

Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias

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

ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Volumen 33 n° 1 año 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Autoridades

Decano

Méd.Vet. Eduardo Rafael Pons

Vicedecano

Dr. Daniel Osvaldo Arias

Secretario de Asuntos Estudiantiles

Méd.Vet. Fernando Pedro Marino

Secretaria de Ciencia y Técnica

Dr. Adriana Massone

Secretario de Extensión

Méd.Vet. Guillermo Broglio

Secretario de Posgrado

Dr. Eduardo Carlos Mórtola

Prosecretario Académico de Gestión Curricular

Méd.Vet. César Augusto Savignone

Prosecretario Académico de Gestión en Enseñanza

Dr. Alejandro Palacios

Prosecretario de Bienestar Estudiantil

Méd.Vet. Hernán Javier Figueredo

Prosecretaria de Bienestar Estudiantil

Méd.Vet. María Eugenia Mangialavori

ANALECTA VETERINARIA Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Comité Editorial (Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Dr. Florestán Maliandi

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

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



Foto de tapa: Facultad de Veterinaria.

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

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

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&

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

ISSN 0365514-8 Versión Impresa
ISSN 1514-2590 Versión Electrónica
<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html>

ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM
Registro Propiedad Intelectual 77383
Dirección postal: CC 296 (B1900AVW)
La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

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

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

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

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

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

Los números de la revista a partir del Volumen 18 están disponibles en formato de archivo: pdf (Portable Document File-Adobe Acrobat Reader®) y pueden imprimirse en cualquier impresora que permita diferenciar escala de grises o colores. Se recomienda que la misma posea un resolución mínima de 600 x 600 dpi.

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

Diseño

Nestor Oscar Stanchi

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

(*www.latindex.unam.mx*),

Ulrich's International Periodicals Directory

(*www.ulrichsweb.com*)

Zoological Records

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

BIOSIS (*http://www.biosis.org*)

Infocyt *http://www.redhucyt.oas.org/infocyt/*

Directory of Open Access Journals

http://www.doaj.org/

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

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

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

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

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

Evaluadores de trabajos de ANALECTA VETERINARIA

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

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

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

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

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

Impreso en papel libre de ácido

Printed in acid-free paper

Impreso en Argentina

Printed in Argentina



ANALECTA VETERINARIA Vol 33 n° 1, 2013

Artículos de Investigación/Research articles

- ATRÓN DINÁMICO DE CRECIMIENTO DE GAZAPOS DE CHINCHILLA (*Chinchilla lanigera*) DURANTE LA LACTANCIA.** DYNAMIC GROWTH PATTERN OF CHINCHILLA (*Chinchilla lanigera*) KITS DURING LACTATION. Nistal AJ, Zapata M, Bianchi F, Miranda J, Frana E, Di Masso RJ. 5-9
- LA INERVACIÓN DEL MIEMBRO TORÁCICO EN FELINOS.** FORELIMB INNERVATION IN CATS. Silva LB, Sánchez HL. 10-17
- EFFECTO DE LA GNRH ADMINISTRADA EN LA IATF A VAQUILLONAS SIN CELO SOBRE EL PORCENTAJE DE PREÑEZ.** EFFECT OF GNRH INJECTED AT TAI IN HEIFERS DID NOT SHOW ESTRUS ON PREGNANCY RATE. Novoa F, Preisseger G, Zangrilli G, Callejas S. 18-21
- ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA REVERTIR LA MULTIRRESISTENCIA MEDIADA POR BOMBAS DE EFLUJO.** THERAPEUTIC ALTERNATIVES AGAINST MULTIDRUG RESISTANCE BY EFFLUX PUMP. Marchetti ML, Mestorino N. 22-32
- Revisiones/Review**
- POISONOUS PLANTS FOR CATTLE IN COLOMBIA: RESEARCH PERSPECTIVES.** PLANTAS TÓXICAS PARA LOS BOVINOS EN COLOMBIA: PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN. Lozano MC, Diaz GJ. 33-41
- ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN ANIMALES DOMÉSTICOS. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL GATO (*Felis silvestris catus*).** SEASONALITY OF REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS: NEW PERSPECTIVES IN DOMESTIC CATS (*Felis silvestris catus*). R Nuñez Favre, MC Bonaura, MC García Mitaceck, MC Stornelli, MA Stornelli, RL de la Sota. 42-49

PATRÓN DINÁMICO DE CRECIMIENTO DE GAZAPOS DE CHINCHILLA (*Chinchilla lanigera*) DURANTE LA LACTANCIA

Nistal AJ^{1,3}, Zapata M³, Bianchi F³, Miranda J³, Frana E³, Di Masso RJ^{2,4}

¹Cátedra de Fisiología.

²Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

³Módulo de Producción de Chinchillas. Escuela Agrotécnica Gral. San Martín, UNR.

⁴CIC-UNR.

Resumen: Se evaluó la aptitud de la función lineal y de la función exponencial creciente para describir el comportamiento dinámico del peso corporal de gazapos de chinchilla durante la lactancia. Los valores observados de las variancias residuales y de los coeficientes de determinación asignaron una leve ventaja al modelo lineal. La función lineal subestimó el peso al nacimiento mientras que la función exponencial lo sobreestimó sin diferenciarse en la magnitud de las diferencias de uno u otro signo entre los valores estimados y observados. La utilización del modelo lineal para caracterizar el crecimiento de gazapos machos proveniente de camadas con uno, dos o tres crías, entre el nacimiento y el destete a los 43 días de edad, permitió constatar que el aumento del tamaño de la camada de uno a dos gazapos, si bien disminuye ligeramente el peso inicial y la tasa de crecimiento predestete, no presenta un efecto detrimental de trascendencia sobre el crecimiento en dicha etapa. Por el contrario, la presencia de un tercer gazapo reduce de manera notoria tanto el peso inicial de los miembros de la camada como su aumento medio diario de peso hasta el destete. De acuerdo con lo relevado en este estudio resultaría más conveniente plantear como objetivo aumentar el número de pariciones por año, por ejemplo mediante un manejo adecuado del fotoperíodo, que aumentar el tamaño de la camada al parto por encima de dos gazapos.

Palabras clave: crecimiento, lactancia, función lineal, función exponencial, *Chinchilla lanigera*

DYNAMIC GROWTH PATTERN OF CHINCHILLA (*Chinchilla lanigera*) KITS DURING LACTATION

Abstract: The ability of linear and exponential functions to describe the dynamic behavior of body weight of chinchilla kits during lactation was evaluated. Residual variance and coefficient of determination average values derived from each model assigned to linear function a slight advantage. While the linear function underestimated birth weight the exponential model overestimated it showing both models differences of similar magnitude between estimated and observed values. The use of the linear model to characterize the dynamic growth of male kits belonging to litters with one, two or three pups, between birth and weaning at 43 days of age, allowed to confirm that increasing litter size from one to two pups slightly decreases their initial body weight and their growth rate during lactation, without a detrimental effect on overall pre-weaning growth. By contrast, the presence of a third kit in the litter markedly reduces both initial body weight and daily body weight gain from birth to weaning. According to data surveyed in this study increasing the number of parturitions per female per year, for example through an appropriate management of photoperiod, would be more useful than increasing litter size at birth above two kits to increase the overall efficiency of the system.

Key words: growth, lactation, linear equation, exponential function, *Chinchilla lanigera*

Fecha de recepción: 07/12/12

Fecha de aprobación: 07/03/13

Dirección para correspondencia: RJ Di Masso, Cátedra de Genética. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Av. Ovidio Lagos y Ruta 33, 2170 Casilda. Argentina.

E-mail: rjdimasso@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El crecimiento animal es un proceso complejo susceptible de ser caracterizado desde diferentes puntos de vista. Uno de ellos, el denominado enfoque dimensional (1), enfatiza la modificación de alguna dimensión corporal en función del tiempo. Por lo general, la variable respuesta habitualmente utilizada en este tipo de caracterizaciones es el peso corporal debido a varias razones entre las que pueden mencionarse la facilidad con la que puede medirse, su trascendencia directa o indirecta como variable productiva en la mayoría de las especies de interés económico y su buena heredabilidad en el caso de los estudios genéticos del crecimiento. El peso de un animal en un momento dado de su vida representa un fenotipo complejo en tanto la sola expresión de un valor acompañado de una unidad nada dice de los innumerables procesos fisiológicos de diferente índole que subyacen en su determinación. Como evidencia de esta aseveración puede mencionarse los diferentes genes involucrados en la determinación del peso de un animal cuando el mismo se mide en distintos momentos de su ciclo vital lo que ha llevado a proponer que esos pesos deben ser considerados como caracteres diferentes.

Brockmann *et al.* (2), a partir de evidencia derivada del mapeo de QTLs (loci para caracteres cuantitativos) para crecimiento pre y posdestete en el ratón, postulan la existencia de un cambio en la activación de genes a las tres semanas de edad en coincidencia con el destete. Estos autores encontraron QTLs con efectos mayores sobre el peso corporal entre las dos y las tres semanas de vida cuando los animales son alimentados por sus madres y QTLs con efectos en el posdestete cuando los animales acceden a la vida independiente de la lactancia materna. Los modelos matemáticos posibilitan formalizar la relación entre el peso corporal y la edad cronológica y, a la vez, dar cuenta de la naturaleza dinámica del proceso a diferencia de lo que ocurre cuando se opta por la utilización de datos estáticos registrados en momentos particulares del ciclo de vida de la especie estudiada (nacimiento, destete, faena, etc.).

La chinchilla (*Chinchilla lanigera*) es un roedor originario de América utilizado como recurso peletero. Su curva de crecimiento posnatal muestra el comportamiento clásico observado en los mamíferos y caracterizado por una trayectoria sigmoidea con una asíntota inferior, una fase inicial de crecimiento autoacelerado que se mantiene hasta que se alcanza el punto de inflexión, seguido de una fase de crecimiento desacelerado desde el punto de inflexión hasta que se alcanza la asíntota superior (3). El período de la lactancia se encuentra comprendido dentro de la primera fase y el comportamiento dinámico del peso corporal durante el mismo puede ser descrito

mediante un modelo matemático que resuma en unos pocos parámetros con significado biológico sus principales características.

El primer objetivo de este trabajo fue comparar dos modelos matemáticos (el modelo lineal y el modelo exponencial) en términos de la bondad de ajuste de los datos peso-edad durante la etapa de crecimiento posnatal-predestete de gazapos de chinchilla. El segundo objetivo consistió en utilizar el modelo de elección derivado de la primera etapa para caracterizar el patrón de crecimiento de gazapos machos provenientes de camadas con una, dos o tres crías al nacimiento, producidos por madres de primera parición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la consecución del primer objetivo se utilizaron los datos longitudinales peso corporal (g), edad cronológica (días) registrados entre el nacimiento (día 0) y el destete (43 días) correspondientes a 41 gazapos, machos y hembras, provenientes de camadas de una, dos y tres crías al nacimiento, producidas por hembras en su primera o segunda parición. Durante el lapso mencionado (lactancia) los animales se pesaron, en forma individual al nacimiento y, luego, en un día fijo de la semana (edad variable). Todos los pesos se registraron con aproximación al gramo.

La representación gráfica de los datos en un sistema de ejes cartesianos permitió identificar un comportamiento de los mismos compatible, en apariencia, tanto con un modelo lineal como con un modelo exponencial. Consecuentemente, los datos correspondientes a cada individuo se ajustaron con ambos modelos:

(a) función lineal

$$Wt = a + b \cdot t$$

donde:

Wt representa el peso corporal (g) en el tiempo t (días),
a es la ordenada al origen = valor de Wt cuando t toma el valor cero, es decir, el peso corporal al nacimiento,
b es la pendiente de la recta de regresión o aumento teórico de peso corporal por día transcurrido entre el nacimiento y el destete, y
t es la edad en días

(b) función exponencial

$$Wt = S \cdot e^{(k \cdot t)}$$

donde:

Wt representa el peso corporal (g) en el tiempo t (días),
S es el valor de Wt cuando t toma el valor cero, es decir, el peso corporal al nacimiento,
e = base de los logaritmos naturales = 2,71828,
k es la tasa de crecimiento exponencial y
t la edad en días.

La bondad del ajuste se evaluó en términos del valor del coeficiente de determinación (R^2) lineal y no lineal, respectivamente; del valor de la variancia residual (S^2y/x) y de la aleatoriedad de los residuales (test de rachas o ciclos) (4).

Los valores de la variancia residual y del coeficiente de determinación correspondientes a los ajustes de los mismos datos con cada uno de los dos modelos mencionados se consideraron como nuevas variables aleatorias y las diferencias entre los modelos respecto de las mismas se evaluaron con el test no paramétrico de rangos con signo de Wilcoxon para dos muestras dependientes utilizando el animal como criterio de apareamiento. Por último, los dos modelos se compararon en términos de la estimación del peso al nacimiento derivada de cada uno de ellos. A tal fin se calculó la diferencia entre los valores observados (peso corporal registrado al nacimiento) y los valores estimados por cada uno de los modelos: ordenada al origen (a) en el caso de la función lineal y valor de inicio (S) en el caso de la función exponencial. Los valores medianos de los desvíos mencionados se compararon con un valor hipotético nulo utilizando el test de rangos de Wilcoxon para una única muestra (4).

En relación con el segundo objetivo se registró el peso al nacimiento (día 0), el tamaño de la camada de pertenencia y el peso al destete (43 días de edad) de todos los gazapos machos producidos por hembras de primera parición en la primera parte de la temporada de cría, en el Módulo de Producción de Chinchillas de la Escuela Agrotécnica Gral. San Martín de la Universidad Nacional de Rosario.

Durante la lactancia los animales se pesaron, en forma individual en un día fijo de la semana (edad variable). Todos los pesos se registraron con aproximación al gramo. Se definieron tres grupos de animales (G1, G2 y G3) de acuerdo al número de crías (una, dos o tres) que formaban la camada en el momento del parto. En el análisis sólo se incluyeron datos provenientes de aquellas camadas que conservaban en el momento del destete el mismo número de crías que al nacimiento. Los datos peso corporal (g) – edad cronológica (días) de todos los gazapos de cada grupo se ajustaron por regresión lineal y las rectas de regresión correspondientes a los tres grupos se compararon con un análisis de la covariancia.

RESULTADOS

Los valores medianos y los rangos intercuartílicos correspondientes a la variancia residual y al coeficiente de determinación para cada uno de los dos modelos ensayados se muestran en la Tabla 1. En todos los casos los residuales mostraron un comportamiento aleatorio alrededor de la respectiva función teórica ($P > 0,05$) lo que no permitió rechazar la hipótesis de linealidad en el caso de la función lineal ni constatar una desviación significativa del modelo no lineal propuesto en el caso de la función exponencial. Tanto en uno como en otro caso las diferencias

Tabla 1. Variancia residual y coeficiente de determinación correspondientes al ajuste lineal y al ajuste exponencial de los datos peso corporal (g), edad cronológica (días) de gazapos de chinchilla durante la lactancia.

