development of smooth muscle tumors in the uterus, vagina and vulva. Primary sarcomas represent only 1-3 % of malignant vulvar neoplasms in dogs, with leiomyosarcoma being the most common. This report describes a case of myelotoxicity and vulvar leiomyosarcoma due to ovarian hyperoestrogenism in a 7-year-old pit bull. The patient came to the clinic presenting hyporexia, depression, difficulty to move, dyspnea, pain upon inguinal palpation, dysuria, vulvar edema, bilateral symmetric alopecia, growth of mammary glands and abnormal reproductive cycles, as well as a mass located in the left vulvar lip. Laboratory studies showed severe pancytopenia associated with myelotoxicity and a serum 17 β -oestradiol concentration of 185.6 pg/ml. Hypoplasia was found in the bone marrow aspirate. Surgical excision of the mass was carried out together with oophorosalingectomy, and a follicular cyst was found in the right ovary. Histopathological and immunohistochemical studies were carried out and a definitive diagnosis of oestrogen-induced myelotoxicity and vulvar leiomyosarcoma was made.

Key words

anaemia, oestrogen, vulvar leiomyosarcoma, immunohistochemistry

Introducción

Los estrógenos son compuestos esteroides sintetizados principalmente en los ovarios, corteza adrenal y, en menor cantidad, en hígado, músculos y tejido adiposo (Sontas *et al.*, 2009). Los estrógenos son esenciales para el crecimiento, la formación de características sexuales secundarias, tales como el desarrollo de glándulas mamarias, los cambios conformacionales, el comportamiento y el mantenimiento del ciclo estral; durante el estro y proestro existe mayor concentración de estrógenos séricos (Almeida *et al.*, 2017). Los estrógenos reducen la hematopoyesis por toxicidad directa sobre las células progenitoras y alteran el microambiente estromal disminuyendo los factores de crecimiento e inhibiendo la capacidad de proliferación sobre la médula ósea (Sanpera *et al.*, 2002; Weiss & Wardrop, 2010). En las primeras fases de este proceso se observa hiperplasia granulocítica con leucocitosis, neutrofilia y desviación a la izquierda, trombocitopenia y anemia. En etapas avanzadas, se detecta una pancitopenia moderada a severa con hipoplasia o aplasia medular (Ishii & Young, 2015). Algunas pacientes se recuperan una vez eliminado el agente causal. En estadios crónicos se desarrolla una aplasia medular irreversible con anemia, hipoxemia sistémica, hemorragias masivas e infecciones bacterianas secundarias. Todo esto conduce a un cuadro de shock séptico (Reagan *et al.*, 2011). El incremento de estrógenos puede favorecer el desarrollo de neoplasias de músculo liso en cualquier sitio del tracto reproductor (D'Angelo & Prat, 2009; Puie, 2017).

El leiomioma es una neoplasia mesenquimática maligna de tejidos blandos. En medicina humana representa aproximadamente el 1-3 % de todos los tumores vulvares malignos (Ávila *et al.*, 2001; Suh, 2008). En perras, los tumores uterinos y vulvares representan el 0,4 % de todas las neoplasias; entre ellos, el 10 % son leiomiomas (Serin *et al.*, 2010). En mujeres, estas neoplasias se localizan principalmente en los labios mayores, pero también se han reportado en clítoris y labios menores (Teramae *et al.*, 2014); en perras las paredes vaginales y vestibulares son las más afectadas, mientras que el clítoris y los labios vulvares son las zonas menos involucradas (Ranieri *et al.*, 2018).

Existen escasas comunicaciones acerca de este tumor en animales domésticos, por lo que no se ha establecido la prevalencia según edad ni raza (Manothaludum *et al.*, 1991; Ranieri *et al.*, 2018; Sontas, 2009). Debido a su rareza, tanto en medicina humana como en veterinaria, los protocolos de tratamiento no se encuentran disponibles. Por lo tanto, la escisión con bordes quirúrgicos amplios es el tratamiento recomendado (Behranwala *et al.*, 2004; Çobanoğlu *et al.*, 1996; Moravek *et al.*, 2015; Teramae *et al.*, 2014).

El objetivo de esta comunicación es describir un caso de mielotoxicidad por hiperestro-

genismo ovárico y un leiomioma vulvar en una perra.

Presentación del caso

Se presentó a la consulta una perra pit bull, de 7 años, no castrada, con antecedentes de hiporexia, depresión, dificultad para desplazarse, disnea, ninfomanía y secreción vaginal serosanguinolenta de tres semanas de duración. Durante el examen clínico se observaron las mucosas pálidas, alopecia simétrica bilateral con marcada hiperpigmentación cutánea en la región inguinal, agrandamiento de las glándulas mamarias, abdomen distendido con dolor a la palpación, disuria, descarga vulvar sanguinolenta y hemorragias petequiales y equimóticas en el abdomen y dorso. En el labio vulvar izquierdo se apreció una masa bien delimitada, de 25 cm de diámetro, ulcerada y firme al tacto. Se obtuvieron muestras de sangre para hemograma y química sanguínea y de orina para urianálisis, así como una radiografía latero-lateral de la lesión.

Tabla 1. Hemograma

| Análito | Resultado | Rango de referencia | Unidades |
|---|-----------|---------------------|--------------------|
| Hematocrito | 0,19 | 0,37-0,55 | l/l |
| Hemoglobina | 54 | 120-180 | g/l |
| Eritrocitos | 3,1 | 5,5-8,5 | $\times 10^{12}/l$ |
| Volumen globular medio | 61,2 | 60-77 | fl |
| Concentración globular media de hemoglobina | 284,2 | 320-360 | g/l |
| Reticulocitos | 0 | <60 | $\times 10^9/l$ |
| Plaquetas | 105 | 200-900 | $\times 10^9/l$ |
| Sólidos totales | 55 | 60-75 | g/l |
| Leucocitos | 3,3 | 6,0-17,0 | $\times 10^9/l$ |
| Neutrófilos | 2,3 | 3,0-11,1 | $\times 10^9/l$ |
| Neutrófilos en banda | 0 | 0-0,3 | $\times 10^9/l$ |
| Linfocitos | 0,6 | 1,0-4,8 | $\times 10^9/l$ |
| Monocitos | 0,3 | 0,1-1,4 | $\times 10^9/l$ |
| Eosinófilos | 0,1 | 0,1-0,9 | $\times 10^9/l$ |
| Basófilos | 0 | 0-0,2 | $\times 10^9/l$ |
| Tiempo de protrombina | 8 | 6-12 | s |
| Tiempo de trombina | 5 | 3-8 | s |
| Tiempo de trombolastina parcial activada | 14 | 11-17 | s |

El hemograma reveló anemia normocítica hipocrómica no regenerativa severa, que se asoció con daño medular y hemorragia, leucopenia por neutropenia, linfopenia y trombocitopenia atribuidas a hipoplasia medular (Tabla 1). Los hallazgos en las determinaciones bioquímicas incluyeron hiperbilirrubinemia e incremento de fosfatasa alcalina (relacionadas con colestasis), hipoproteïnemia por albuminemia e hipoglucemia (que se asociaron con la hiporexia), incremento de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa debido a degeneración hepatocelular, e hiperazotemia por compromiso renal (Tabla 2). En las pruebas de coagulación el tiempo de protrombina, trombina y el tiempo de trombolastina parcial activada fueron normales. En la placa radiográfica se observó una masa radiopaca, bien delimitada con densidad homogénea (Figura 1).