	Modelo lineal	Modelo exponencial
Variancia residual $S^2_{y/x}$	9,050 a (4,899 – 11,110)	9,677 b (6,342 – 14,610)
Coefficiente de determinación R^2	0,9779 a (0,9528 – 0,9897)	0,9761 b (0,9371 – 0,9856)
Los valores corresponden a la mediana (rango intercuartílico) a,b Valores con diferente letra difieren al menos al 5 %		

Tabla 2 – Estimadores de los parámetros de la función lineal y bondad de ajuste del modelo lineal aplicado a la caracterización del crecimiento posnatal-predestete de gazapos de chinchilla pertenecientes a camadas de uno, dos y tres crías al nacimiento.

	G1	G2	G3
¹ Pendiente $b \pm S_b$	3,72 a $\pm 0,242$	3,19 a,b $\pm 0,245$	2,80 b $\pm 0,231$
¹ Ordenada al origen $a \pm S_a$	53,9 a $\pm 6,10$	52,8 a $\pm 6,18$	30,6 b $\pm 6,03$
Coefficiente de determinación (R^2)	0,894	0,768	0,835
¹ Los valores corresponden a la media aritmética \pm error estándar a,b Valores con diferente letra difieren al menos al 5 %			

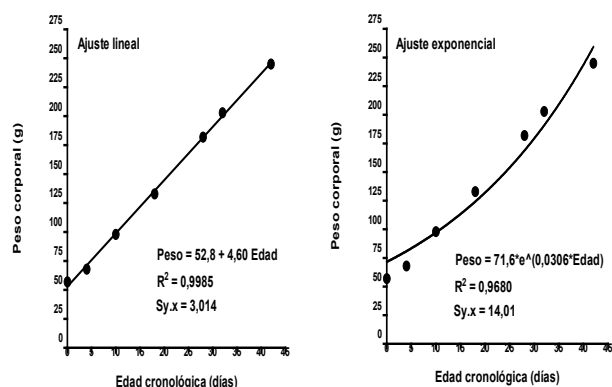


Figura 1. Ajuste lineal y ajuste exponencial de los datos peso corporal-edad correspondientes al gazapo 21.

observadas entre modelos fueron estadísticamente significativas (variancia residual: $P=0,045$; coeficiente de determinación: $P=0,039$). Con respecto a la estimación del peso al nacimiento se observó que la función lineal lo subestima mientras que la función exponencial lo sobreestima. La diferencia mediana y el rango intercuartílico entre los valores observados de esta variable y los valores estimados con cada uno de los dos modelos, ordenada al origen y S, respectivamente, fue de $-6,56$ g ($-12,9/0,65$) para la función lineal y de $7,12$ g ($0,42/15,0$) para la exponencial. Ambos valores medianos difieren en forma significativa de cero ($P < 0,0001$).

La Tabla 2 muestra los valores de la pendiente ($b \pm Sb$), la ordenada al origen ($a \pm Sa$) y el coeficiente de determinación lineal (R^2) de cada uno de los tres grupos de gazapos discriminados por el tamaño de la camada de pertenencia. Todas las pendientes resultaron significativamente diferentes de cero ($P < 0,001$). No se observaron diferencias significativas entre las pendientes de los grupos de uno (G1) o de dos (G2) gazapos ($F=1,977$; $P=0,164$) pero sí entre las alturas de las respectivas rectas de regresión ($F=4,952$; $P=0,029$). De la misma manera los grupos de dos (G2) y de tres (G3) gazapos presentaron pendientes similares ($F=1,121$; $P=0,293$) y diferentes alturas ($F=32,4$; $P < 0,0001$). Por último, G1 presentó mayor pendiente que G3 ($F=7,453$; $P=0,0084$) lo que impidió comparar las alturas de las rectas de regresión. En todos los casos los residuales mostraron un comportamiento aleatorio alrededor de la respectiva función teórica ($P > 0,05$) lo que permitió conservar la hipótesis de linealidad.

La Figura 1 ejemplifica un caso paradigmático de comparación de las dos modalidades de ajuste aplicadas a los datos provenientes de un mismo gazapo. La Figura 2 muestra las rectas teóricas derivadas del ajuste de los datos peso corporal-edad de los gazapos de los tres grupos analizados.

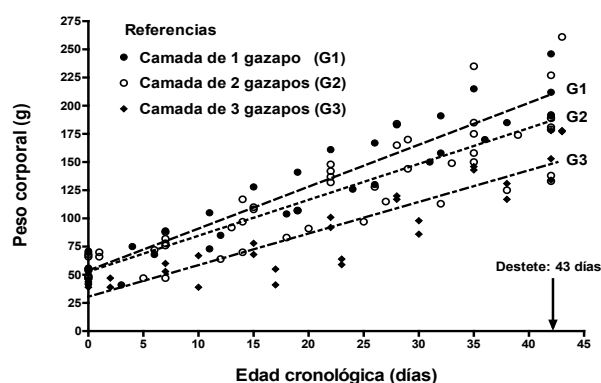


Figura 2. Crecimiento de gazapos machos de Chinchilla lanigera provenientes de camadas de una, dos y tres crías al nacimiento.

DISCUSIÓN

Según Sellier (5) el crecimiento animal, definido como un aumento en el tamaño o en el peso corporal, es un carácter cuantitativo complejo que se encuentra regulado por un gran número de rutas fisiológicas, parcialmente diferentes de acuerdo con la etapa de la vida del individuo. Esta aseveración, al igual que la evidencia derivada del trabajo de Brockmann *et al.* (2) antes citado justifica, al menos en parte, la decisión de dividir un proceso dinámico continuo como el crecimiento y analizar sólo una de sus partes: la correspondiente a la etapa posnatal-predestete.

Dentro de la clase de los mamíferos el orden de los roedores es el que presenta el mayor número de especies. Si bien las especies del suborden de los histricomorfos, como es el caso de la chinchilla, a diferencia, por ejemplo, de los caviomorfos -ratas, ratones, etc.- presentan una estrategia reproductiva *k*, caracterizada por una gestación larga, camadas poco numerosas y crías que nacen con pelo y ojos abiertos que se independizan relativamente rápido de la madre, la lactancia es un período obligado en el ciclo de cría con fines productivos. De acuerdo con Neira *et al.* (6) la duración promedio habitual de la lactancia de chinchillas en cautiverio es de 54 días (7-8 semanas) requiriéndose un período mínimo de 25 días para asegurar la supervivencia posterior de las crías. Aun reconociendo la continuidad ya mencionada del proceso de crecimiento y la artificialidad presente en la decisión de dividirlo en lapsos acotados, la trayectoria peso-edad puede ser fraccionada en diferentes etapas con fines prácticos.

De acuerdo con ello se dispone de modelos matemáticos de uso muy difundido para la caracterización del proceso sigmoideo total como es el caso de las diferentes alternativas del modelo de Richards -funciones logística, Gompertz, von Bertalanffy- como también de modelos aplicables a la caracterización de la fase de autoaceleración -modelo exponencial creciente- y de desacelera-

ción -modelo exponencial asintótico, función de Brody, etc. (7). Con respecto al primer objetivo de este trabajo, la decisión de incluir todos los datos disponibles sin segregar fuentes reconocibles de variación vinculadas con el peso corporal -sexo, tamaño de la camada de origen, orden de parición de la hembra- aseguró disponer de una colección de datos con la mayor variabilidad intragrupo posible y que no restringiese los alcances de la comparación entre funciones a una categoría particular de individuos aprovechando las ventajas que en este sentido ofrece el análisis de datos apareados. La información recabada permite, con un sentido pragmático, concluir que si bien el lapso considerado forma parte de un sector de la curva de crecimiento (crecimiento pre-inflexión) cuyo comportamiento global es de naturaleza exponencial creciente, el mismo puede ser descrito por cualquiera de los dos modelos ensayados. La función lineal presenta como ventaja su simplicidad y una mejor bondad de ajuste -en términos matemáticos- que la función exponencial. El mejor ajuste observado con el modelo lineal puede atribuirse a lo acotado del periodo de crecimiento pre-inflexión analizado (0-43 días de edad) si se tiene en cuenta que según Álvarez *et al.* (3) la curva de crecimiento promedio de chinchillas en cautiverio presenta el punto de inflexión a los 300 días de edad en los machos y a los 500 días en el caso de las hembras. La elección de la función exponencial, por su parte, tendría como fundamento la naturaleza biológica del proceso que, si bien no necesariamente en el periodo de tiempo restringido a la lactancia sino en un lapso mayor que se extiende hasta la inflexión, es de naturaleza exponencial. En lo que respecta a la estimación del peso corporal de los gazapos al nacimiento ambos modelos presentaron desvíos significativos, de igual magnitud pero de diferente signo.

Para dar respuesta al segundo de los objetivos planteados se utilizó el modelo lineal. En este caso, la pendiente de la recta tiene un claro significado biológico dado que representa la ganancia diaria de peso durante el lapso en estudio, un indicador de clara trascendencia productiva. La bibliografía (8) indica para ejemplares en cautiverio valores promedio de tasa de crecimiento de 3,6 g/día durante el primer mes de vida, similares a los observados en este trabajo en los grupos con una y con dos crías lo que permite concluir que el aumento del tamaño de la camada de uno a dos gazapos, si bien disminuye ligeramente el peso inicial y la tasa de crecimiento durante la lactancia, no presenta un efecto detrimental de trascendencia sobre el crecimiento pre-destete. Por el contrario, la presencia de un tercer gazapo redujo de manera notoria tanto el peso inicial de los integrantes de la camada como su aumento medio diario de peso hasta el destete. Esta evi-

dencia indica que si bien los gazapos comienzan a consumir alimentos sólidos a partir de la primera semana de vida (8) el aporte de leche materna es fundamental para asegurar un adecuado crecimiento durante la lactancia. En la chinchilla el tamaño de la camada puede llegar a seis gazapos si bien usualmente oscila entre 2 y 3 (9). Neira *et al.* (6) informan un valor de 1,75 gazapos por parto como promedio de 273 camadas analizadas. Uno de los componentes de la eficiencia de un sistema productivo basado en la cría de chinchillas es el número de individuos producidos por unidad de tiempo. La modificación favorable de este indicador para una cantidad dada de hembras en reproducción puede lograrse aumentando el tamaño de la camada, aumentando el número de pariciones por año de las hembras o combinando ambas estrategias. De acuerdo con lo relevado en este estudio resultaría más conveniente plantear como objetivo aumentar el número de pariciones por año, por ejemplo mediante un manejo adecuado del fotoperiodo (10) que aumentar el tamaño de la camada al parto por encima de dos gazapos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reeds PJ, Fiorotto ML. Growth in perspective. Proc. Nutr. Soc. 49: 411-420, 1990.
2. Brockmann GA, Karatayli E, Haley CS, Renne U, Rottmann OJ, Karle S. QTLs for pre-and postweaning body weight and body composition in selected mice. Mamm Genome 15:593-609, 2004.
3. Álvarez M, Quintana H, Mallo G, Quinn ME. Crecimiento corporal de chinchilla (*Chinchilla lanigera*) en un criadero comercial de la provincia de Buenos Aires (Argentina) Arch. Latinoam. Prod. Anim. 5 (Supl. 1): 456-458, 1997.
4. Sheskin DJ. Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures. Chapman & Hall. USA. 2000.
5. Sellier P. Genetically caused retarded growth in animals. Domestic Animal Endoc 19: 105-119, 2000.
6. Neira R, García X, Scheu R. Análisis descriptivo del comportamiento reproductivo y de crecimiento de chinchillas (*Chinchilla lanigera* Gray) en confinamiento. Avances Producción Animal (Chile) 14:109-119, 1989.
7. Fitzhugh HA. Analysis of growth curves and strategies for altering their shape. J. Anim. Sci. 42: 1036-1051, 1976.
8. Spotorno AE, Zuleta CA, Valladares JP, Deane AL, Jiménez JE. *Chinchilla laniger*. Mammalian Species 758: 1-9, 2004.
9. Weir BJ. The care and management of laboratory hystricomorph rodents. Lab. Anim. 1, 95-104, 1967.
10. Nistal AJ, Di Masso RJ. Estacionalidad reproductiva de la chinchilla (*Chinchilla lanigera*) en condiciones de cautiverio. XIII Jornadas sobre Producción Animal. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA) - Zaragoza (España), Vol I: 669-671, 2009.

LA INERVACIÓN DEL MIEMBRO TORÁCICO EN FELINOS

Silva LB, Sánchez HL

Instituto de Anatomía. Facultad de Ciencias. Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Resumen: *La inervación de las regiones del miembro torácico de los gatos no se ha descrito bien a pesar de su importancia para la cirugía reparadora y por ser probablemente el desorden de nervios periféricos más importante en gatos. En los felinos, los miembros torácicos facilitan el salto y representan uno de los principales medios para la captura de las presas. Los principales músculos y nervios que participan en estas actividades se encuentran en la región del antebrazo y la mano. El objetivo del presente estudio fue proporcionar una descripción detallada de la inervación de las regiones del miembro torácico del jaguar (*Panthera onca*) y el puma (*Puma concolor*), en comparación con la del gato doméstico (*Felis catus*), contribuyendo así con el conocimiento anatómico para su aplicación en la cirugía y la patología de los miembros torácicos en grandes y pequeños felinos. Se describen el recorrido de los nervios y sus patrones de distribución en el miembro torácico de tres especies de felinos. Los resultados hallados indican que las variaciones observadas son mínimas y los conceptos anatómicos obtenidos del estudio del gato doméstico, pueden aplicarse ampliamente a los felinos silvestres.*

Palabras claves: felinos, miembro torácico, inervación, anatomía.

FORELIMB INNERVATION IN CATS

Abstract: *The innervation of the regions of the forelimb of cats has not been described well despite its importance for reconstructive surgery and being probably the peripheral nerve disorder more important in cats. In cats, the thoracic facilitate the leap and represent one of the main means for capturing prey. The main muscles and nerves involved in these activities are in the forearm and hand. The aim of this study was to provide a detailed description of the innervation of the forelimb regions of the jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*), compared with the domestic cat (*Felis catus*), thus contributing to the anatomical knowledge for use in surgery and pathology of the thoracic limbs in big and small cats. It describes the path of the nerves and their distribution patterns in the forelimb of three cat species. The results obtained indicate that the observed variations are minimal and anatomic concepts obtained from the study of domestic cat, can be widely applied to wild cats.*

Key words: feline, forelimb, innervation, anatomy

Fecha de recepción: 25/04/13

Fecha de aprobación: 06/09/13

Dirección para correspondencia: Sánchez L, Instituto de Anatomía. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

INTRODUCCIÓN

En los mamíferos terrestres por su posición cuadrúpeda, la localización del centro de gravedad y la distribución del peso corporal como consecuencia de los principios de la construcción estática, son diferentes en los dos pares de miembros. Al estar de pie en estación y cuando están en movimiento, los miembros torácicos soportan más peso corporal que los miembros pelvianos. Varios trabajos sobre los miembros de los carnívoros sostienen que son capaces de utilizar sus miembros torácicos con gran habilidad y destreza. Dentro de los movimientos que pueden realizar son: la excavación, la escalada, agarrar presas u otros objetos (10). Por otro lado, los gatos a diferencia de otros carnívoros utilizan para cazar, jugar o golpear a sus adversarios los miembros torácicos ya que poseen movimientos más amplios y garras retráctiles. Los componentes anatómicos (articulaciones, músculos y nervios) encargados de realizar estos movimientos se encuentran principalmente en la región del antebrazo y la mano (2, 15).

La inervación de las regiones del miembro torácico tiene su importancia para la cirugía reparadora y por ser probablemente, el desorden de nervios periféricos más importante en gatos (1, 4, 18). Los nervios que se distribuyen en estas regiones derivan del plexo braquial, formado por las ramas ventrales del sexto, séptimo y octavo nervios cervicales y el primer nervio torácico (2, 12, 21).

Las lesiones del plexo braquial son muy comunes en los gatos, sobre todo en felinos que se hayan bajo condiciones de cautiverio, como el jaguar y el puma (17, 14, 28). En los gatos, el origen del plexo braquial puede presentar algunas variaciones anatómicas. Sin embargo, es constante la composición de los nervios espinales específicos que continúan su trayecto en el miembro torácico, ellos son: supraescapular, subescapular, axilar, musculocutáneo, radial, cubital y mediano (5, 22). El conocimiento de la distribución anatómica tanto de las áreas motoras como sensitivas de estos nervios es esencial para entender los signos clínicos de enfermedades nerviosas en las que participan.

La exploración de la integridad de los nervios del miembro torácico es muy importante en el diagnóstico de las lesiones. Los patrones de pérdida sensorial cutánea y trastornos motores deben ser observados y registrados con exactitud, para iniciar un tratamiento inmediato ya sea quirúrgico o conservador (19).

Aunque hay una gran diferencia en el tamaño corporal y patrones de comportamiento entre los felinos salvajes y domésticos, comparten muchos aspectos biológicos y morfológicos (24). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue proporcionar una descripción detallada de la

inervación de las regiones del miembro torácico de felinos autóctonos como el jaguar y el puma, en comparación con la descrita para el gato doméstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron los miembros torácicos de tres pumas, dos jaguares y seis gatos domésticos adultos. Los felinos silvestres fueron donados por el Zoológico de la Municipalidad de La Plata. Los gatos domésticos se obtuvieron del Servicio de Necropsia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Los pumas y los jaguares fueron fijados con una solución de formol al 10 % mientras que, los gatos domésticos fueron disecados en fresco y luego conservados en formol al 10 %. En todos los ejemplares se disecaron los nervios de los miembros torácicos para comparar el recorrido y distribución de los mismos en cada una de las especies. Los nervios disecados por planos fueron fotografiados con una cámara digital Sony Cyber-Shot DSC-P10, las cuales fueron procesadas en una PC Pentium IV. Para el tratamiento y procesamiento de las imágenes se utilizó el programa Adobe Photoshop 9.0.

NERVIOS DEL PLEXO BRAQUIAL

El plexo braquial es una red de intercomunicaciones de fibras (20) que provienen de las ramas ventrales de los últimos nervios espinales cervicales y de los primeros nervios espinales torácicos. Está situado en posición craneal con respecto a la primera costilla, profundamente a la región de la espalda, entre el músculo largo de cuello y el músculo escaleno. Sus raíces pasan entre las porciones dorsal y ventral del músculo escaleno para llegar al espacio axilar (10) (Fig. 1A y B).

En felinos la constitución del plexo braquial es muy homogénea y se compone principalmente de las ramas ventrales derivadas de C6, C7, C8 y T1 nervios espinales (1, 7). Los nervios del plexo braquial se distribuyen en el miembro torácico para proporcionar la inervación sensitiva y motora.

NERVIO MUSCULOCUTÁNEO

Las fibras que forman el nervio musculocutáneo derivan de las ramas ventrales del sexto y séptimo nervios cervicales. Se dirige por la región medial del brazo, entre el bíceps braquial y la arteria braquial, e inerva al músculo coracobraquial y bíceps braquial a través de su ramo muscular proximal (Tabla 1), ramo que acompaña a la arteria humeral circunfleja craneal. Luego desciende a lo largo de la parte caudal del músculo bíceps braquial y en el tercio distal del brazo emite el ramo muscular distal para inervar al músculo bíceps braquial y braquial (Tabla 1) (12, 26).

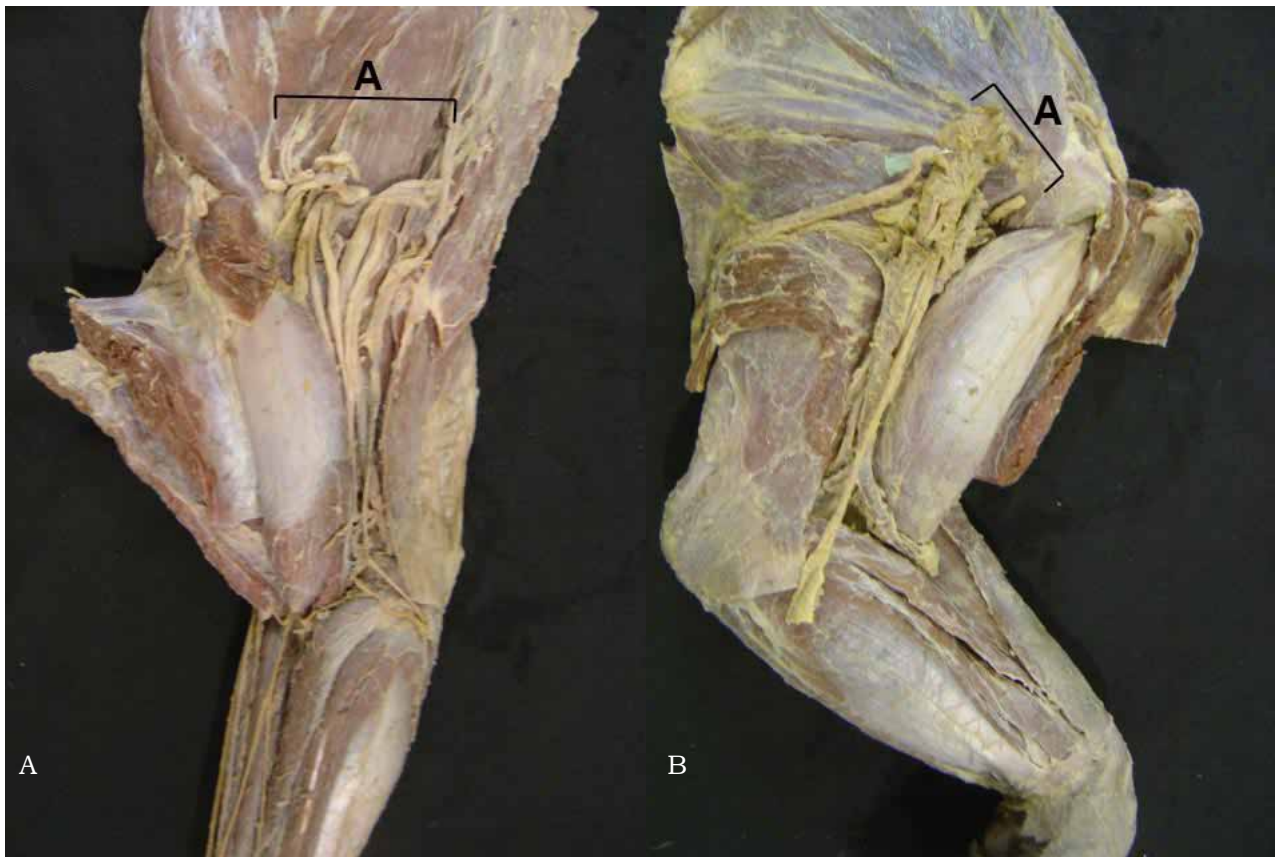


Figura 1. A) Ubicación del plexo braquial en el Puma (Vista medial del espacio axilar), B) Ubicación del plexo braquial en el Jaguar (Vista medial del espacio axilar).

En los carnívoros, al llegar a la región del codo, el nervio musculocutáneo emite un ramo comunicante con el nervio mediano, esta unión no es considerada homóloga al ansa axilar descripta para los ungulados (21, 26).

En la región del antebrazo se separa del nervio mediano y se continúa como nervio antebraquial cutáneo medial, para dividirse en los felinos en un ramo medial y uno intermedio. El ramo medial desciende para distribuirse en la fascia y piel de la región medial del antebrazo y carpo (Tabla 1), autores como Schaller (26) describen a este ramo extendiéndose hasta la región del metacarpo. En el jaguar se observó que el ramo medial del nervio musculocutáneo continúa distalmente para inervar el primer dedo y unirse al ramo medial del nervio radial (Fig. 3C). El nervio cutáneo intermedio es un ramo delgado que se distribuye solamente en el territorio cutáneo medial del antebrazo (Tabla 1).

NERVIO AXILAR

El nervio axilar se origina de las raíces ventrales de los nervios cervicales sexto y séptimo. Se dirige lateralmente entre los músculos subescapular y redondo mayor, junto con la arteria humeral circunfleja caudal, a lo largo de la superficie de flexión de la articulación del hombro (10, 16). Luego emerge entre las cabezas larga y

lateral del tríceps braquial, donde se divide en varios ramos motores para los músculos redondo mayor, redondo menor y deltoides. En los felinos, según Reighard *et al* (22) también inerva al músculo cleidobraquial, la fascia y la piel de la región del hombro. De acuerdo a lo descrito por Crouch (13) y Ghoshal (12) su rama sensitiva (nervio antebraquial cutáneo craneal) se extiende hasta la región dorsal del carpo donde se une al ramo medial del nervio radial. En el puma y jaguar no se encontraron diferencias con el gato doméstico (Tabla 1).

NERVIO RADIAL

El nervio radial es el nervio más desarrollado del plexo braquial y en consecuencia posee el territorio de ramificación de mayor tamaño (16). Las fibras que forman este nervio derivan de las ramas ventrales de los nervios séptimo y octavo nervio cervical y primer nervio torácico. Según Hudson *et al* (15), recibe con frecuencia la contribución del sexto nervio cervical. Al principio, corre a lo largo de la superficie medial del músculo redondo mayor, penetra en la cabeza medial del músculo tríceps braquial, junto con la arteria radial colateral, y se hace superficial en lateral del brazo. Durante su curso en la región del brazo, emite varias ramas motoras para todas las cabezas del músculo tríceps braquial (incluida

Tabla 1. Distribución de la inervación motora y sensitiva del miembro torácico en el gato doméstico.

Nervio	Inervación motora	Inervación sensitiva
Musculocutáneo	Coracobraquial, biceps braquial y braquial	La piel medial del antebrazo, carpo y metacarpo.
Axilar	Teres mayor, subescapular, deltoides, teres minor	Piel de la región craneal del antebrazo.
Radial	Triceps braquial, ancóneo, tensor de la fascia antebraquial, extensor radial del carpo, extensor digital común, extensor digital lateral, extensor cubital del carpo, braquioradial, supinador, extensor digital del primer dedo, extensor digital del segundo dedo.	Piel de la región lateral del antebrazo y región dorsal de la mano.
Mediano	Flexor radial del carpo, flexor digital superficial, flexor digital profundo, pronador redondo, pronador cuadrado, interflexores.	Piel de región palmar de la mano
Cubital (ulnar)	Flexor cubital del carpo, abductor del quinto dedo, flexor digital del quinto dedo, adductor digital del quinto dedo, abductor digital breve del primer dedo, flexor digital breve del primer dedo, adductor digital del segundo dedo, interóseos y lumbricales.	Piel de la región caudal del antebrazo y las regiones dorsal y palmar de la mano

(Ghoshal NG, 1972; Evans HE, 1993; Schaller 1996; Sánchez et al. 2013)

la cabeza accesoria), tensor de la fascia antebraquial, supinador y ancóneo (Tabla 1). En la región del codo se divide en una rama superficial y en una rama profunda (Fig. 2A y B). La rama profunda del nervio radial desciende por el antebrazo entre la parte distal del músculo braquial y las cabezas de origen del extensor radial del carpo y el extensor digital común. Luego discurre entre los músculos supinador y extensor digital lateral a los cuales inerva. Continúa descendiendo y profundiza entre el músculo abductor largo del primer dedo y el extensor cubital del carpo (Fig. 2C). La rama superficial del nervio radial discurre entre la cabeza lateral del tríceps braquial y braquial, donde emite el nervio antebraquial cutáneo lateral. En los felinos a la altura de la región del codo este último nervio suele dividirse en dos ramos y descender por la región del antebrazo donde da ramas sensitivas a la fascia y la piel (12,13). La rama superficial del nervio radial se continúa a lo largo del músculo braquiorradial y se divide en ramos medial y lateral. Ambos acompañan a cada lado a la vena cefálica, y llegan hasta la región dorsal del carpo, donde se dividen en nervios digitales dorsales comunes. Según Reighard et al (22), puede haber un ramo comunicante entre los ramos medial y lateral a nivel del carpo. El ramo medial es delgado, emite el nervio digital dorsal común para el primer dedo y el nervio dorsal abaxial (21,26). El ramo lateral es más grueso y se divide en los nervios digitales dorsales comunes para el segundo y tercer dedo

(Fig. 3A y B). En nuestras disecciones observamos que en el jaguar, el ramo medial da lugar al nervio digital dorsal común para el segundo dedo y recibe un ramo comunicante del nervio musculocutáneo para inervar juntos el primer dedo. Mientras que, el ramo lateral sólo proporciona el nervio digital dorsal común para el tercer dedo (Fig. 3C). La distribución de la rama superficial (medial y lateral) del nervio radial en el puma es similar a la del gato doméstico (Fig. 3B). Con respecto a la distribución de la rama profunda del nervio radial no se encontraron diferencias entre las tres especies de felinos (Fig. 3^a, B y C).

NERVIO MEDIANO

El nervio mediano tiene su origen en las ramas ventrales del séptimo y octavo nervio cervical y primer nervio torácico. Estas fibras surgen como dos raíces distintas, dispuestas a ambos lados de la arteria axilar. La raíz lateral se forma principalmente por la rama ventral del séptimo nervio cervical, mientras que la raíz medial está formada por las ramas del octavo nervio cervical y primer nervio torácico. Estas dos raíces se unen, por lo general dentro de la mitad proximal del brazo, lateral a la arteria braquial.