Tabla 2. Bioquímica sanguínea

| Analito | Resultado | Rango de referencia | Unidades |
|----------------------------|-----------|---------------------|----------|
| Proteínas totales | 55,2 | 56,6-74,8 | g/l |
| Albumina | 24,7 | 29-40 | g/l |
| Globulinas | 30,5 | 24-39 | g/l |
| Relación A/G | 0,80 | 0,78-1,46 | |
| Glucosa | 2,03 | 3,3-6,8 | mmol/l |
| Urea | 14,2 | 2,1-7,9 | mmol/l |
| Creatinina | 169,4 | 60-126 | μmol/l |
| Bilirrubina total | 8,2 | <5,2 | μmol/l |
| Bilirrubina directa | 3,1 | <1,0 | μmol/l |
| Bilirrubina indirecta | 5,1 | <5,0 | μmol/l |
| Alanina aminotransferasa | 113,8 | 4-70 | UI/l |
| Aspartato aminotransferasa | 84,2 | 12-55 | UI/l |
| Fosfatasa alcalina | 204,7 | 6-189 | UI/l |
| Creatina cinasa | 102,8 | 17-213 | UI/l |

Sobre la base de los resultados de laboratorio se realizó aspirado de médula ósea en la cresta iliaca derecha. Los extendidos fueron fijados y teñidos con la técnica de Wright, observándose marcada disminución de las líneas eritrocítica, mielocítica y linfocítica confirmando el diagnóstico de hipoplasia medular (Figura 2). Se tomaron varias muestras por aspirado de la masa vulvar con aguja delgada, las que fueron fijadas en alcohol 96° y teñidas mediante la técnica de Papanicolaou. Se apreció un fondo de aspecto proteínáceo con abundantes eritrocitos y numerosas células fusiformes neoplásicas dispuestas en forma aislada o en grupos. Estas presentaban bordes celulares parcialmente definidos, citoplasma pálido y núcleo central y oval de extremos romos, de cromatina fina granular, con uno o dos nucléolos evidentes. Se apreciaron moderada anisocitosis, anisocariosis y cariomegalia, incremento de la relación núcleo-citoplasma y pleomorfismo celular (Figura 3).

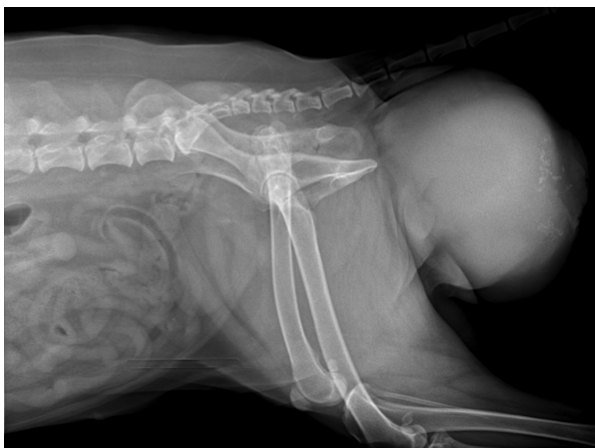


Figura 1. Masa vulvar, bien delimitada, radiolúcida, con densidad homogénea. Proyección latero-lateral.

El valor sérico del 17β-estradiol fue de 185,6 pg/ml (rango de referencia 50-80 pg/ml). Sobre la base de la historia clínica, la evaluación física y los resultados de laboratorio se confirmó una mielotoxicidad inducida por estrógenos.

Se realizó la escisión total de la masa tumoral con vulvectomía radical y bordes quirúrgicos amplios (Figura 4), y ooforosalingectomía, constatándose un quiste folicular de 6,5 cm de diámetro en el ovario derecho. En las muestras de la masa tumoral, procesadas mediante técnicas de rutina, se observó un tejido de neoformación bien delimitado, encapsulado, compuesto por numerosas células mesenquimáticas neoplásicas dispuestas en haces cortos entrelazados o en patrón vertical, delimitadas y sostenidas por un fino estroma fibrovascular. En algunas zonas se apreciaron extensas áreas de necrosis coagulativa y hemorragias. Se contaron 19 figuras mitóticas en 10 campos aleatorios con el objetivo de 40x. Se realizó inmunocitoquímica indirecta mediante la técnica de estreptoavidina-biotina-peroxidasa. Las muestras resultaron positivas para vimentina, desmina y actina de músculo liso. Los resultados fueron negativos para factor VIII y mioglobina. Se formuló el diagnóstico definitivo de leiomioma vulvar (Figura 5).

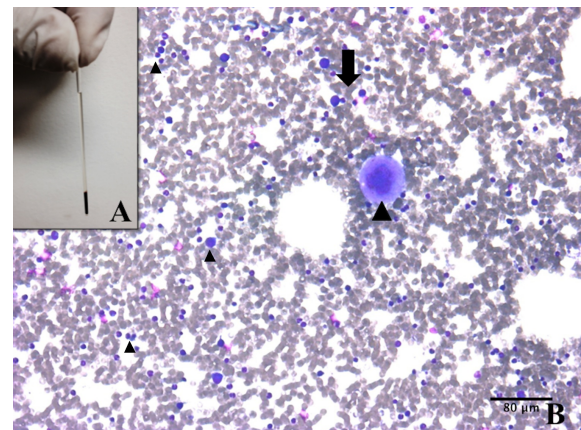


Figura 2. (A). Marcada disminución del hematocrito -anemia severa- (0,19 Hto) (B). Aspirado de médula ósea en la que se aprecia marcada disminución de las líneas eritrocítica (flecha) y mielocítica (puntas de flecha). Wright. Barra = 80 μm.

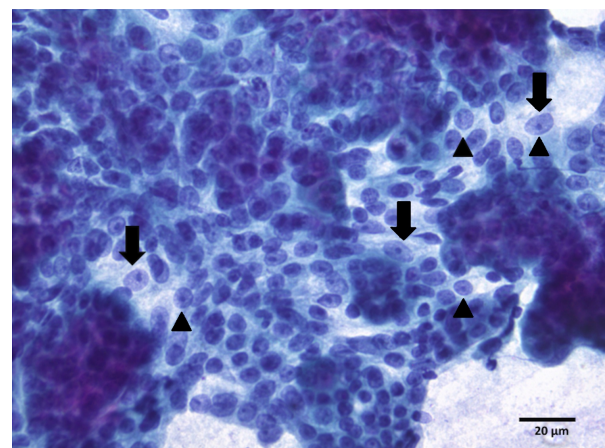


Figura 3. Grupos de células fusiformes con bordes parcialmente definidos (flechas), núcleo central oval con cromatina finamente granular y nucléolo prominente (puntas de flecha). Técnica de Papanicolaou. Barra = 20 μm.



Figura 4. Escisión quirúrgica de la masa, encapsulada y de superficie multinodular con bordes quirúrgicos amplios.

Luego de la cirugía, se instauró un tratamiento con doxiciclina con dosis de 10 mg/kg cada 24 horas, por vía oral, durante 10 días. También se practicó una transfusión sanguínea a fin de restaurar los valores de eritrocitos y plaquetas. Previamente se realizaron pruebas cruzadas de compatibilidad con un perro donante clínicamente sano. Tres semanas después de la cirugía se tomaron muestras sanguíneas para hemograma y química sanguínea, en las cuales se observó ligera leucopenia por neutropenia y un valor de 17 β -estradiol sérico de

65 pg/ml. Seis meses después, cuando se evaluó a la paciente, no presentaba ninguna alteración hematológica ni evidencia de recurrencia tumoral (Figura 6).

Discusión

La mielotoxicidad inducida por estrógenos genera un daño directo en las células precursoras hematopoyéticas de la médula ósea, induciendo un aumento transitorio en la granulopoyesis. En el hemograma se observan leucocitosis por neutrofilia y anemia normocítica normocrómica no regenerativa asociadas a hipoplasia medular, la que provoca pancitopenia de moderada a grave. Las petequias, la secreción serosanguinolenta y el edema vulvar observados en la paciente sugieren un efecto estrogénico (Pineda *et al.*, 2008; Reagan *et al.*, 2011; Ishii & Young, 2015). En casos de exposición crónica, la pancitopenia puede persistir, a pesar de la eliminación de la fuente de estrógenos, siendo irreversible (Weiss *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2017). Las pacientes son susceptibles a infecciones bacterianas debido a la neutropenia, trombocitopenia y anemia, por lo que se requieren un esquema de tratamiento con antibioterapia de amplio espectro y la restauración del volumen sanguíneo circulante. La sensibilidad de la médula ósea a los efectos mielotóxicos de los

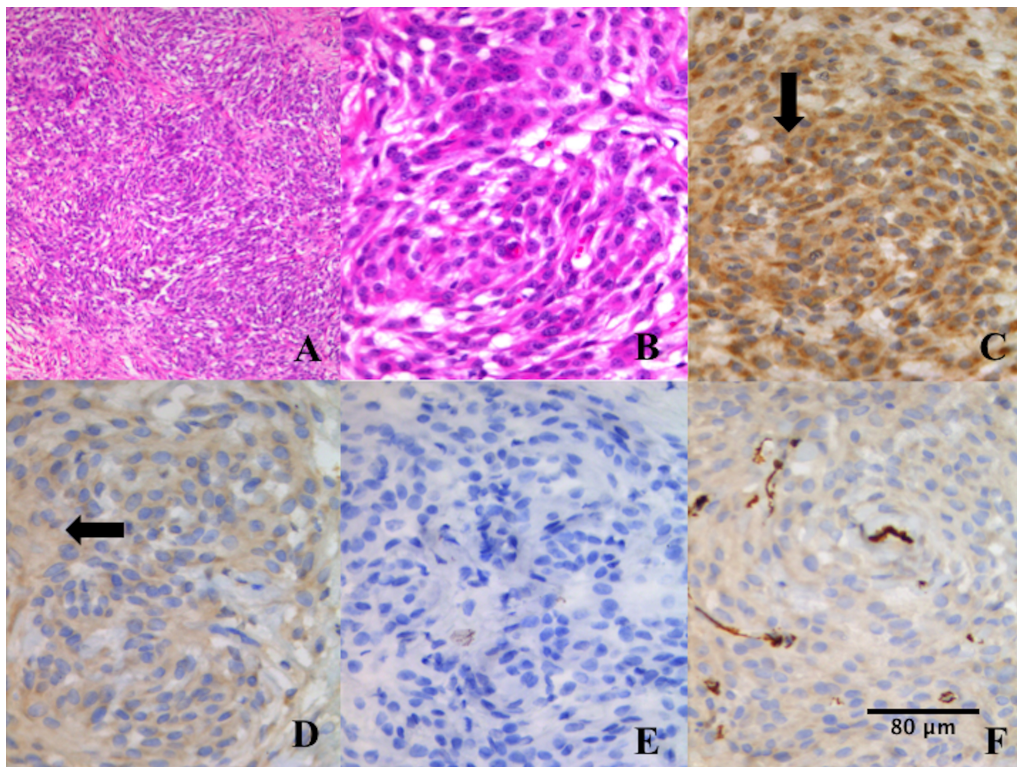


Figura 5. Aspecto microscópico e inmunotipificación del tumor. (A). Células neoplásicas en un patrón verticilar formando haces. HE. (B). Células fusiformes con bordes poco definidos y cromatina finamente granular. HE. (C). Actina de músculo liso, positividad en citoplasma (flecha). IHQ. (D). Vimentina, positividad en citoplasma (flecha). IHQ. (E). Mioglobina, IHQ. (F). Desmina. IHQ. Barra = (A) 160 μ m; (B-F) 80 μ m.

estrógenos depende de muchos factores, incluyendo la edad, la condición física y el estado de nutrición del paciente. Los gatos presentan una fuerte resistencia a la toxicidad de estrógenos, mientras que los perros son muy sensibles (Sontas *et al.*, 2009).



Figura 6. Evaluación posoperatoria a 6 meses, sin recidiva tumoral.

El leiomiomasarcoma vulvar es una neoplasia poco frecuente en animales domésticos, es de comportamiento localmente infiltrativo a tejidos blandos adyacentes y se origina de células mesenquimáticas con diferenciación muscular lisa (Teramae *et al.*, 2014). Entre los principales diagnósticos diferenciales que se deben considerar se encuentran el raiomiosarcoma, el fibrosarcoma, el fibroma, el fibrohistiocitoma, el hemangiosarcoma, el mixosarcoma, el liposarcoma e inclusive los quistes de las glándulas vestibulares mayores (en humanos) (Korkmaz *et al.*, 2016; Manothaludum, 1991). La inmunotipificación se ha convertido en una técnica complementaria del diagnóstico morfológico de tumores y cada vez ha cobrado mayor importancia en medicina veterinaria. Su implementación tiene valor diagnóstico, pronóstico y de orientación terapéutica (Ramos-Vara, 2005). D'Angelo & Prat, (2009) comunican que desde el punto de vista inmunocitoquímico, los leiomiomasarcomas muestran reacción positiva para la actina de músculo liso (SMA), desmina y vimentina, tal como ocurrió en este caso, y negativa para la proteína S100, mioglobina, FVIII y CD34 (Dennis *et al.*, 2011).

El 85 % de los tumores de músculo liso de los sistemas urinario y reproductor en caninos se localiza en el útero. Estos tumores son, en su mayor parte, benignos (leiomiomas) y están asociados con un desequilibrio hormonal (Çobanoğlu *et al.*, 1996). Los leiomiomasarcomas, además de en el útero, han sido hallados en la vagina, uretra y, rara vez, en ovarios, ligamento úterosacro, retroperitoneo y vulva, tanto en mujeres como en perras (Ávila *et al.*, 2001; Ranieri *et al.*, 2018; Suh & Park, 2008). En este caso el tumor se localizó en el labio vulvar izquierdo, un sitio poco frecuente. El incremento de estrógenos de origen ovárico produ-

jo alopecia; también se observó el agrandamiento de las glándulas mamarias y cambios de comportamiento como ninfomanía. La alta concentración de estrógenos circulantes causó toxicidad en las células hematopoyéticas originando pancitopenia.