Según describen Ghoshal (12) y Hudson (15), en el gato doméstico el nervio mediano pasa a través del agujero supracondilar del húmero, acompañado sólo por la arteria braquial. La vena satélite sigue la misma dirección pero fuera del agujero. En nuestras disecciones observamos que

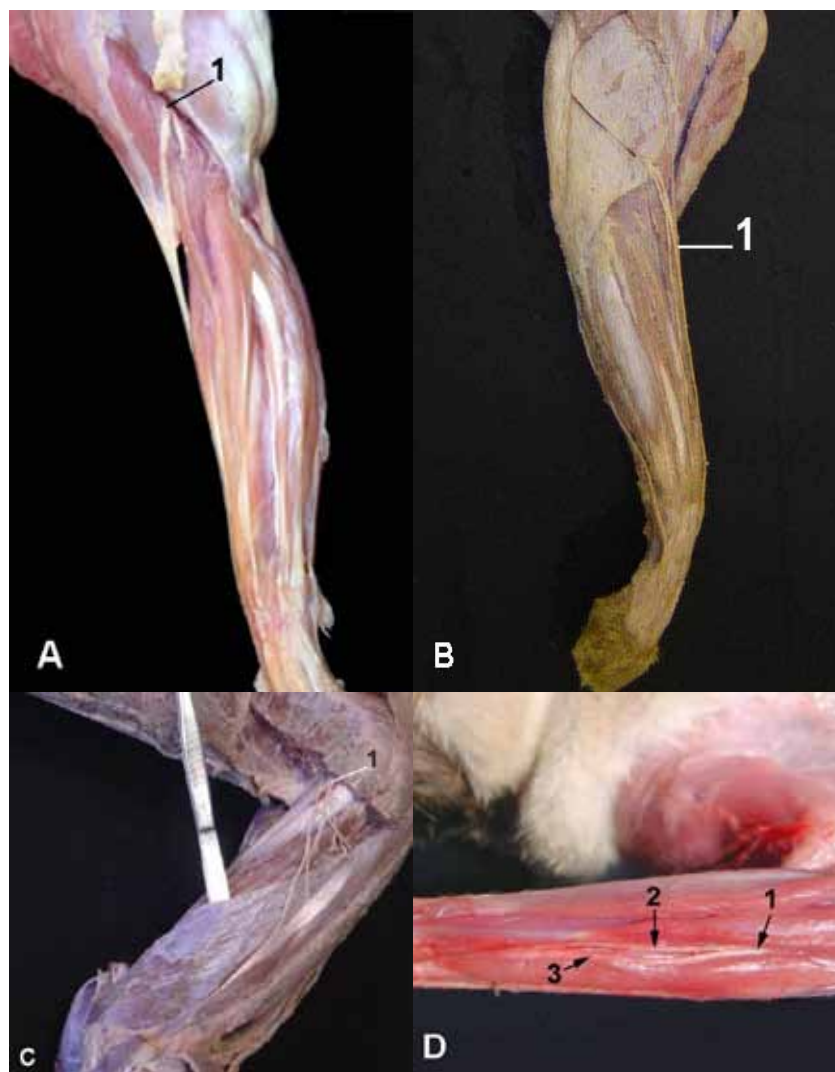


Figura 2. A-1-División del Nervio Radial en el Gato Doméstico en Rama Superficial y Rama Profundo (vista lateral del codo y antebrazo). B- 1-División del Nervio Radial en el Puma en Rama Superficial y Rama Profunda (vista lateral del codo y antebrazo). C-1-Rama profunda del nervio radial descendiendo entre el músculo abductor largo del primer dedo (a) y el extensor cubital del carpo (b) D- 1-División del nervio cubital a nivel de la región del antebrazo en el gato doméstico 2- Rama Dorsal 3- Rama Palmar (vista caudal).

en el puma y jaguar, el nervio mediano pasa por el agujero supracondilar del húmero, junto con la arteria y la vena braquial. Al llegar a la región del codo, se une a través de un ramo comunicante con el nervio musculocutáneo, esta unión no es considerada homóloga al ansa axilar descrita para los ungulados (21,26).

En el tercio proximal del antebrazo emite el nervio interóseo que inerva el periostio del radio y el cúbito. De acuerdo con Ghoshal (12), en nuestras disecciones observamos que en los felinos este nervio puede surgir junto con el ramo muscular destinado a los músculos pronador cuadrado y flexor digital superficial. Luego continúa su recorrido donde emite el nervio profundo del antebrazo que se distribuye en los músculos de la región caudal (Tabla 1).

El nervio mediano continúa a través del canal de carpo, por debajo del retináculo flexor, y en la cara palmar del carpo se divide en un ramo medial y otro lateral. El ramo medial es relativamente delgado y da lugar al nervio digital palmar propio para el primer dedo (abaxial) y el primer nervio digital palmar común. Este último desciende por el espacio intermetacarpiano correspondiente, para dividirse en los nervios digitales palmares propios del primer (axial) y segundo dedo. El ramo lateral es más grande, se divide en nervios digitales palmares comunes para el segundo y el tercer dedo (Fig. 3A). En el gato doméstico, distintos autores Ghoshal (12) y Nickel (20) describen un ramo comunicante con el nervio cubital destinado al cuarto dedo. Sin embargo, en nuestras disecciones observamos

que en el puma y jaguar el nervio mediano no emite un ramo comunicante con el nervio cubital, por lo que en estas especies no se asocia con la inervación del cuarto dedo (Fig. 3C y D).

Por último, cada nervio digital palmar común, después de descender por el espacio intermetacarpiano correspondiente, y cerca de la articulación metacarpofalángica se divide en dos nervios digitales palmares propios (axial y abaxial) para el segundo y tercer dedo (Fig. 3A).

NERVIO CUBITAL (ULNAR)

El nervio cubital tiene su origen en las ramas ventrales del octavo nervio cervical y el primer nervio torácico. Según Ghoshal (12) en el gato el nervio antebraquial cutáneo caudal, al que Reimers (23) designa como nervio antebraquial cutáneo medio como en el hombre, posee fibras que derivan por completo de la rama ventral del primer nervio torácico y lleva un curso independiente del nervio cubital. Cerca de la mitad del brazo, se separa del nervio mediano después de emerger entre los músculos pectoral descendente y tensor de la fascia antebraquial, para ramificarse en la fascia y piel del extremo distal del brazo, la cara caudolateral del antebrazo hasta el carpo.

Por otro lado, el nervio cubital discurre medial a la arteria braquial y caudal al nervio mediano. Cerca de la mitad del brazo, este nervio abandona sus relaciones y se dirige hacia la superficie extensora de la articulación del codo. Durante su curso pasa sobre el epicóndilo medial del húmero, bajo la cabeza medial del tríceps braquial y después de cursar entre las dos cabezas del flexor cubital del carpo penetra en la región del antebrazo. Proporciona ramas a la cabeza accesoria del tríceps braquial, flexor cubital del carpo y las cabezas humeral y cubital del flexor digital profundo (Tabla 1), incluyendo la parte caudal de la cápsula de la articulación del codo. En el tercio proximal del antebrazo, el nervio cubital, se divide en un ramo dorsal y uno

palmar (Fig. 2D). El ramo dorsal se dirige sobre la superficie dorsal del carpo donde emite el nervio digital dorsal común (abaxial) para el quinto dedo y el nervio digital dorsal común para el cuarto dedo (6). Este último desciende por el espacio intermetacarpiano correspondiente y cerca de la articulación metacarpofalángica se divide en nervios digitales dorsales propios para el cuarto y quinto dedo (13) (Fig. 3A).

El ramo palmar continúa distalmente acompañando al tendón del músculo flexor digital profundo a través del canal carpo, por debajo del retináculo flexor, y sobre la superficie palmar del carpo se divide en ramos superficial y profundo.

El ramo palmar superficial como lo describen Reighard *et al* (22), da un ramo a la almohadilla carpiana y en la superficie palmar del carpo se divide en nervio digital palmar común (abaxial) para el quinto dedo y nervio digital palmar común para el cuarto dedo. Este último desciende por el respectivo espacio intermetacarpiano donde recibe un ramo comunicante del nervio mediano y cerca de la articulación metacarpofalángica se divide en nervios digitales palmares propios para el cuarto y quinto dedo. En los felinos salvajes observamos que el ramo superficial inerva ambas caras (axial y abaxial) del quinto dedo, así como el cuarto dedo (Fig. 3C y D).

El ramo palmar profundo se dirige hacia la cara medial del carpo y antes de llegar a la superficie palmar de la almohadilla se divide en los nervios metacarpianos palmares. Según lo describe Ghoshal (12) estos nervios no contribuyen en la inervación de la superficie palmar de la almohadilla, como en el perro, pero inervan los músculos profundos de la mano (Tabla 1).

DISCUSIÓN

El puma (*Puma concolor*) y el jaguar (*Panthera onca*) son felinos autóctonos de los que se conoce su ecología, reproducción y algunos aspectos de su nutrición. Sin embargo, los aspectos

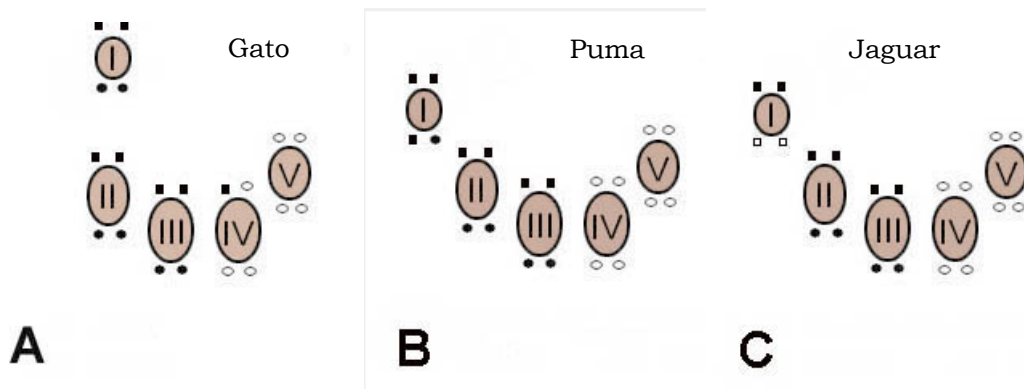


Figura 3. Representación esquemática de la región de la mano derecha, vista palmar, que muestra la distribución de los nervios para cada dedo. A- Gato doméstico B- Puma C. Jaguar. Nervio radial (●) Nervio cubital (○) Nervio mediano (■) Nervio musculocutáneo (□)

relacionados con su anatomía son muy generales. Es probable que por ser animales protegidos, que sólo pueden ser obtenidos y preservados para estudios bajo condiciones especiales, se prefiera homologar su anatomía con la del gato doméstico (2). Las mayores dificultades se presentan en la obtención de cadáveres para su estudio y toma de muestras, por esta razón el número de ejemplares estudiados fue escaso y los resultados obtenidos pueden considerarse como un informe preliminar de la neurología del miembro torácico en estas especies.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de revisar y actualizar algunos conceptos anatómicos básicos sobre la distribución de la inervación sensitiva y motora del miembro torácico del gato doméstico. Por otro lado, se realizó el primer reporte morfológico sobre la neuroanatomía de las regiones del miembro torácico del puma y jaguar, basada en la disección de los músculos y la descripción del recorrido de los nervios (25).

En general, las regiones estudiadas mostraron una homología considerable entre los felinos domésticos y salvajes. Las áreas de inervación cutánea de los nervios axilar, radial, musculocutáneo y cubital se superponen en el antebrazo como lo describen Ghoshal (12) y Lorenzo Fernández (18) en el gato doméstico.

Las principales diferencias observadas entre las tres especies de felinos estudiados se encontraron en la distribución de la rama superficial del nervio radial a nivel de la mano y su distribución para cada uno de los dedos. En el puma, a diferencia del jaguar, la distribución de la rama medial del nervio radial es similar a la de los gatos domésticos (9, 21).

El nervio antebraquial cutáneo medial del nervio musculocutáneo en el jaguar, mostró algunas diferencias en su distribución en comparación con las otras especies de felinos. Autores como Ghoshal (12) y Reighard (22) describen que este nervio termina en el carpo en los gatos domésticos. Mientras que, Schaller (26) describe que se prolonga hasta la región metacarpiana. En nuestras disecciones observamos que en los gatos domésticos y en el puma el nervio antebraquial cutáneo medial termina en la región distal del carpo y en el jaguar se extiende hasta el primer dedo.

En los felinos salvajes se observó que el nervio mediano pasa por el agujero supracondilar del húmero acompañado de la arteria y la vena braquial, mientras que en los gatos domésticos (6, 7, 27) describen que la vena braquial se separa de la arteria braquial y del nervio mediano antes de atravesar dicho agujero.

Los resultados observados indican que las variaciones en el curso de los nervios del miembro torácico en el puma y el jaguar son mínimos en comparación con los gatos domésticos (1, 3, 12, 16, 25). Por esta razón, la mayoría de las técnicas

quirúrgicas y la exploración clínica para abordar los nervios del plexo braquial usadas en los gatos domésticos (28), pueden ser aplicadas en estos felinos salvajes.

El conocimiento de la anatomía, junto con futuros estudios histológicos y bioquímicos sobre el puma y el jaguar pueden aportar datos a los estudios etológicos y contribuir a la preservación de estas especies.

BIBLIOGRAFIA

1. Aubert L, Carozzo C, Devillaire AC, Crevier-Denoix N, Moissonnier P. Macro-and microanatomical characterization of the cat brachial plexus. *Cells Tissues Organs*. 2004; 176 (4): 205-210.
2. Concha I, Adaro L, Borroni C, Altamirano C. Consideraciones Anatómicas sobre la Musculatura Intrínseca del Miembro Torácico del Puma (*Puma concolor*). *Int. J. Morphol.* 2004; 22 (2): 121-125.
3. Corrêa Guimarães G, Fernández Machado MR, Quagliatto Santos AL, Miglino MA, Cattelan JW. Origem, ramificação e distribuição do nervo radial no braço do gato doméstico (*Felis catus domesticus*, Linnaeus 1758). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2007; 44 (4): 261-267.
4. Dewey CW. Disorders of the peripheral nervous system. In: Dewey, C.W. (Ed.), *A Practical Guide to Canine and Feline Neurology*. Iowa State Press, Iowa, USA. 2003.
5. Done SH, Evans SA, Goody PC, Strickland NC. Atlas en Color de Anatomía Veterinaria: el perro y el gato. Editorial Elsevier, España. 2010.
6. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG, Molenaar GJ. El sistema nervioso. En: Dyce, K.M.; Sack, W.O.; Wensing, C.J.G. and Molenaar, G.J. (eds): *Anatomía Veterinaria*, Segunda edición. Editorial McGraw- Hill Interamericana, México. 1999. cap 8., 339-341.
7. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Miembro tóraco de los carnívoros. En: Boyd Filós, A.R. and Rendón López, K. (eds): *Anatomía Veterinaria*. Tercera edición.. El Manual Moderno S. A. de C. V, México. 2007 cap 16, 509-512.
8. Evans HE. The Spinal Nerves. En: Kitchell R.L. and Evans H.E. (eds): *Miller's Anatomy of the Dog*. Tercera edición. Elsevier, Philadelphia, 1993.
9. Ewer RF. The Carnivores. Cornell University Press, Ithaca, 1973.
10. Getty R, Sisson S, Grossman JD. Neurología de los carnívoros. En: Dellman H. D. and McClure R.C. (eds). *Anatomía de los Animales Domésticos*. Quinta edición. Salvat, México, 1982.
11. Ghoshal NG, Getty R. A comparative morphological study of the somatic innervation of the antebrachium and manus of the domestic animals (*Bos taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus*, *Sus scrofa domestic*, *Equus caballus*) *J. Sci.* 1968; 42 (4): 283-296.
12. Ghoshal NG. The brachial plexus (plexus brachialis) of the cat (*Felis domesticus*). *Zbl. Vet. Med. C.* 1972; 1: 6-13.