Los escasos reportes registrados acerca del leiomiomasarcoma vulvar indican que suele localizarse en los labios mayores, que es un tumor único, redondeado, bien delimitado y encapsulado, como se observó en este caso. La causa no está establecida; sin embargo, Teramae *et al.* (2014) informan que el leiomiomasarcoma aparece durante la etapa reproductiva; en este caso se sugiere la participación del incremento de estrógenos de origen ovárico como factor predisponente en el desarrollo del leiomiomasarcoma (Meuten, 2016, Teramae *et al.*, 2014). Dennis *et al.* (2011) describen varios factores predictivos y pronósticos entre los cuales incluyen el grado histológico, el tamaño del tumor, su localización, la invasión a tejidos adyacentes y el índice mitótico, éste último es un factor pronóstico y diagnóstico; un alto índice mitótico se asocia con recurrencia, metástasis y reducción en el tiempo de supervivencia.

Sanpera *et al.* (2002), en la descripción de un caso, concluyen que la interrupción en la producción de estrógenos o de progesterona de origen ovárico por agonistas de GnRH resulta en la reducción del tamaño del tumor. Sin embargo, el tratamiento establecido es la escisión quirúrgica del tumor con bordes quirúrgicos amplios.

Conclusiones

El leiomiomasarcoma vulvar debe ser considerado entre los diagnósticos diferenciales frente a una masa vulvar en una perra. En casos de anemia concomitante se recomienda la medición de la concentración de estradiol. El diagnóstico definitivo del tumor se basa en sus características morfológicas y el factor pronóstico más relevante es el grado de diferenciación del tumor. La incorporación de la inmunohistoquímica en el diagnóstico de tumores vulvares ha sido útil para facilitar el diagnóstico asertivo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Hospital Veterinario de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo-México por el apoyo en la utilización del equipo para la obtención de las radiografías digitales y en el seguimiento del caso.

Conflicto de intereses

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

Bibliografía

- Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O'Brien A, Bouillon R, Vanderschueren D. 2017. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 97(1): 135-87. doi: [10.1152/physrev.00033.2015](https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2015)
- Ávila ML, Torres AL, Cruz OH, Rojo HG. 2001. Leiomyosarcoma de la vulva. Presentación de un caso con 22 años de seguimiento. *Revista Médica del Hospital General de México*. 64(2):100-3.
- Behranwala KA, Latifaj B, Blake P, Barton DPJ, Shepherd JH, Thomas JM. 2004. Vulvar soft tissue tumors. *International Journal of Gynecological Cancer*. 14(1):94-9.
- Çobanoğlu Ö, Gürkan ZC, Ergun Y, Kutivay L. 1996. Leiomyosarcoma of the vagina. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 70(2):205-207.
- D'Angelo E, Prat J. 2009. Uterine sarcomas: a review. *Gynecologic Oncology*. 30(1):1-9. doi: [10.1016/j.ygyno.2009.09.023](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.09.023)
- Dennis MM, McSparran KD, Bacon NJ, Schulman FY, Foster RA, Powers BE. 2011. Prognostic factors for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in dogs. *Veterinary Pathology*. 48(1):73-84. doi: [10.1177/0300985810388820](https://doi.org/10.1177/0300985810388820)
- Ishii K, Young NS. 2015. Anemia of central origin. *Seminars in Hematology*. 52 (4):321-38. doi: [10.1053/j.seminhematol.2015.07.002](https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2015.07.002)
- Korkmaz V, Kurdoglu Z, Karadag B, Arslanca T, Caydere M, Ergun Y. 2016. A rare case of leiomyosarcoma localized in the Bartholin's gland area and review of the literature. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 42(1):589-92. doi: [10.1111/jog.12943](https://doi.org/10.1111/jog.12943)
- Manothaludum K, Johnston SD. 1991. Clinical approach to vaginal/vestibular masses in the bitch. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 21 (3):509-21.
- Meuten DJ. 2016. Tumors in domestic animals. 5^o Ed. John Wiley & Sons Inc. Iowa.
- Moravek MB, Yin P, Ono Masanori, Coon JSV, Dyson MT, Navarro A, Marsh EE. 2015. Ovarian steroids, stem cells and uterine leiomyoma: therapeutic implications. *Human Reproduction Update*. 21(1):1-12. doi: [10.1093/humupd/dmu048](https://doi.org/10.1093/humupd/dmu048)
- Pineda DKM, Rosas GG, Rosas GMI, Rosas UA. 2008. Biopsias de médula ósea: utilidad y limitaciones. *Patología*. 46(1):237-47.
- Puie N, Trica LP, Naggy GA, Rusu I, Sovrea AS, Georgiu C. 2017. Hemorrhagic polypoid gastric and colonic metastasis nine years after uterine leiomyosarcoma, case report. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 58(3):1017-22.
- Ramos-Vara JA. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 41 (4):405-26. doi: [10.1354/vp.42-4-405](https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405)
- Reagan WJ, Irizarry-Rovira A, Poitout-Belissent F, Provencher BA, Shashi K, Travlos G, Walker D, Bounous D, Walter G. 2011. Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Toxicologic Pathology*. 30(2):435-48. doi: [10.1177/0192623310396907](https://doi.org/10.1177/0192623310396907)
- Sanpera N, Masot N, Janer M, Romeo C, De Pedro R. 2002. Oestrogen-induced bone marrow aplasia in a dog with a Sertoli cell tumour. *Journal of Small Animal Practice*. 43(8):365-9.
- Serin G, Aydogan A, Yaygingul R, Tuncan R. 2010. Uterine leiomyosarcoma in a dog: a case report. *Veterinarni Medicina*. 55(8):405-8. doi: [10.17221/2959-VETMED](https://doi.org/10.17221/2959-VETMED)
- Sontas HB, Dokuzeylu B, Turna O, Ekici H. 2009. Estrogen-induced myelotoxicity in dogs: a review. *Canadian Veterinary Journal*. 50(10):1054-8.
- Suh MJ, Park DC. 2008. Leiomyosarcoma of the vagina: a case report and review from the literature. *Journal of Gynecologic Oncology*. 19(4): 261-4. doi: [10.3802/jgo.2008.19.4.261](https://doi.org/10.3802/jgo.2008.19.4.261)
- Teramae M, Fukuda T, Imai K, Yamauchi M, Hashiguchi Y, Ichimura T, Yasui T, Sumi T. 2014. Leiomyosarcoma of the vulva: a case report. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*. 3(1): 225-8. doi: [10.5455/2320-1770.ijrcog20140345](https://doi.org/10.5455/2320-1770.ijrcog20140345)
- Verin R, Cian F, Stewart J, Binanti D, MacNeill AL, Piviani M, Monti P, Baroni G, Calvez S, Scase TJ, Finotello R. 2018. A clinical, cytologic, histopathologic, immunohistochemical, and ultra-structural study. *Veterinary Pathology*. 55 (4):501-9. doi: [10.1177/0300985818759772](https://doi.org/10.1177/0300985818759772)
- Weiss DJ, Wardrop JK. 2010. Schalm's Veterinary Hematology. 6^o Ed. Ames, Wiley-Blackwell.

INFORMACION PARA AUTORES/AS

Política editorial y generalidades

Las opiniones expresadas en los artículos publicados en ANALECTA VETERINARIA no reflejan, necesariamente, las opiniones de este medio. ANALECTA VETERINARIA autoriza la reproducción de sus artículos con fines académicos, con la única condición de la mención de la fuente, cuando corresponda. El uso de nombres comerciales destinados a la identificación de productos, en el contexto de los artículos presentados, no implica respaldo directo o indirecto ni promoción de dichos productos por parte de la revista.

Los autores/as ceden a ANALECTA VETERINARIA los derechos de autoría de manera no exclusiva, se hacen responsables de los datos y el contenido, dejan constancia de haber participado activamente en el proceso de la investigación y/o la elaboración del trabajo, declaran la existencia, o no, de conflicto de intereses, mencionan los soportes financieros y explicitan la aprobación por los comités institucionales y autoridades regulatorias que correspondan a cada caso. Es su responsabilidad exclusiva contar con autorización para citar datos no publicados. No se asume responsabilidad editorial por la exactitud de las referencias. Eventualmente, el Consejo Editorial podrá requerir información probatoria.

Idiomas

ANALECTA VETERINARIA acepta artículos en idioma español o en inglés. Los títulos, resúmenes y palabras clave de los artículos se publicarán en ambos idiomas.

Originalidad

La información contenida en el trabajo debe ser original (no publicada). No podrá estar en proceso de evaluación en más de una revista u otro medio de comunicación. El plagio (igual o muy similar información publicada con otra autoría en otro medio) y la publicación duplicada (información ya publicada por cualquier remitente) se consideran faltas éticas graves, que invalidan su publicación en ANALECTA VETERINARIA.

Normas de ética

Con respecto a la definición de la autoría, las responsabilidades de los editores y las causas que obran como posible conflicto de intereses, ANALECTA VETERINARIA adhiere a las recomendaciones del International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>).

En relación con otros aspectos, como el formato y el estilo de preparación del original, ANALECTA VETERINARIA establece un conjunto de normas que se detallan en “Instrucciones para la preparación del trabajo”. Todas las dudas que se susciten podrán ser consultadas por correo electrónico a: analecta@fcv.unlp.edu.ar

El Consejo Editorial de ANALECTA VETERINARIA tiene en consideración el tratamiento ético de los animales de experimentación y se reserva el derecho de no publicar trabajos que no cumplan esta premisa. El envío de cada artículo incluirá la certificación de aprobación, por parte del comité de ética de su unidad académica, de los procedimientos realizados para ese trabajo. De no ser posible, se consignará según qué normas éticas nacionales o internacionales se realizaron sus trabajos.

Tipos de trabajos para publicación

Se aceptan envíos de: trabajos de investigación, trabajos de investigación en educación, comunicaciones cortas, descripciones de casos, informes técnicos, artículos de revisión y (solamente por parte de organizadores) resúmenes de presentaciones en reuniones científicas (ver 1.3). El Consejo Editorial decidirá la prioridad de publicación de cada trabajo y la proporción de cada tipo, privilegiando aquellos de investigación.

Instrucciones para la preparación del trabajo

Características generales

El idioma del trabajo puede ser el español o el inglés. Se prefiere que los trabajos escritos en inglés sigan la gramática propia del inglés británico. Se aceptan otras variantes del idioma inglés, siempre que se respeten de manera uniforme en todo el trabajo.

Las unidades de medida se expresarán según el Sistema Internacional de Medidas (<http://www.cem.es/sites/default/files/siu8edes.pdf>). Las abreviaturas deberán ser aclaradas la primera vez que el término o expresión se mencione, pero no será necesaria su utilización si este se menciona menos de cinco veces. Si el trabajo requiere el uso de numerosas abreviaturas (más de diez) deberá generarse una lista, que se incluirá luego de los resúmenes. Ciertas siglas, acrónimos y abreviaturas (ATP, ADN, ELISA, OMS, PBS, Dr., n°, entre otras) no requieren aclaración.

Para la denominación de sustancias, agentes biológicos de enfermedad, términos anatómicos,

etc., se seguirán las recomendaciones de las nóminas y consensos vigentes para la especialidad correspondiente. Los productos comerciales deberán ser identificados mediante el símbolo de marca registrada (®) consignando, además, los nombres genéricos de los componentes principales. Si la mención se efectúa en el apartado “Materiales y métodos”, deberán consignarse, además, el nombre y la dirección del fabricante (ciudad, país). Los nombres científicos de categoría genérica o inferior se escribirán en cursivas.

Original para publicación (generalidades)

El original para publicación comprende un documento principal y otros archivos

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

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

1- Documento principal

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

El documento se configurará en formato de hoja A4, con márgenes de 3 cm como mínimo por lado y 1,5 de interlineado. El texto deberá alinearse en los márgenes izquierdo y derecho (texto justificado). Se utilizará el tipo de fuente Times New Roman de 12 puntos. Las páginas deberán estar numeradas, utilizando números arábigos en su ángulo inferior derecho. Asimismo, las líneas deberán estar numeradas a lo largo de todo el documento de manera consecutiva, comenzando en la primera página o página de presentación. El uso de guiones automáticos de separación de palabras en sílabas estará permitido exclusivamente para los resúmenes de presentaciones en reuniones científicas.

1.2. Otras características comunes a todo tipo de trabajos

1.2.1. Primera página

La primera página contendrá el título del trabajo en dos idiomas, los nombres de autores/as, su respectiva filiación/lugar de trabajo, los datos completos de quien remita el trabajo y constituya el contacto y el título abreviado del trabajo. Se deberán consignar, en lo posible, direcciones de correo oficial

(institucional). De ser necesario, esta página podrá sobrepasar la extensión de la hoja A4. A continuación, se dan mayores precisiones acerca de cada ítem.

- **Título del trabajo.** Se escribirá con la inicial en mayúscula (tipo oración) y en negrita, centrado, con fuente Times New Roman y tamaño de fuente 14 puntos. Será conciso, pero suficientemente informativo. Es deseable la inclusión de alguna conclusión del trabajo en su título. No deberá contener abreviaturas sin aclarar, y solo contendrá siglas, acrónimos o acortamientos ampliamente divulgados (ej: ADN, sida, OMS). Se dejará un espacio de interlineado y luego se consignará el título en inglés (o en español, si el artículo estuviera escrito en inglés), con las mismas características tipográficas.

- **Identificación de autores/as.** Dejando un espacio después del título en el segundo idioma, se escribirá primero el/los apellido/s, una coma, y luego todos los nombres completos. Se continuará de esta manera, separándolos mediante punto y coma (;). Se colocarán números con formato de superíndice para indicar la filiación institucional. A continuación del superíndice, alentamos la inclusión del código de identificación ORCID (del inglés: *Open Researcher and Contributor ID*), que en el artículo definitivo constituirá un ícono con hipervínculo (ver ejemplo de primera página más adelante). El autor o la autora de contacto serán identificados con un asterisco.