13. Crouch JE. Tex-Atlas of Cat Anatomy. Lea & Febiger, Philadelphia, 1969.
14. Holtzer CA, Marani E, Lakke EA, Thomeer RT. Repair of ventral root avulsions of the brachial plexus: a review. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2002; 7: 233-242.
15. Hudson LC, Hamilton W.P. Atlas of Feline Anatomy for Veterinarians, 1st ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1993.
16. König HE, Liebich HG. Órganos, Sistema Circulatorio y Sistema Nervioso. En: Anatomía de los animales domésticos. Ed. Médica Panamericana, Madrid, 2004.
17. Kornegay JN. Neurología de felinos. Temas Actuales en Medicina Veterinaria. Monoparesis (monoplejía) y mononeuropatía craneal: enfermedades de las raíces nerviosas y de nervios craneales y periféricos. *Probl Vet Med.* 1991; 3: 333-338.
18. Lorenzo Fernandez V, Bernardini M. Neurología del Perro y el Gato. Intermédica, Buenos Aires, 2007.
19. Nakamura M, Tomizawa N, Tohyama K, Hara S. Morphological variations in brachial plexus of beagle dogs: evaluation of utility as sources of allogeneic nerve grafts. *J Vet Med Sci.* 2004; 66 (7): 767-772.
20. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band IV: Nervensystem. Sinnesorgane. Endokrine Drüsen. 3ra ed. Paul Parey, Berlín, 1992.
21. Nomina Anatomica Veterinaria (NAV) W.A.V.A., Hannover, Columbia, Ghent, Sapporo, 2005.
22. Reighard J, Jennings HS. Anatomy of the cat. Holt, Rinehart and Winston, New York, 1966.
23. Reimers H. Der Plexus brachialis der Haussaugetiere. Eine vergleichend-anatomische. Studie. *Z. gesamte Anatom. und Entwidgeschichte.* 1925; 76: 653-753.
24. Saggese MD. Felinos Autóctonos. 1999. <http://www.aamefe.org/felaut.htm>
25. Sánchez HL, Silva LB, Rafasquino ME, Mateo AG, Zuccolilli GO, Portiansky EL, Alonso CR. Anatomical study of the forearm and hand nerves of the domestic cat (*Felis catus*), puma (*Puma concolor*) and jaguar (*Panthera onca*). *Anat. Histol. Embriol.* 2013; 42 (2): 99-104.
26. Schaller O. Nomenclatura Anatómica Veterinaria Ilustrada. Acribia, Zaragoza, 1996.
27. Shively MJ. Anatomía Veterinaria Básica Comparativa y Clínica. El Manual Moderno S. A. de C. V, México, 1993.
28. Van Soens I, Struys M, Polis I, Bhatti S, Van Meerven S, Martlé V, Mollet H, Tshamala M, Vanhaesebrouck A, Van Ham, L. Magnetic stimulation of the radial nerve in dogs and cats with brachial plexus trauma: A report of 53 cases. *The Veterinary Journal.* 2009; 182: 108-113.

EFECTO DE LA GNRH ADMINISTRADA EN LA IATF A VAQUILLONAS SIN CELO SOBRE EL PORCENTAJE DE PREÑEZ

Novoa F¹, Preissegger G², Zangrilli G², Callejas S³

¹Tesinista Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. ²Méd. Vet. Act. Privada. Tandil. Bs. As.
³Área de Reproducción. FISFARVET. Fac. Cs. Vet. UNCPBA. Tandil.

RESUMEN: Se utilizaron 367 vaquillonas Angus (15 meses: 184, 18 meses: 101 y 27 meses: 81) para evaluar el efecto de administrar GnRH en la IATF a vaquillonas que no manifestaron celo sobre el porcentaje de preñez. El día 0, se colocó un dispositivo intravaginal con 0,558 g de progesterona y 2 mg de benzoato de estradiol, intramuscular. El día 8 se retiró el DISP y se administró 0,150 mg de D-Cloprostenol y 1 mg de cipionato de estradiol. Los animales fueron pintados en la base de la cola y parte de la grupa, considerando celo a un porcentaje de despintado $\geq 30\%$. Los animales sin celo se dividieron para recibir o no 0,105 mg de acetato de Buserelina (Pintadas+GnRH y Pintadas-GnRH, respectivamente). El día 10 se realizó IATF y a los 39 días posteriores, el diagnóstico de gestación. El grupo Pintada-GnRH se preñó en menor proporción (42,2% vs 66,7% y 52,5%; Pintadas-GnRH, Pintadas+GnRH y Despintadas, respectivamente, $P < 0,05$). Se concluye que los animales que no manifiestan celo hasta la IATF se preñan menos que aquellos que si lo hacen, revirtiendo esta situación al administrar GnRH en dicho momento.

Palabras clave: Inseminación artificial a tiempo fijo, Celos, GnRH, porcentaje de Preñez

EFFECT OF GNRH INJECTED AT TAI IN HEIFERS DID NOT SHOW ESTRUS ON PREGNANCY RATE

Abstract: We used 367 Angus heifers (15 months: 184, 18 months: 101 and 27 months: 81) to evaluate the effect of injected GnRH at TAI heifers showed no estrus on the pregnancy rate. On day 0, heifers received progesterone intravaginal device (IVD) plus estradiol benzoate. On day 8, IVD was removed and injected D-Cloprostenol and estradiol cypionate. Heifers were painted on the base of the tail and part of the rump. On day 10, heifers with $\geq 30\%$ rubbed off were considered to be in oestrus. In these moment, heifers not showing estrus were randomized to receive or not 0.105 mg Buserelin acetate (Painted+GnRH and Painted-GnRH, respectively). On this day was TAI, beginning estrous heifers (Group estrus). Pregnancy diagnosis was done at 39 days after TAI. Pregnancy rate was lower in heifers did not show estrus and no received GnRH (42.2%) compared to others groups (Painted + GnRH: 66.7% and estrous: 52.5%, $P < 0.05$). In summary, heifers did not show estrus have lower pregnancy rate after TAI compared to heifers in estrous; these situation reverses with GnRH injection at TAI.

Key words: Timed artificial insemination, estrus, GnRH, pregnancy rate.

Fecha de recepción: 12/06/13

Fecha de aprobación: 29/08/13

Dirección para correspondencia: Santiago Callejas. UNCPBA. Tandil. Buenos Aires. Paraje Arroyo Seco s/n. (7000) Tandil.

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

INTRODUCCIÓN

El uso de la Inseminación Artificial (IA), tiene la ventaja que permite incorporar genética de animales superiores y que se adapten a las condiciones del sistema productivo; de esta manera se puede lograr el tipo de animal que el mercado demanda.

La posibilidad de usar toros con facilidad de parto, la sincronización de servicios, pariciones y terneros de destete más pesados y el reemplazo de los toros, al menos parcial, también son ventajas a destacar.

El control del ciclo estral mediante el uso de dispositivos intravaginales con progesterona ha permitido implementar programas de programas Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF) con resultados satisfactorios (1). El tratamiento más utilizado consiste en administrar benzoato de estradiol (BE) al momento de la inserción del dispositivo intravaginal con progesterona (Día 0), retirar el mismo en el Día 7 u 8, inyectando un agente luteolítico (PGF_{2α} o sus análogos sintéticos) y cipionato de estradiol o BE 24 h posteriores para sincronizar la ovulación. Se realiza IATF entre las 48 y 56 horas pos-retiro del dispositivo (1, 2). El tratamiento descrito permite sincronizar la ovulación de animales cíclicos e inducir actividad sexual en los animales en anestro (1).

Una de las hormonas que se ha utilizado para controlar el ciclo estral en combinación con dispositivos intravaginales con progesterona ha sido la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Esta se la ha administrado en el momento de realizar la IATF en lugar del BE (3, 4) sin afectar el porcentaje de preñez que se obtiene con el tratamiento tradicional. Además, hay trabajos en los cuales se ha inyectado la GnRH en el momento de realizar la IATF en hembras que son tratadas con un dispositivo intravaginal con progesterona y cipionato de estradiol en el momento de retirar el dispositivo como agente sincronizador de la ovulación. Los resultados han sido variables, desde no observarse efecto (5) hasta lograr mejorar las tasas de preñez (6).

Cuando se realiza la IATF, existen animales que no manifiestan celo y tienen menor eficiencia reproductiva (7). Pudiendo hipotetizar que el menor porcentaje de preñez que se obtiene sea consecuencia de la falta de ovulación del folículo dominante en el momento adecuado para realizar la IATF; en consecuencia, surge de interés estudiar el efecto de administrar GnRH (como inductora de la ovulación) en estos animales con la finalidad de mejorar el porcentaje de preñez.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de administrar GnRH en el momento de realizar la IATF a vaquillonas que no manifestaron celo (sin despintar) y que fueron sincronizadas con un dispositivo intravaginal con progesterona sobre el porcentaje de preñez.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y alimentación. Se utilizaron 367 vaquillonas Angus negro y colado (15 meses: 184, 18 meses: 101 y 27 meses: 81), con una condición corporal promedio (\pm de) de 4,0 ($\pm 0,4$) en una escala de 1 a 5 (1: muy flaca; 5: excesivamente gorda). La alimentación se basó en pastoreos de invierno (avena) y silo de maíz.

Tratamientos y servicio. En el día 0, se realizó ecografía ovárica utilizando un ecógrafo (Chison 600, sonda lineal transrectal de 5 MHz), seleccionando para el trabajo aquellas que presentaron cuerpo lúteo y folículos \geq a 10 mm. En este día se colocó un dispositivo intravaginal con 0,558 g de progesterona (Cronipres M 15, Biogénesis Bagó) y 2 mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen, Biogénesis Bagó).

El día 8 se retiró el dispositivo intravaginal y se administraron 0,150 mg de D-Cloprostenol (Enzaprost, Biogénesis Bagó) y 1 mg de cipionato de estradiol (CPE, Laboratorios könig). Además, los animales fueron pintados en la base de la cola y parte de la grupa con una línea de 30 cm de largo por 15 cm de ancho (Celo-test).

El día 10 se realizó lectura del despintado; considerando hembra en celo a aquellas que tuvieron un despintado mayor o igual al 30%.

El servicio se realizó por IATF comenzando a las 50 h de retirado los dispositivos con los animales que habían manifestado celo (Grupo Despintadas). Luego se continuó con lo que no tuvieron celo (sin despintar), siendo estos divididos al azar para recibir (Grupo Pintadas + GnRH) o no (Grupo Pintadas sin GnRH) una inyección de 0,105 mg de acetato de buserelina (Gonaxal, Biogénesis Bagó) en el momento de realizar la IATF.

En la IATF se utilizó semen congelado/descongelado proveniente de dos toros de probada fertilidad (Tabla 1).

Tabla 1. Características del semen de los toros utilizados en la IATF.

Características	Toro A	Toro B
Motilidad Progresiva hora 0	55%	35%
Vigor hora 0	3	3
Motilidad Progresiva hora 2	50%	35%
Vigor hora 2	3	3
Número	26.550.000	13.650.000
Morfología	88%	88%

Diagnóstico de gestación. Se realizó a los 39 días posteriores a la IATF mediante ultrasonografía.

Análisis estadístico. Para realizar el análisis estadístico se incluyó en el modelo el efecto Grupo (1: Despintadas, 2: Pintadas + GnRH y 3: Pintadas sin GnRH), la edad de la vaquillona (15, 18 y 27 meses), el toro (A y B) y sus interacciones. Se utilizó el Proc. CATMOD del SAS, fijando un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS

No se observó efecto del toro (A=60,0% y B=51,9%, $P>0,05$) o de su interacción con las otras variables. Por el contrario, el porcentaje de preñez difirió según el Grupo y la categoría de hembra ($P<0,05$), no interaccionando entre sí ($P>0,05$). Las vaquillonas que no se despintaron y no recibieron una inyección de GnRH tuvieron el menor porcentaje de preñez (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de preñez en vaquillonas según el grupo al que pertenecieron luego de recibir un tratamiento de control del ciclo estral basado en el uso de dispositivos intravaginales con progesterona e inseminadas a tiempo fijo.

Grupos	Preñez (%)
Despintadas	52,5 ^a (126/240)
Pintadas + GnRH	66,7 ^a (42/63)
Pintadas sin GnRH	42,2 ^b (27/64)

a,b: Valores con superíndices diferentes difieren $P<0,05$

Con respecto a la categoría de la hembra, se observó que aquellas que tuvieron 18 meses de edad se preñaron en mayor proporción que aquellas que tenían 27 meses y no difirieron de las de 15 meses (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de preñez en vaquillonas según su edad luego de recibir un tratamiento de control del ciclo estral basado en el uso de dispositivos intravaginales con progesterona e inseminadas a tiempo fijo.

Edad de la vaquillonas	Preñez (%)
15 meses	51,1 ^{ac} (94/184)
18 meses	64,4 ^a (65/101)
27 meses	43,9 ^{bc} (36/82)

a,b: Valores con superíndices diferentes difieren $P<0,05$

DISCUSIÓN

Las hembras que no manifestaron celo (pintura $\geq 30\%$) se preñaron en menor proporción que aquellas que si lo hicieron, siendo este resultado coincidente con lo informado por Stahringer *et al.* (2011). Estos autores registraron un 25,9% de preñez en la hembras que no se despintaron, significativamente inferior al ser comparadas con aquellas que se despintaron entre un 40 a 60% (70%) o lo hicieron en un porcentaje mayor (65,2%). En otros trabajos se han informado resultados similares; así, Callejas *et al.* (2011) observaron en vaquillonas con 15 meses de edad un 26,7% de preñez en aquellas que no manifestaron celo comparado con 61,8% en las que si lo hicieron. Por otro lado, en la categoría vacas con cría se han registrado resultados similares (9; con celo: 61,4% y sin celo: 41,0%; $P<0,05$).

Por otro lado, cuando se administró GnRH a las hembras pintadas se evitó que ocurriera una disminución en el porcentaje de preñez, obteniéndose resultados equivalentes a aquellos que se observaron en las hembras que manifestaron celo. La GnRH es inductora de la ovulación (10), por lo que se podría hipotetizar que los animales que no manifestaron celo podrían haber tenido fallas en la sincronía y/o ovulación con respecto al momento en que se realizó la IATF, dado que respondieron adecuadamente a la administración de esta hormona.

El 34,6 % de las vaquillonas no se despintó, lo cual es coincidente con un trabajo realizado por Soto *et al.* (2012); quienes informaron un 37,5% de vacas sin despintar al momento de realizar la IATF. No obstante en otro trabajo, el porcentaje de vaquillonas que no se despintaron fue menor (14,4 %; 8). La pintura utilizada fue la misma por lo cual no puede ser considerado a este factor como causa de divergencia.

Con respecto a la categoría de hembra y su efecto sobre el porcentaje de preñez, no puede ser explicado con la información disponible en el presente trabajo.

Se concluye que los animales que no manifiestan celo hasta el momento de realizar la IATF se preñan menos que aquellos que si lo hacen, revirtiendo esta situación al administrar GnRH en dicho momento.

BIBLIOGRAFÍA

- Callejas S. Control farmacológico del ciclo estral bovino: Bases fisiológicas, protocolos y resultados. Parte II. Rev. Taurus 2005. 25: 16-35.
- Bo G, Callejas S. Sincronización de celos y ovulaciones en el ganado Bovino. Pag. 189-199. En Palma, G. Editor. Biotecnología de la Reproducción. Segunda Edición. Ediciones Reprobiotec. Argentina. p. 669. 2008. ISBN: 978-987-05-3271-2.
- De Dominici O, Callejas S. Fertilidad de la IATF realizada después de la administración de Benzoato

de Estradiol o de GnRH al final de un tratamiento con progesterona/ progestágenos en vacas para carne. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 2004. 24 (Supl. 1): 280-281.

4. Huguenine E, Cledou G, Callejas S. IATF en vacas secas: Uso de dispositivos intravaginales con progesterona combinados con GnRH o Benzoato de estradiol. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 2008. Págs. 160-161.