- **Filiación institucional/Lugar de trabajo.** Se consignará a renglón seguido. En primer término, se deberá indicar la unidad de investigación (Cátedra, grupo de trabajo, Laboratorio, Instituto). Luego, la Facultad u otra institución de la que depende, la Universidad u organismo superior.

Quienes consignent su pertenencia a alguna agencia de investigación deberán hacer constar, además, en dependencias de qué institución trabajan, por ejemplo: “...Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias...”.

En caso de tratarse de un profesional de actividad en el ámbito privado se consignará “profesional independiente”, localidad y país de trabajo.

Si todos los lugares de trabajo se encuentran en un mismo país, este puede consignarse al final de las filiaciones laborales. De lo contrario, los diferentes países deberán constar en cada lugar de trabajo.

A renglón seguido constará la dirección de correo electrónico de contacto (para formato, ver ejemplo).

Aun las siglas de instituciones reconocidas en el ámbito de las ciencias veterinarias deben ser aclaradas, ya que pueden resultar desconocidas para habitantes de otros países.

- **Título abreviado.** Se escribirá en el mismo idioma que el trabajo, luego del correo electrónico de con-

tacto, dejando un espacio. Consistirá en un título corto y representativo, de 45 caracteres o menos, incluyendo espacios.

- *Datos personales.* Por debajo del título abreviado se consignarán la dirección postal laboral completa y el teléfono del autor/a de contacto. Sólo la dirección de correo electrónico será visible en la versión publicada.

Las direcciones de correo electrónico del resto de los/las autores/as deberán ser incorporadas en la sección de metadatos durante el proceso de envío en línea, pero no serán publicadas.

Ejemplo de primera página

Título completo en el idioma del trabajo

Título en el segundo idioma

Conte Heckel, Luna Mariana¹; Domínguez Tahiel, Ginés^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-xxxx-xxxx>; Margueles, Paula³; Belgrano Kaspar, Julián⁴; Irustar, Alfredo Nain^{1*}

1. Cátedra, Departamento, Facultad, Universidad, Argentina. 2. Laboratorio, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad, Universidad. Argentina. 3. Profesional independiente. Berazategui, Argentina; 4. Laboratorio, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

*Correo electrónico del autor de contacto: ian@mail.edu

Título abreviado

Datos del/la autor/a de contacto (*)

Dirección postal laboral completa y teléfono de contacto

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

La segunda página contendrá el resumen del trabajo en el idioma en que fue redactado, bajo el subtítulo Resumen y, por debajo, dejando un espacio, se incluirán las palabras clave en el mismo idioma, bajo el subtítulo Palabras clave. En la siguiente página (tercera), se redactará el resumen en el segundo idioma (en inglés se subtitulará como Abstract). Dejado un espacio, se consignarán las palabras clave con el subtítulo: Key words.

- *Características de los resúmenes.* En ellos se incluirán los objetivos, principales resultados y conclusiones, desarrollados en 200 palabras o menos. Se sugiere evitar acrónimos, siglas y abreviaturas. No estarán divididos en secciones ni contendrán citas bibliográficas.

- *Palabras clave.* Son palabras o expresiones adicionales que facilitan la recuperación del documento a partir de bases de datos bibliográficos. Para una mayor utilidad en la búsqueda dentro de los sistemas de indización, se sugiere la utilización de términos no incluidos en el título. Se aceptarán entre 3 y 5 palabras separadas mediante comas.

1.2.3. Páginas sucesivas

Contendrán el texto, los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses, la bibliografía y las leyendas para las figuras.

- *Texto.* Organizado en secciones, según el tipo de trabajo. Estas estarán encabezadas por subtítulos en mayúsculas/minúsculas (tipo oración), sin punto final. El texto contendrá las entradas para todas las tablas, figuras, referencias bibliográficas y material complementario. A continuación del texto se enunciarán los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses y la lista de referencias bibliográficas (bajo el subtítulo Bibliografía).

- *Agradecimientos.* Se podrá agradecer a personas que hayan realizado aportes significativos que no constituyen autoría. En este apartado deberá consignarse, además, la fuente de financiamiento del trabajo e incluir los códigos de identificación de proyectos subsidiados.

- *Declaración de conflicto de intereses.* Existe un conflicto de intereses cuando el juicio profesional con respecto a un interés primario (el bienestar del paciente, la validez de la investigación) puede ser influenciado por un interés secundario (como el beneficio económico). Bajo este título:

a- podrán consignarse las relaciones financieras o personales con organizaciones o personas que pueden influenciar o sesgar los resultados del trabajo

b- se podrá declarar que no existe conflicto de intereses.

Ejemplo:

No existe conflicto de intereses, incluyendo entre estos últimos las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

- *Bibliografía.* ANALECTA VETERINARIA utiliza el formato de referencias basado en el estilo Harvard,

del tipo “autor-año” en el texto y por orden alfabético en la lista de referencias.

Todos los artículos u otras fuentes utilizadas como referencias deberán ser accesibles en línea o mediante buscadores bibliográficos. En caso contrario, podrá ser requerido el envío del documento a pedido de los evaluadores o del Consejo Editorial. Las fuentes basadas en comunicaciones presentadas en reuniones científicas, comunicaciones personales, manuales de procedimientos, protocolos de instituciones y tesis deberán reducirse al mínimo y solamente se justificará su incorporación en caso de que no se registre una fuente publicada en otro medio.

Formato de las citas en el texto

Se consignará, entre paréntesis, en color de fuente azul (incluidos los paréntesis): el apellido del/la primer/a autor/a (seguido de la expresión *et al.*, si se trata de más de dos autores/as) y el año de publicación, separado por una coma, según el ejemplo. Si el artículo tiene solamente dos autores/as, se consignarán ambos, separados por el signo: &. Si la construcción así lo requiriese, podrá ubicarse la cita a mitad de la oración.

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

... similares a los músculos maseteros del ciervo axis (Mateo & Sánchez, 2016).

Los autores también podrían haber elegido expresar:

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

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

... en las células apoptóticas se produce la externalización de la fosfatidilserina de la membrana (Fadok *et al.*, 1992; Savill, 1993, 1997; Willie, 1997).

Si se incluyeran dos o más referencias del/la mismo/a primer/a autor/a y del mismo año, se identificarán con letras:

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

Estas mismas letras deberán ser consignadas, posteriormente, en la lista de referencias.

Las referencias a comunicaciones personales se indicarán entre paréntesis del siguiente modo: (comunicación personal, autor/a, año), pudiendo omitirse el autor si está consignado en el texto.

Formato de las referencias en la Bibliografía (lista de referencias)

El orden será alfabético y cada cita deberá incluir la totalidad de autores/as.