5. Rodríguez Aguilar S, Vater A, Von Saldern M, Cabodevila J, Callejas S. Efecto de la dosis de GnRH sobre el porcentaje de preñez en vaquillonas tratadas con progesterona y CPE. Resúmenes IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC. Córdoba. 2011. Pág.332.

6. Vassolo V, Ruppel V, Cledou G, Callejas S. Efecto de utilizar dispositivos intravaginales con progesterona y cipionato de estradiol combinado o no con GnRH sobre el porcentaje de preñez a la IATF. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC. Córdoba. 2011. Pág. 335.

7. Stahringer R, Vispo P, Prieto P, Fogliatti G. Evaluación del pintado en la base de la cola en protocolos de IATF en vacas Bradford pluríparas. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. 2011. Pág. 336.

8. Callejas S, Fernández G, Teruel M, Bambill J. Estudio de algunos factores que afectan el porcentaje de preñez de hembras tratadas con dispositivos con progesterona y cipionato de estradiol e inseminadas a tiempo fijo. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. 2011. Pág. 334.

9. Soto G, Casaro G, Teruel M, Callejas S. Respuesta de celo a la sincronización y su relación con el porcentaje de preñez a la IATF en bovinos. Tesina de grado. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 2012.

10. Macmillan KL, Thatcher WW. Effects of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod.* 1991. 45:883-889.

ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA REVERTIR LA MULTIRRESISTENCIA MEDIADA POR BOMBAS DE EFLUJO

Marchetti ML, Mestorino N.

Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: El objetivo central fue restablecer la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, de cepas de *Escherichia coli* con fenotipo multirresistente (MDR) aisladas de tambos, mediante la asociación de diferentes antimicrobianos con el inhibidor de bombas de eflujo 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP). Se obtuvieron muestras de materia fecal de animales de producción y compañía, y de pozos sépticos. A los aislamientos se les determinaron los perfiles de sensibilidad y se obtuvieron 10 cepas MDR. Se emplearon dos cepas isogénicas de *E. coli* como control de calidad (AG100A con delección total de bombas de eflujo, y AG112 con sobreexpresión de bombas) y una "wild type", AG100. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) de florfenicol, ciprofloxacina, tetraciclina y ampicilina por el método de microdilución seriada en caldo Luria-Bertani con y sin NMP. Los mayores porcentajes de resistencia fueron frente a tetraciclina y ampicilina. Todas las combinaciones de resistencia múltiple incluyeron a tetraciclina en su perfil. El NMP asociado a ampicilina tuvo efecto nulo. En la mayoría de las cepas *E. coli* MDR y en AG112, las CIMs de ciprofloxacina, florfenicol y tetraciclina disminuyeron ≥ 4 veces al combinarse NMP. La cepa "normal" no presentó cambios relevantes y frente a AG100 la CIM se mantuvo estable, independientemente de la concentración de NMP utilizada. Las cepas tetraciclina-resistente podrían tener mayor tendencia a desarrollar resistencia múltiple. Ciprofloxacina, tetraciclina y florfenicol demostraron ser sustratos de las bombas, no siendo así para ampicilina. Resulta prometedor el efecto de la asociación de NMP con florfenicol.

Palabras clave: *E. coli* – antimicrobianos - multirresistencia –bombas de eflujo – 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

THERAPEUTIC ALTERNATIVES AGAINST MULTIDRUG RESISTANCE BY EFFLUX PUMP

ABSTRACT. The central objective was to restore the antimicrobial susceptibility *in vitro*, in strains of *Escherichia coli* with multidrug resistance phenotype (MDR), from commercial farms by combining antimicrobials with the efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP). Strains were isolated from the faeces of production and companion animals and from septic tanks. Sensibility profiles were tested to the isolations and 10 MDR strains were obtained. Laboratory strains included two isogenic mutants: AG100A, an RND type pump-deficient strain and AG112, an *acrAB* overexpressing strain) and a wild-type strain, AG100. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of florfenicol, ciprofloxacin, tetracycline and ampicillin were determined by a serial microdilution method in Luria Bertani (LB) broth in presence or absence of NMP. The highest percentages of resistance were for tetracycline and ampicillin. All combinations of multidrug resistance included tetracycline in their profile. Ampicillin had no effect when combining to NMP. In most of the *E. coli* MDR strains and in AG112, MICs of ciprofloxacin, florfenicol and tetracycline decreased ≥ 4 -fold with NMP. There was no relevant change against wild type strain and MIC remained the same against AG100, independently of NMP's concentrations. Tetracycline resistance strains are probably able to become multiresistant. Ciprofloxacin, tetracycline and florfenicol demonstrated be efflux pumps substrates, but not ampicillin. It is promising the combination of NMP with florfenicol.

Key words: *E. coli* – antimicrobials – multidrug resistance –efflux pumps – 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

Fecha de recepción: 25/06/13

Fecha de aprobación: 01/10/13

Dirección para correspondencia: M Marchetti, Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos representa un problema extremadamente severo para la salud pública. Existen determinados tipos de infecciones en seres humanos, generadas por gérmenes multirresistentes, para las que ya no hay terapia eficaz (1, 2, 3, 4). Las causas de esta ineficacia provienen, entre otras, de la mala utilización de los antimicrobianos (uso innecesario, dosis bajas, tratamientos cortos, intervalos incorrectos, etc.) en todos los ámbitos de la salud, a lo que se le suma en medicina veterinaria el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento, fundamentalmente en explotaciones intensivas (5, 6, 7, 8).

La resistencia a los antimicrobianos puede ser adquirida por una determinada bacteria por mutación, o a través del intercambio de material genético entre microorganismos patógenos, comensales y/o zoonóticos resistentes.

A lo largo de una cadena de transferencia compleja, los determinantes genéticos de resistencia bacteriana, pueden pasar de un hospedador a otro; esto es, de animal en animal, de animal a hombre y eventualmente, de hombre a hombre e incluso localizarse en el ambiente. Este hecho implica selección de resistencia por una primera bacteria, y la posterior transferencia vertical a su descendencia, con el riesgo de la posible transferencia horizontal a otros microorganismos (9).

Escherichia coli fue seleccionada como indicador de resistencia debido a que es uno de los grupos más extendidos de la microbiota animal y del hombre. Su monitoreo, permite conocer qué antimicrobianos están generando resistencia, evitar riesgos en salud pública, disminuir el fracaso terapéutico y evitar pérdidas económicas al productor (10).

La emergencia de resistencia en la microbiota normal constituye un riesgo inminente para la eficacia antimicrobiana en animales de consumo (9, 11). Es por ello muy importante resaltar que la resistencia a los antibióticos no es una característica propia de los microorganismos patógenos. Los genes de resistencia pueden ser adquiridos o seleccionados tanto en bacterias patógenas como en las bacterias comensales luego de una exposición a antimicrobianos, siendo la flora comensal de enorme importancia epidemiológica. La importancia de este último se documentó a través del aislamiento de grandes cantidades de bacterias comensales resistentes en intestino de individuos expuestos a ambientes donde la utilización de antimicrobianos es muy frecuente como en granjas y/o hospitales (12, 13).

La resistencia bacteriana es manifiesta en los animales mantenidos en condiciones intensivas donde los antibióticos son de aplicación corriente (cerdos, pollos parrilleros, vacas de tambos, feedlot) (9).

E. coli en particular, es una de las bacterias comensales con mayores posibilidades de generar resistencia en el campo veterinario y humano. La multirresistencia es la más grave expresión de resistencia desde el punto de vista clínico. Uno de los mecanismos de multirresistencia en *E. coli* a antibióticos lipofílicos/anfifílicos está representado por la sobreexpresión de bombas de eflujo. Estas bombas expulsan al antimicrobiano hacia el exterior de la bacteria impidiéndole así ejercer su efecto (9, 14, 15, 16).

El eflujo activo por medio de bombas es un mecanismo de resistencia ubicuo, ampliamente distribuido entre los microorganismos, y que interviene en el bombeo de numerosos antibióticos. Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un sustrato, o bien pueden transportar una amplia variedad de compuestos químicamente diferentes, incluyendo antimicrobianos de múltiples clases (de allí el término Multiple Drug Resistance: MDR) (17). La resistencia a múltiples drogas en bacterias patógenas –y también en comensales– se ha convertido en una amenaza creciente para la salud pública (18, 19, 20).

Se han observado incrementos adicionales en la concentración inhibitoria mínima de los antibióticos luego de haberse generado sobreexpresión de bombas de eflujo de diferentes clases dando lugar a un fenotipo multirresistente (MDR) (21).

La inactivación de dichos sistemas puede producir un aumento en la concentración de determinados sustratos marcadores en el interior de los microorganismos (22, 23, 24, 25). Esta característica los convierte, por lo tanto, en blancos ideales para la búsqueda de nuevos inhibidores de los sistemas de bombeo, que logren que las bacterias que portan estos sistemas sean más sensibles a los antimicrobianos actualmente existentes en el repertorio clínico (24).

La inhibición de dicho mecanismo puede transformarse en una prometedora estrategia para restaurar la actividad de los antimicrobianos que resulten sustrato de ese sistema. Existen diversas maneras de modificar la resistencia por eflujo entre las que se encuentra el uso de inhibidores de bombas (EPI del inglés *efflux pump inhibitor*).

Entre ellos se encuentra el 1-(1-naphthyl-methyl)- piperazine (NMP) que ha sido estudiado por diversos autores en diferentes especies bacterianas como *E. coli* (24), *Enterobacter aerogenes* (25), *Campylobacter jejuni* (26). Es una arylpiperazina que funciona como inhibidor de bombas de eflujo bacterianas de amplio espectro. Esta fue probada en aislamientos clínicos de *E. coli* de origen humano posteriormente sometidos a presión antimicrobiana para lograr fenotipos MDR (24). Sin embargo, no existen estudios acerca de su efecto sobre cepas de *E. coli* MDR comensales

de origen animal, potenciales transmisores de multirresistencia en forma horizontal, de enorme significación epidemiológica.

Hasta el momento los antimicrobianos evaluados en combinación con NMP fueron levofloxacina, tetraciclina, cloranfenicol, oxacilina, claritromicina, rifampicina y linezolid frente a *E. coli* (22, 23, 24, 25). Pero no existen datos acerca de su acción frente a ampicilina, ciprofloxacina y florfenicol, antimicrobianos de amplio uso en medicina veterinaria, potenciales seleccionadores de determinantes de resistencia y reconocidos sustratos de las bombas de eflujo.

El objetivo del presente trabajo fue, a partir de estudios de susceptibilidad *in vitro* de cepas de *E. coli* aisladas en producciones tamberas de la provincia de Buenos Aires, comparar los perfiles de resistencia entre animales-hombre y ambiente; y establecer datos de prevalencia de antibióticorresistencia en las zonas evaluadas. En la actualidad son escasos los datos existentes en nuestro país, acerca del monitoreo en medicina veterinaria de cepas de *E. coli* usadas como indicadoras de resistencia y multirresistencia de origen animal.

De manera que a partir del hallazgo de cepas de *E. coli* de campo con fenotipo multirresistente, nos propusimos como objetivo central, evaluar *in vitro* la interacción del inhibidor de bombas de eflujo 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) con antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias, usando como control cepas de *E. coli* modificadas genéticamente con diferentes niveles de expresión de bombas de eflujo. Se incluyeron en el presente estudio los antimicrobianos utilizados corrientemente en medicina veterinaria y de gran impacto en salud pública.

MATERIALES Y MÉTODOS

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (Sigma-Aldrich); caldo Luria-Bertani (LB) (10 g de tripton, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl por litro de agua destilada); caldo y agar Müeller Hinton (Laboratorios Britania, Argentina); discos de antibiograma amoxicilina-ácido clavulánico (20-10 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprima-sulfametoxazol (1.25-23.75 µg), ampicilina (10 µg), de Laboratorios Britania, Argentina. Florfenicol (30 µg) y ceftiofur (30 µg) de Oxoid, Inglaterra. Ampicilina 96% p/p (Fluka, Buenos Aires, Argentina), tetraciclina 97.03% p/p (Parafarm, Buenos Aires, Argentina), florfenicol 99.3% p/p (Romikin S.A., Buenos Aires, Argentina), ciprofloxacina 99.8% p/p (Parafam, Buenos Aires, Argentina).

PRUEBA CUALITATIVA DE SUSCEPTIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN PLACA

Selección de cepas de campo.

Se utilizaron cepas obtenidas a partir de un estudio no experimental observacional de tipo transversal realizado en tambos de la provincia de Buenos Aires. Los tambos seleccionados estaban ubicados en las localidades de Tandil, San Vicente, Trenque Lauquen y Luján. Se obtuvieron muestras de materia fecal mediante hisopado rectal a partir de animales sanos en producción (vacas en ordeño), mascotas (perros y gatos) y terneros de destete que consumían leche de descarté. Se obtuvieron, también, muestras de los pozos sépticos (representativas de los habitantes del lugar) en frascos limpios y estériles, siguiendo los protocolos correspondientes al Manual OPS-OMS 2004 (27, 28).

Aislamiento y tipificación bioquímica.

Se realizó aislamiento en medio sólido selectivo diferencial EMB, tinción de Gram y tipificación bioquímica de cada cepa (IMViC). Fueron seleccionados únicamente aquellos aislamientos clasificados dentro de la especie *Escherichia coli*.

Procedimiento.

Los aislamientos obtenidos a partir de la biotipificación pertenecientes a la especie *E. coli*, fueron sometidos a pruebas de susceptibilidad *in vitro* mediante difusión en agar frente a ocho antimicrobianos seleccionados por su frecuente uso, con el fin de obtener cepas resistentes a tres o más antimicrobianos, es decir multirresistentes.

El procedimiento se llevó a cabo en placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo Müeller-Hinton inoculado con las cepas aisladas a una concentración final de 5×10^5 UFC/mL. Se colocaron cuatro discos de antibiograma por placa, se incubaron a 35°C durante 20 hs y luego se procedió a realizar la lectura mediante la utilización de un calibre de precisión midiendo el área de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Con el fin de monitorear las pruebas y obtener resultados confiables, se utilizó la cepa de referencia *E. coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 con sensibilidad conocida para los antimicrobianos evaluados. El punto de corte utilizado para categorizar las cepas como sensibles o resistentes a cada antimicrobiano fue el recomendado por CLSI para *E. coli* (29, 30).

La selección de los antimicrobianos para las pruebas de susceptibilidad se fundamentó en encuestas sobre los agentes antibacterianos más utilizados en los últimos 12 meses, realizadas a encargados y/o productores de los establecimientos analizados (29, 30). Con los datos obtenidos de las encuestas se priorizó a aquellos antimicrobianos factibles de ser sustratos de las bombas de eflujo bacterianas.

Finalmente, siguiendo las recomenda-

ciones de la lista de agentes antimicrobianos establecidos para la realización de los estudios de susceptibilidad en medicina veterinaria detallado en los documentos M31-A2 (31) y M31-A3 *Performance standards for antimicrobial dilution and susceptibility tests for bacteria isolated from animals* (29) y de ciprofloxacina aportada por el M100-S19 *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (30), se seleccionaron los siguientes discos con antimicrobianos: ciprofloxacina (5 µg), ceftiofur (30 µg), florfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (20-10 µg), ampicilina (10 µg), y trimetoprima-sulfametoxazol (25 µg) (Lab. Britania S.A.).

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD CUANTITATIVA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

Cepas bacterianas

Las cepas de laboratorio empleadas fueron 10 aislamientos de *E. coli* multirresistentes (MDR) obtenidas a partir de la prueba cualitativa de susceptibilidad por difusión en placa, dos cepas mutantes isogénicas (AG112 y AG100A), una cepa "wild type", AG100 y *E. coli* ATCC 25922.

Se utilizaron dos cepas de *E. coli* modificadas genéticamente como control de calidad y una con expresión "normal de bombas" para la puesta a punto de la técnica de determinación de susceptibilidad por microdilución con inhibidor. Estas cepas fueron AG112 con sobreexpresión de bombas de flujo, AG100A con delección total de todas las bombas de flujo y AG100 con fenotipo "wild type".

Al igual que en el método de determinación de susceptibilidad por difusión, la cepa de referencia para el control de calidad fue *E. coli* ATCC 25922 (29).

Procedimiento

Se procedió a la determinación de la CIM a través de la prueba cuantitativa de microdilución en caldo, basada en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes de antimicrobiano en policubetas.

El caldo utilizado fue Luria Bertani (LB) y los antimicrobianos ensayados fueron tetraciclina, florfenicol, ciprofloxacina y ampicilina. La selección de los antimicrobianos se realizó en función de los fenotipos de resistencia de las cepas MDR (Tabla 1).

El rango de diluciones para determinar la CIM de cada antimicrobiano solo, fue de 256 µg/mL a 0.007 µg/mL.

Se calculó la mínima concentración efectiva (MEC) de 1-(1-naphthylmethyl)piperazine mediante su combinación con cada antimicrobiano

(a igual rango de diluciones que para la CIM -256 µg/mL a 0.007 µg/mL-), a cinco diferentes concentraciones de NMP: 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL y 100 µg/mL.

Paralelamente, se evaluó la actividad antimicrobiana intrínseca del inhibidor de bombas (es decir, sin antimicrobiano) frente a cada aislamiento problema. Para lo cual se emplearon diluciones en un rango de 800 µg/mL a 1.56 µg/mL.

Se preparó el inóculo por método directo a partir de una colonia aislada (29, 30). La densidad de dicha suspensión fue ajustada a la escala 0.5 de Mc Farland, es decir, $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL. Se diluyó en caldo LB hasta obtener una concentración final de 5×10^5 UFC/mL.

La determinación de la CIM fue realizada por observación directa del primer pocillo que no presentó turbidez (29, 30).

RESULTADOS

PREVALENCIA E INCIDENCIA DE MULTIRRESISTENCIA EN LOS TAMBOS ANALIZADOS

En los tambos de la provincia de Buenos Aires analizados, la resistencia a tetraciclina resultó ser la de mayor prevalencia, 10.5 % de la resistencia total, seguida por un 2.2 % de resistencia bacteriana a ampicilina. Encontramos un porcentaje menor de resistencia a trimetoprima - sulfametoxazol (1.6%), ciprofloxacina (0.7%), florfenicol (0.8%) y amoxicilina/ácido clavulánico (0.1%). No se halló resistencia frente a ceftiofur y gentamicina.

En cuanto a la resistencia encontrada a más de un antimicrobiano, los resultados fueron: 2.2% frente a dos antimicrobianos al mismo tiempo y 1.5% frente a tres o más agentes antibacterianos, es decir multirresistencia. Las cepas multirresistentes fueron 10 en total y pertenecían a vacas en ordeño, terneros y animales domésticos (perros). No se hallaron cepas multirresistentes en las muestras de los pozos sépticos en ninguna de las explotaciones analizadas.

Los perfiles de resistencia y la prevalencia se detallan en la Tabla I y en la Figura 1, respectivamente.

Efectos de la combinación de los antimicrobianos con el inhibidor de bombas NMP en las cepas isogénicas

No se observaron modificaciones en la concentración mínima inhibitoria cuando se combinó NMP con ampicilina frente a ninguna de las cepas isogénicas ni al fenotipo "normal". La CIM fue la misma para cada una de las cepas genéticamente modificadas, independientemente de la expresión de bombas de flujo y de la concentración de NMP incorporado. Es decir, no se modificó en abso-

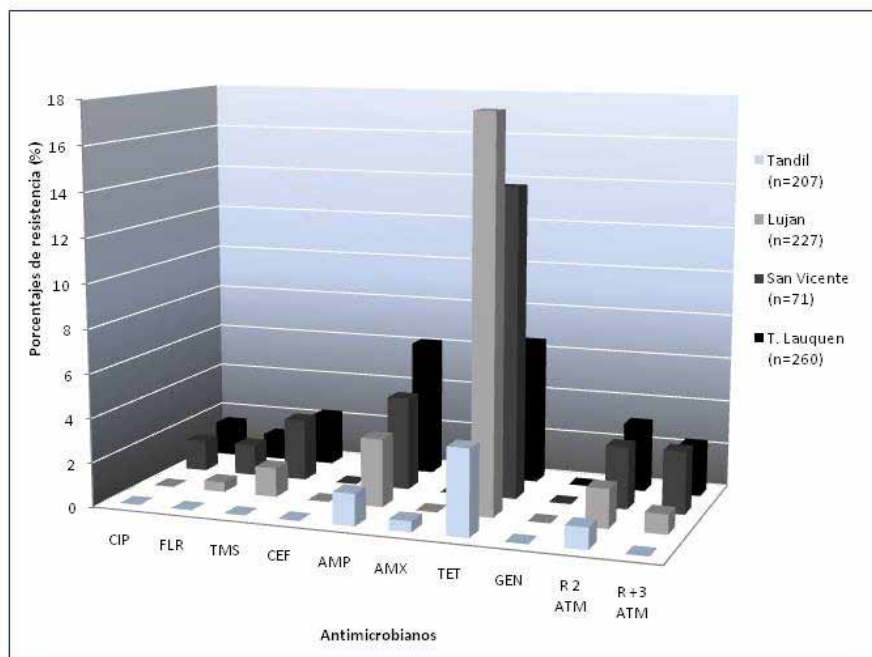


Figura 1. Porcentajes de resistencia antimicrobiana en 4 tambos de la provincia de Buenos Aires CIP: Ciprofloxacina. FLR: Florfenicol. TMS: Trimetoprima-sulfametoxazol. CEF: Ceftiofur. AMP: Ampicilina. AMX: Amoxicilina-ácido clavulánico. TET: Tetraciclina. GEN: Gentamicina. R 2 ATM: Resistente a dos antimicrobianos al mismo tiempo. R 3 ATM: Resistente a 3 antimicrobianos al mismo tiempo.

Tabla I. Fenotipos de cepas de *E. coli* multirresistentes en tambos de la provincia de Buenos Aires

Localización	Muestras	Número de cepas	Perfiles de resistencia
San Vicente	vaca en ordeño	1	CIP TMS AMP TET
	vaca en ordeño	1	FLR TMS TET
Lujan	perro	1	FLR TMS AMP TET
	perro	1	TMS AMP TET
Trenque Lauquen	vaca en ordeño	1	FLR AMP TET
	vaca en ordeño	1	FLR TMS TET
	terneros	3	CIP TMS AMP TET
	vaca en ordeño	1	CIP TMS AMP TET

CIP: Ciprofloxacina. FLR: Florfenicol. TMS: Trimetoprima-sulfametoxazol. AMP: Ampicilina. TET: Tetraciclina.

luto el perfil de resistencia a ampicilina, de los microorganismos analizados, al inhibir el eflujo de las bombas bacterianas.

Sin embargo, los otros antimicrobianos evaluados se comportaron de manera diferente, las CIMs se redujeron al menos 2 veces o más cuando se combinó el antimicrobiano con el NMP a concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL, hallazgo que se observa claramente en la cepa isogénica de *E. coli* con sobreexpresión de bombas de eflujo *acrAB*, AG112.

En el caso particular de florfenicol, se logró reducir su CIM 16 veces frente a la cepa AG112,

al combinarse con 50 µg/mL de NMP y 32 veces con 100 µg/mL del mismo. Frente a AG100 (cepa "wild type"), la CIM de florfenicol se redujo 4 y 8 veces cuando se combinó con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP respectivamente.

Para tetraciclina, la concentración de 50 µg/mL de NMP disminuyó 4 veces su CIM frente a AG112 y la incorporación de 100 µg/mL de NMP la redujo 16 veces. Frente a AG100, la CIM de tetraciclina fue reducida 2 veces en presencia de NMP tanto con 50 µg/mL como con 100 µg/mL.

Finalmente cuando NMP se combinó a concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL con

ciprofloxacina frente a la cepa AG112, se obtuvo una disminución de la CIM de ciprofloxacina de 2 y 4 veces, respectivamente. La CIM de ciprofloxacina asociada a NMP frente a la cepa AG100 se modificó de manera similar que en el caso de tetraciclina, es decir decreció 2 veces frente a las dos concentraciones mayores de NMP.

No se observó ningún tipo de actividad sinérgica de NMP en combinación con ninguno de los antimicrobianos evaluados, frente a la cepa de *E. coli* isogénica con delección total de bombas de eflujo *acrAB* (AG100A). En ningún caso las CIMs de los antimicrobianos se vio modificada frente a esta cepa.

Cuando NMP fue evaluado solo, sin el agregado de antimicrobianos, la CIM del inhibidor fue 400 µg/mL en las cepas de *E. coli* genéticamente modificadas, en la wild type y en la *E. coli* ATCC 25922. Los resultados mencionados se detallan en la Tabla II.

Se realizó la comparación del resultado obtenido al dividir las CIMs de los antibacterianos frente a las cepas de referencia con y sin sobreexpresión de bombas (AG100A y AG112); y valores de las CIMs obtenidas de los mismos antimicrobianos frente a la cepa AG112 con y sin el agregado de NMP a la concentración de 100 µg/mL (Tabla III); representado con la siguiente ecuación:

$$\frac{CIMs_{ATM-AG112}}{CIMs_{ATM-AG100A}} \approx \frac{CIMs_{ATM-AG112}}{CIMs_{ATM-AG112+NMP}}$$

$$\frac{CIMs_{ATM-AG112}}{CIMs_{ATM-AG100A}} \approx \frac{CIMs_{ATM-AG112}}{CIMs_{ATM-AG112+NMP}}$$

Se observó claramente que al comparar estas razones, el agregado de 100 µg/mL de NMP, permitió bloquear la totalidad de las bombas, logrando que las CIMs de los antibacterianos con inhibidor frente a la cepa AG112, se igualen a las CIMs obtenidas sin NMP frente a la cepa AG100 con delección total de bombas.

EFECTOS DE LA COMBINACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS CON EL INHIBIDOR DE BOMBAS NMP EN LAS CEPAS DE CAMPO DE *E. coli* MDR

Para un mejor análisis de los resultados, se subclasificaron los 10 aislamientos de *E. coli* MDR basándonos en los perfiles de resistencia de cada uno de ellos, de manera que las cepas se subdividieron en: 5 cepas *MDR-C* (ciprofloxacina resistentes), 5 cepas *MDR-F* (florfenicol resistentes), 8 cepas *MDR-A* (ampicilina resistentes), y 10 cepas *MDR-T* (tetraciclina resistente).

No se observaron modificaciones en la CIM de ampicilina en combinación con NMP frente a las cepas de *E. coli* MDR-A. La incorpo-

Tabla II. Efecto de NMP en las CIMs de los antimicrobianos en cepas isogénicas -AG100A y AG112-; y en un fenotipo wild type (AG100)

Cepa	Genotipo	Expresión de bombas <i>acrAB</i>	ATB	CIM (µg/ml) frente a concentraciones de NMP(µg/ml)						NMP CIM (µg/ml)	Veces que decrece la CIM	
				0	6,25	12,5	25	50	100		50 µg/ml NMP	100 µg/ml NMP
AG100	wild type	normal	AMP	2	2	2	2	2	2	400	0	0
			CIP	0.015	0.015	0.015	0.007	0.007	0.007	400	2	2
			TET	1	1	1	0,5	0,5	0,5	400	2	2
			FLR	8	8	4	4	2	1	400	4	8
AG100A	AG100Δ <i>acrAB</i>	delección	AMP	1	1	1	1	1	1	400	0	0
			CIP	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	400	0	0
			TET	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	400	0	0
			FLR	1	1	1	1	1	1	400	0	0
AG112	AG100 <i>marR</i>	Sobreexpresión	AMP	4	4	4	4	4	4	400	0	0
			CIP	0.062	0.062	0.062	0.031	0.031	0.015	400	2	4
			TET	8	8	8	4	2	0,5	400	4	16
			FLR	32	32	16	16	2	1	400	16	32

CIP: Ciprofloxacina. FLR: Florfenicol. AMP: Ampicilina. TET: Tetraciclina. ATB: antibióticos. CIM: concentración inhibitoria mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazina

Tabla III. Comparación entre la razón obtenida al dividir las CIMs de las cepas AG112 y AG100A; y la razón entre las CIMs frente a AG112 con y sin NMP

Antibiótico	Proporción o razón entra las CIMs				
	Con o sin <i>acrAB-TolC</i> para AG112 y AG100A	Con y sin NMP (50 µg/mL) para		Con y sin NMP (100 µg/mL) para	
		AG112	AG100A	AG112	AG100A
FLR	32	16	1	32	1
CIP	4	2	1	4	1
TET	16	4	1	16	1
AMP	4	1	1	1	1

FLR: Florfenicol. CIP: Ciprofloxacina. TET: Tetraciclina. CEF: Ceftiofur. AMP: Ampicilina. AMC: Amoxicilina-ácido clavulánico. GEN: Gentamicina. TMS: Trimetoprima-sulfametoxazol. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

Tabla IV. Efecto de 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) en la CIM de los antimicrobianos en cepas de campo de *E. coli* MDR aisladas de animales

ración de concentraciones crecientes de NMP no modificó el perfil de susceptibilidad frente a ampicilina.

En la mayoría de las cepas de *E. coli* MDR-F, la CIM de florfenicol disminuyó 4 veces al combinarse con las dos concentraciones mayores de NMP. Una cepa de *E. coli* MDR-F en particular, manifestó una modificación en su perfil de susceptibilidad con una reducción de la CIM de florfenicol de 8 y 16 veces con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP, respectivamente.

Para el caso de tetraciclina se obtuvo una disminución de 4 veces la CIM con 100 µg/mL de NMP en todas las cepas *E. coli* MDR-T. Sin embargo cuando el antimicrobiano fue combinado con 50 µg/mL de NMP, solo en 6 de las 10 cepas *E. coli* MDR-T la CIM de tetraciclina se redujo 4 veces.

La concentración de NMP que permitió una disminución de la CIM de ciprofloxacina de 4 veces en todas las cepas *E. coli* MDR-C, fue 100 µg/mL. Solo en 2 de las 5 cepas *E. coli* MDR-C se obtuvo un resultado similar (descenso de 4 veces la CIM de ciprofloxacina) con 50 µg/mL de NMP.

Cuando NMP fue evaluado solo frente a las cepas de campo MDR, sin el agregado de antimicrobianos, la CIM del inhibidor fue ≥ 800 µg/mL en todos los casos.

En la Tabla IV se presentan las CIMs de los antimicrobianos asociados a 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) frente a cepas de campo MDR aisladas de animales.