Artículos en publicaciones periódicas

Se citará la nómina completa de autores/as y sus iniciales, separados/as por comas. Luego se consignará el año entre puntos. A continuación, el título del trabajo con mayúsculas y minúsculas (tipo oración), sin comillas ni negritas. A continuación, el título completo de la revista seguido de un punto. Luego, el volumen, número de la revista (entre paréntesis), seguido de dos puntos y las páginas del artículo separadas por un guión, en ese orden, sin espacios luego de los signos de puntuación. En el caso de estar disponible, se incorporará el Digital Object Identifier (DOI) al final de la referencia, según el formato que se muestra a continuación:

Rensetti D, Marin M, Quintana S, Morán P, Verna A, Odeón A, Pérez S. 2016. Involvement of tolllike receptors 3 and 7/8 in the neuropathogenesis of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Research in Veterinary Science*. 107:1-7. doi:10.1016/j.rvsc.2016.04.009

Buldain D, Buchamer A, Marchetti L, Aliverti F, Borja C, Mestorino N. 2017. Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* frente a *Staphylococcus aureus*. *Analecta Veterinaria*. 37 (2):33-9. doi:10.24215/15142590e014

Si se trata de una publicación anticipada disponible en línea, que no forma parte de un volumen, esta situación deberá consignarse.

Libros

Se citarán los/las autores/as, el año de publicación, el título y la edición (si no es la primera). Luego, la ciudad de la publicación y el nombre de la editorial, separados por coma.

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

Capítulos de libros

La cita constará de: autores/as del capítulo y título del capítulo. En: autores/as del libro. Año de publicación. Título del libro, edición (si no es la

primera). Ciudad de publicación, nombre de la editorial y páginas inicial y final del capítulo.

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

Lewin B. Chapter 4: Clusters and repeats. En: Lewin B. 2003. Genes VIII. Upper Saddle River, Pearson Education Inc., pp. 85-133.

Resúmenes de presentaciones en reuniones científicas

Se utilizará un formato similar al de los artículos en revistas, consignando, luego del título del trabajo, el nombre de la reunión. Luego, ciudad, país y página.

Pardini L, Bacigalupe D, Moré G, Rambeaud M, Basso W, Perfumo CJ, Hermann DC, Schares G, Venturini MC. 2011. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains in slaughtered pigs from Argentina. The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Buenos Aires, Argentina, p. 336.

Tesis de maestría o doctorado y trabajos finales de especialización

Se indicará autor/a y año. Luego, el título de la tesis/trabajo. A continuación, el indicador "Tesis de" o "Trabajo de" seguido de la carrera e institución que otorga el título. Posteriormente, se indicará la localización del recurso (URL) desde el que la tesis o trabajo final pueden ser recuperados, en caso de estar depositados en un repositorio institucional.

Huber B. 2012. Estudio farmacocinético de tilosina en abejas melíferas. Variables con impacto en el nivel de residuos en miel. Tesis de Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/1592>.

Muriel M. 2016. Determinación de la cinética del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica en equinos sometidos a esfuerzo físico de alta intensidad. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/59227>.

Libros electrónicos de acceso libre en internet

Autores/as. Año de publicación. Título como figura en el buscador correspondiente [libro electrónico/ebook]. DOI (si estuviera disponible). Lugar de publicación (si se conoce), editor. Disponible en: (URL) [fecha de acceso].

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. 2012. Rang y Dale Farmacología. Séptima Edición [libro electrónico]. Amsterdam, Elsevier. Disponible en: <https://goo.gl/NFIeWT> [Consultado 01/06/2017].

Frank SA. 2002. Immunology and Evolution of Infectious Disease [ebook]. Princeton, Princeton University Press. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2394/> [Consultado 01/06/2017].

Página web/Website

AAutores/as. Año de publicación. Título de la página. [En línea] Disponible en: (URL). [Consultado (fecha de consulta)].

Abramowitz M, Davidson MW. 2018. Anatomy of the Microscope: Introduction. [En línea] Disponible en: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/introduction/> [Consultado 20/11/2018].

Organizacion Mundial de la Salud (OIE). 2018. Encefalopatía espongiforme bovina (EEB). [En línea] Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/encefalopatia-espongiforme-bovina/> [Consultado 20/11/2018]

En caso de dudas acerca de cómo citar otro tipo de material (estándares internacionales, leyes, publicaciones parciales en libros electrónicos de reuniones científicas, patentes, informes de organizaciones, etc.) comunicarse con el consejo editorial, iniciando un hilo de discusión en el portal de la revista.

- *leyenda para las figuras*. Forman parte del documento principal, pero se redactarán en hoja aparte.

1.3. Características particulares de cada trabajo

En ANALECTA VETERINARIA se publican trabajos en 8 secciones. Estas son:

- **Nota editorial.** Se trata de la presentación del número o del volumen. Es publicada por el Director de la revista, en ocasiones particulares.

- **Trabajos de investigación.** Son informes completos de investigaciones originales o de meta análisis. Constan de los siguientes apartados (4): Introducción, Materiales y métodos, Resultados, y Discusión y conclusiones.

- **Artículos de investigación en enseñanza.** Se trata de trabajos que constituyan un aporte para la enseñanza de las Ciencias Veterinarias (trabajos de investigación propiamente dicha, intervenciones, etc.), que sean superadores de la mera presentación de resultados cuantitativos e incluyan el correspondiente análisis. Constan de los siguientes apartados (5): Introducción (en el que deberán consignarse el motivo de interés, el estado actual de la cuestión, los fundamentos teóricos en que se enmarca y los objetivos y podrán incluirse hipótesis de trabajo), Métodos, Resultados (presentación y análisis), Discusión y conclusiones, y Proyección de la investigación.

- **Comunicaciones cortas.** Se trata de informes originales que se caracterizan por ser acotados en extensión o envergadura o que, en razón de su novedad, requieren comunicación inmediata como anticipo de otra más exhaustiva. Constan de las mismas secciones que los trabajos de investigación. No podrán superar las 5 páginas de texto (en formato de hoja A4, excluyendo la primera página y la página de resúmenes) ni las 3 figuras. Tendrán como máximo 15 referencias bibliográficas.

- **Artículos de revisión.** Son revisiones narrativas orientadas a la actualización de un tema relevante y que incluyen la discusión crítica del estado del conocimiento. Constan de una breve Introducción (en la que se explica el interés del tema o el motivo de la revisión), Subtítulos (los que resulten apropiados al tema en cuestión) y Discusión y conclusiones. Tendrán como mínimo 40 referencias bibliográficas.

- **Descripciones de casos:** Consisten en la descripción de casos con aspectos inusuales que provean información significativa y original. Este concepto incluye la presentación o progreso poco habitual de una enfermedad, efectos colaterales o adversos no informados durante tratamientos o planes de vacunación, entre otros. Constan de Introducción, Presentación del caso (con los subtítulos que requiera el tipo de caso), y Discusión y conclusiones. Deberá incluir hallazgos relevantes, tanto positivos como negativos, que surjan de los exámenes realizados, la interpretación de los resultados y su discusión con referencias a los artículos citados. Si se trata de un solo caso, la historia clínica será completa, si son varios, sólo se consignarán los datos más relevantes de cada uno. Tendrán como máximo 15 referencias bibliográficas.

- **Informes técnicos:** Son descripciones y análisis de técnicas novedosas en los ámbitos de la investigación, del diagnóstico o del tratamiento quirúrgico. Constan de Introducción, Descripción metodológica, y Discusión y conclusiones. En este y otros tipos de trabajo que así lo requieran, la descripción metodológica puede enriquecerse mediante videos de alta calidad de información. Tendrán como máximo 15 referencias bibliográficas.

- **Resúmenes de presentaciones en reuniones científicas:** El envío estará a cargo de los/las organizadores/as de reuniones científicas ocurridas en el ámbito de la Universidad Nacional de La Plata, previo acuerdo con el Consejo Editorial de la revista. Dichos resúmenes se publicarán en un Suplemento. Para establecer el formato de los resúmenes de presentaciones en reuniones científicas, se invita a quienes organicen tales reuniones a ponerse en contacto para conocer los aspectos formales requeridos, a través del correo electrónico (analecta@fcv.unlp.edu.ar).

2. Otros archivos

2.1 Figuras

Se consideran figuras que ilustran el trabajo tanto a las fotografías como a los dibujos lineales y esquemas. Deberán ser numeradas correlativamente con números arábigos y citadas en el texto en el orden que corresponda. En caso de tratarse de fotografías, estas no podrán incluir rostros de personas que no sean autores/as, o animales con marcas específicas que permitan reconocerlos, excepto que se posea consentimiento por escrito de sus propietarios/as. Es responsabilidad de los/as autores/as obtener permiso de quienes posean la propiedad intelectual para reproducir figuras o tablas que han sido publicadas en otro sitio. Las ilustraciones deben tener un contraste adecuado. Deberán ser enviadas separadas del texto y en **formato TIFF**.

Las figuras correspondientes a imágenes microscópicas capturadas a partir de cámaras de video o fotográficas montadas sobre el microscopio y aquellas escaneadas a partir de fotografías, deberán tener una resolución final mínima de **300 dpi**. Estas imágenes deberán contener una barra de calibración que indique la magnificación final observada. No se aceptarán unidades de magnificación resultantes de la multiplicación entre el objetivo y el ocular (por ejemplo: 400X).

Las figuras correspondientes a dibujos lineales y esquemas deberán tener una resolución final de **600 a 1200 dpi**. El tamaño de letras y números incluidos en las figuras deberá ser el adecuado para que conserve la legibilidad, aún luego de la reducción de tamaño. Las leyendas para las figuras deberán constituir una descripción precisa del contenido de las figuras y mencionar las técnicas cuyos resultados allí se muestran. Todos los textos

que contengan las figuras (incluidas las leyendas) deberán resultar accesibles para la corrección.

2.2 Tablas

Las tablas se diseñarán usando la función correspondiente del procesador de texto o de las planillas de cálculo. Deben ser de **estructura sencilla** (líneas horizontales inicial y final de tabla y línea de encabezados de columna), sin sombreados y sin divisiones entre las filas o las columnas. Todo el texto que contenga las tablas (incluidos los títulos) debe ser accesible para la corrección.

Se enviarán en hoja aparte, en un archivo con el título y las referencias correspondientes, que deberán seguir los mismos criterios tipográficos que para el resto del trabajo presentado.

2.3 Material complementario

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

Envío del trabajo, proceso de revisión y comunicación con los autores

ANALECTA VETERINARIA recibe trabajos para su publicación de manera continua. Es responsabilidad de quien remita el trabajo asegurar que la totalidad de los/las autores/as lo han leído y aprobado y están de acuerdo con el envío a ANALECTA VETERINARIA.

El envío y todas las comunicaciones posteriores se realizará en línea:

(<https://revistas.unlp.edu.ar/analecta/index>)

Se consignarán el idioma del envío y la sección a la que corresponde y se leerán, cumplirán y tildarán los REQUISITOS DE ENVÍO. Entre ellos, se establece la obligatoriedad de acompañar el envío con una breve nota de presentación en la caja “Comentarios para el editor/a” en la que se menciona el interés que reviste su publicación. En la nota de presentación es bienvenida la inclusión de nombres de evaluadores/as potenciales, que en

ningún caso podrán haber sido coautores/as de ningún/a autor/a, al menos en los últimos cinco años, ni miembros actuales de la misma institución. Estos datos son recibidos en calidad de sugerencia y no generan ningún compromiso para el Consejo Editorial

Es un requisito que los/las autores/as provean, en los casilleros correspondientes a los metadatos del envío, todos sus nombres completos y las direcciones de correo electrónico institucional. Quienes ejerzan la profesión de manera independiente o privada consignarán una dirección activa de correo electrónico.

Revisión

El Consejo Editorial evaluará la pertinencia de la recepción del trabajo, según se adecue o no a las áreas del conocimiento que alcanza la revista. En caso de corresponder, el Consejo Editorial verificará que se cumplan las siguientes premisas:

- calidad de contenido para ser remitido a evaluación externa
- estructura gramatical del idioma del idioma de trabajo
- adecuación a las normas editoriales (incluida la bibliografía).

Los trabajos que no cumplan con las normas editoriales serán devueltos para ser reordenados de acuerdo con ellas, con fecha de recepción perentoria. En caso de no reenviarse modificado en el plazo pautado, el sistema emitirá respuesta de “rechazo”, lo que no obsta para la realización de un nuevo envío.

Los artículos serán sometidos a una revisión por pares con modalidad doble ciego (los nombres de todas las personas involucradas como autoras o evaluadoras se conservarán en el anonimato). El Consejo Editorial seleccionará para esa función a, por lo menos, dos especialistas externos/as.

Cuando se encuentren disponibles los resultados de la evaluación, se iniciará un hilo de discusión en el sitio del envío. Se deberán responder los comentarios y las sugerencias de los/as evaluadores/as, punto por punto, en un documento aparte (además de la nueva versión del trabajo), titulado: “Respuestas al Consejo Editorial”, que pueda leerse e interpretarse de manera independiente de la nueva versión del trabajo. Los trabajos que sean reenviados más de una vez, o después de cuatro meses desde la decisión inicial, serán considerados como un nuevo envío. Todos los cambios realizados en el nuevo envío deberán resaltarse en amarillo para una mejor y más rápida identificación.

El Consejo Editorial decidirá e informará si el trabajo ha sido: aceptado sin modificaciones, aceptado con modificaciones menores, aceptado con modificaciones mayores o rechazado.

Una vez realizada la corrección editorial del trabajo aceptado, este pasará a la etapa de Producción (diseño de la maqueta de publicación). Los/las autores/as recibirán una última prueba en formato [.pdf] (prueba de galera) y dispondrán de un breve plazo que les será comunicado, para enviar modificaciones. En caso de no enviarlas en el plazo establecido, la prueba se considerará aprobada para su publicación.

Los artículos se pondrán a disposición del público para que haga de ellos un uso justo y respetuoso de los derechos de autor, cumpliendo las condiciones de la licencia de uso **Creative Commons CC-BY-NC-ND**. Este tipo de licencia permite a otras personas descargar la obra y compartirla, siempre y cuando se de crédito por la autoría, pero no permite cambiarlas de forma alguna ni usarlas comercialmente.