DISCUSIÓN

Los resultados de susceptibilidad obtenidos en este estudio mediante antibiograma, son comparables con los informados por otros autores en cerdos y/o bovinos de Argentina, Chile, Japón,

Serbia, EEUU, donde se hallaron altos niveles de resistencia frente a tetraciclina y ampicilina (32, 33, 34, 35, 36).

Todas las combinaciones de resistencia múltiple incluyen en su perfil a la tetraciclina, resultados similares fueron hallados en otros trabajos (36). Esto puede sugerir que las cepas de *E. coli* tetraciclina-resistentes podrían tener mayor tendencia a volverse resistentes frente a otros antimicrobianos simultáneamente. Este fenómeno podría deberse a la capacidad intrínseca que tienen las tetraciclinas de ser inductores de la mutación de la región *marR* cromosómica. MarR es una proteína que normalmente produce una acción reguladora negativa reprimiendo al operador *mar*. El flujo es dependiente del locus *marA* dando lugar a resistencia múltiple. Normalmente *mar* es reprimido por el MarR, pero puede ser desreprimido por compuestos tales como tetraciclinas, cloranfenicol y salicilatos (37, 38, 39, 40).

Algunos autores como Lomovskaya et al (2000), afirman que los betalactámicos son sustratos de las bombas de flujo tipo RND (41). Demostraron la influencia de la presencia de las bombas de flujo tipo RND en la susceptibilidad de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a través de modificaciones genéticas haciendo que las cepas tengan diferentes niveles de expresión de las mismas. Sin embargo, el bloqueo de estos sistemas por un inhibidor como el NMP no modificó el resultado de la CIM en nuestro estudio. Este resultado coincide con Bina et al (2009) que no obtuvo modificación en la CIM de ampicilina al combinarlo con NMP frente a *Vibrio cholerae* (42).

Está demostrado que el flujo tiene un papel clave en la cooperación con las enzimas β -lactamasas, pues permite que el sistema enzimático no se sature (14, 43, 44, 45).

Localidad	Muestra	Perfiles de Resistencia		ATB	CIP MIC (µg/ml) frente a concentraciones de NMP(µg/ml)						NMP MIC (µg/ml)	Veces que decrece la CIM con NMP	
					0	6,25	12,5	25	50	100		50 µg/ml	100 µg/ml
San Vicente	VO 1	FLR SXT TET	CIP AMP	FLR	16	16	16	8	2	1	≥800	8	16
				AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
				CIP	32	32	32	16	8	8	≥800	4	4
				TET	64	64	64	32	16	16	≥800	4	4
	VO 2	FLR TET	SXT	FLR	256	256	128	128	64	64	≥800	4	4
				TET	256	128	128	128	64	32	≥800	4	8
Lujan	PE 1	FLR AMP	SXT TET	FLR	256	256	256	256	128	128	≥800	2	2
				AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
				TET	256	256	256	128	128	64	≥800	2	4
	PE 2	SXT TET	AMP	AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
				TET	128	128	128	64	64	32	≥800	2	4
				FLR	256	256	256	256	128	128	64	≥800	2
Trenque Lauquen	VO 1	FLR TET	SXT	FLR	256	128	128	128	64	64	≥800	4	4
				TET	64	64	64	32	16	16	≥800	4	4
	VO 2	FLR TET	AMP	FLR	256	128	128	128	64	64	≥800	4	4
				AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
				TET	256	256	128	128	64	64	≥800	4	4
	TER 1	CIP TET	AMP	AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
				CIP	128	128	128	64	64	32	≥800	2	4
				TET	256	256	256	256	64	64	≥800	4	4
	TER 2	CIP TET	AMP	AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
				CIP	128	128	128	64	64	32	≥800	2	4
				TET	256	256	256	128	128	64	≥800	2	4
	TER 3	CIP TET	AMP	AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
CIP				128	128	128	64	64	32	≥800	2	4	
TET				256	256	256	128	128	64	≥800	2	4	
TER 4	CIP TET	AMP	AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1	
			CIP	128	128	128	64	32	32	≥800	4	4	
			TET	256	256	128	128	64	64	≥800	4	4	

CIP: Ciprofloxacina. FLR: Florfenicol. AMP: Ampicilina. TET: Tetraciclina. ATB: antibióticos. CIM: Concentración Inhibitoria Mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine. Muestras: VO: vaca en ordeño. TER: ternero. PE: perro. SV: San Vicente. L: Luján. TQ: Trenque Lauquen.

Sin embargo, como mecanismo de resistencia único, los sistemas de eflujo, frente a dicho grupo de antimicrobianos β-lactámicos, no genera niveles de resistencia significativos (41, 46, 47, 48).

Por otro lado, ciprofloxacina, tetraciclina y florfenicol pusieron en evidencia, claramente, ser sustratos de las bombas. Nuestros resultados demostraron que puede obtenerse un bloqueo total de las bombas al combinar los antimicrobianos con 100 µg/mL de NMP. Se generaron descensos notables de la CIMs de 4 veces o más en la cepa AG112 y en la mayoría de las cepas salvajes de *E. coli* con fenotipo *MDR*.

Diversos autores evaluaron la modificación de la CIM para fluoroquinolonas (levofloxacina) en aislamientos clínicos humanos de *P. aeruginosa* (25, 49) y *E. coli* (15, 24, 25) con resultados similares a los nuestros. Es decir, un descenso de 4 veces la CIM ha sido establecido como punto de corte indicador del efecto del bloqueo de las bombas por parte del inhibidor.

Considerando que la sobreexpresión de bombas de eflujo es el único mecanismo de resistencia presente en la cepa AG112, los resultados de la CIM demostraron que NMP manifiesta un importante sinergismo al combinarse con florfenicol en particular. La reducción de la CIM modificó

el perfil de resistencia de la cepa descendiendo la misma de manera tal, que la cepa recuperó la susceptibilidad por completo al combinar el antimicrobiano con la concentración mayor de NMP. Si bien estos resultados son preliminares, pueden tener una proyección sumamente importante, debido a que el florfenicol tiene un uso muy extendido en nuestro país en medicina veterinaria tanto en explotaciones bovinas, porcinas y avícolas. El poder revertir la resistencia a florfenicol frente a microorganismos gram-negativos de importancia en salud pública, permitiría utilizar en condiciones de total susceptibilidad microbiana una molécula con excelentes características para el tratamiento de enteritis infecciosas relacionadas con *E. coli* enteropatógena y *Salmonella*; y de enfermedades respiratorias causadas por *Pasteurella* spp. entre otras (50).

Los resultados de la MEC del inhibidor para las cepas isogénicas y los aislamientos de cepas salvajes de *E. coli* MDR coinciden con otros autores que trabajaron con *E. coli* patógeno proveniente de aislamientos clínicos (24, 25, 51), con *Acinetobacter baumannii* (52) y con *Campylobacter* spp. (26). En todos los casos la concentración de NMP que redujo un mínimo de cuatro veces la CIM del antimicrobiano fue de 100 µg/mL.

En cuanto a la CIM obtenida para NMP también existe coincidencia con otros trabajos publicados (24, 52), un valor tan elevado es indicador de que el inhibidor por sí solo no tiene acción antimicrobiana.

Por sí solos los sistemas de eflujo confieren de bajos a moderados niveles de resistencia (incrementos de la CIM de 1 a 64 veces). Razón por la cual su relevancia fue cuestionada. En general estos sistemas de resistencia se presentan en cooperación con otros mecanismos para conferir, no solamente elevados niveles de resistencia, sino también un mayor espectro de acción (21, 44). Sin embargo, en el caso de florfenicol cuando las bombas de eflujo se presentan como mecanismo principal responsable de la resistencia bacteriana, es posible retornar completamente el fenotipo hacia la susceptibilidad. Lo mencionado quedó claramente expuesto para la cepa con sobreexpresión de bombas.

Esto demuestra que NMP puede revertir parcialmente la multiresistencia a los antimicrobianos en *E. coli*, probablemente por no presentarse como mecanismo único de resistencia sino por complementar la acción de otros mecanismos de defensa, lo cual coincide con los resultados presentados por Kern et al en 2006, quienes emplearon NMP combinado con tetraciclina y levofloxacina (24).

Existe creciente evidencia acerca del significativo rol del eflujo por sobreexpresión de bombas en la resistencia bacteriana (21, 53, 54, 55, 56). En el presente trabajo quedó demostrado que el

inhibidor de bombas de eflujo NMP puede revertir la resistencia parcial o completamente hacia un perfil susceptible en bacterias multiresistentes. Es por ello que este mecanismo de resistencia debe ser tenido en cuenta en el desarrollo y diseño de futuros antimicrobianos o estrategias antimicrobianas con el fin de maximizar la eficacia y disminuir el desarrollo de resistencia a múltiples drogas.

Por todo lo expuesto, consideramos de relevancia continuar con la investigación del inhibidor de bombas NMP debido a que no existen en la actualidad estudios *in vivo* de ningún tipo. En forma preliminar podríamos decir que los pasos siguientes a esta investigación serían estudios *ex vivo*, que permitan una aproximación farmacocinética-farmacodinámica, estudios *in vivo* para determinar la seguridad de la droga, y establecer la concentración máxima capaz de producir eficacia sin toxicidad en asociación con el antimicrobiano.

Los resultados presentados en este trabajo podrán sentar las bases de nuevas estrategias para el combate contra los microorganismos, permitiendo la utilización de antimicrobianos en forma racional, utilizando al máximo sus características terapéuticas y minimizando la emergencia y diseminación de cepas resistentes.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Prof. Dr. Jorge Errecalde por guiarnos incondicionalmente en este camino.

Especial agradecimiento al Prof. Hiroshi Nikaido de la Universidad de California, Berkeley; y a Laura McMurry de Tufts University School of Medicine, Boston quienes gentilmente nos donaron las cepas isogénicas y la cepa con fenotipo wild type.

Nuestra gratitud a la entidad CEDIQUIFA por el "Premio a trabajo científico" recibido el pasado octubre del año 2011, que sentó las bases del presente estudio.

Los autores agradecen a CONICET por su colaboración, garantizando durante los periodos de 2006-2011 la beca doctoral a la Médica Veterinaria María Laura Marchetti. Las investigaciones en el Departamento de Farmacología son parcialmente solventadas por la Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires, Argentina) (V180).

Nuestro agradecimiento también a Bárbara Huber, Nadia Remezovsky y los docentes e investigadores de la Cátedra de Farmacología por su colaboración constante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Casal M, Causse M, Solís F, Rodríguez F, Casall M. Investigación de las resistencias a antimicrobianos en *Enterococcus faecalis*. Rev Esp Quimioter 2009; 22 (3):117-19.

2. Piffano Costa Pellegrino F, Martins Teixeira L, Siqueira Carvalho M, Nouer S, Pinto de Oliveira M, Mello Sampaio J et al. Occurrence of a Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clone in Different Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clinical Microbiology* 2002; 40 (7): 2420-24.
3. Urvashi S & Dutta R. Antimicrobial resistance pattern of *Shigella* species over five years at a tertiary-care Teaching Hospital in North India. *J Health Popul Nutr* 2011; 29 (3): 292-5
4. Zhanel G, DeCorby M, Adam H, Mulvey M, McCracken M, Lagace-Wiens P et al. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: Results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (11): 4684-93.
5. Errecalde J. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencias del desarrollo de resistencias en salud pública, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación FAO. Roma, Italia, 2004.
6. Mestorino N. Uso de antimicrobianos en grandes animales y en alimentos agropecuarios y su implicancia en humanos. En: Documento final "La multirresistencia: un problema a abordar en forma interdisciplinaria e interinstitucional", Taller Post-Congreso SADI-INE 2011: 24-30.
7. Miller MA & Flynn WT. Regulation of antibiotic use in animals. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, eds. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 3rd ed. Ames: Iowa State University Press 2000: 760-73.
8. Visek W. The mode of growth promotion by antibiotics. *J Anim Sci* 1978; 46: 1447-69.
9. Prescott J, Baggot J, Walter, R. *Terapéutica antimicrobiana en medicina veterinaria*. 3° edición. Argentina. Ed. Intermédica. Buenos Aires 2002.
10. Moreno MA, Domínguez L, Teshager T, Herrero IA, Porrero MC. Antibiotic resistance monitoring. The Spanish programme. The VAV Network. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14 (4): 285-90.
11. Nikolich MP, Hong G, Shoemaker NB, Salyers AA. Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 3255-326.
12. Levy SB. Emergence of antibiotic-resistance bacteria in the intestinal flora of farm inhabitants. *J Infect Dis* 1978; 137: 689-90.
13. van den Bogaard AE, Jensen LB, Stobbering EE. Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. *N Engl J Med* 1997; 337:1558-59.
14. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gramnegative bacteria. *J Bacteriol* 1996; 178: 5853-59.
15. Sáenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixidó M, Torres C, Vila J. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-β-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 544-45.
16. Yu EW, Aires JR, Nikaido H. AcrB multidrug efflux puma of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of excepcional flexibility generates its extremely Wide substrate specificity. *J Bacteriol* 2003; 185: 5657-64.
17. Marchetti, ML, Mestorino N, Errecalde J. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multirresistencia. *Analecta Vet*, 2011 31 (2): 40-53.
18. Delcour A. Outer membrana permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794: 808-16.
19. Poole K. Efflux mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 20-51.
20. Scatamburlo Moreira M, Chartone de Souza E, Alencar de Moraes C. Multidrug efflux systems in gram - negative bacteria. *Braz J Med Biol Res* 2004; 35: 19-28.
21. Webber M, Piddock L. The importante of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 9-11.
22. Bean DC & Wareham DW. Paradoxical effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine on resistance to tetracyclines in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 349-52.
23. Coban AY. Effect of efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine to MIC values of ciprofloxacin in ciprofloxacin resistant gram-negative bacteria. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43: 457-61.
24. Kern W, Steinke P, Schumacher A, Schuster S, Baum H, Bohnert J. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 339-43.
25. Schumacher A, Steinke P, Bohnert J, Akova M, Jonas D, Kern W. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 344-48.
26. Hannula M, Hanninen ML. Effect of putative efflux pump inhibitors and inducers on the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Med Microbiol* 2008; 57:851-5.
27. OIE. Collection and shipment of diagnostic specimens. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, 6th edition 2008. Paris, France.
28. OPS. Manual para análisis básicos de calidad del agua de bebida de la OPS 2004 CEPIS/PUB/02.93 Lima.
29. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals 2008; app std-3ed. Document M31-A3; Wayne, Pennsylvania, USA.
30. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement 2009. Document M100-S19 Wayne, Pennsylvania, USA.

M. Marchetti y col.

31. NCCLS, 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-second edition. NCCLS document M31-A2 Wayne, Pennsylvania, USA, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
32. Kijimi-Tanaka M, Ishihara K, Morioka A, Kojima A, Ohzono T, Ogikubo K et al. A nacional surveillance of antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from food-producing animals in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51, 447-51.
33. Knezevic P & Petrovic O. Antibiotic resistance of commensal *E. coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia, *Int. J Antimicrob Agents*, 2008; 31: 360-63.
34. Moredo FA, Vigo GB, Cappuccio JA, Piñeyro P, Perfumo CJ, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *E. coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2007; 39:227-29.
35. San Martín B, Bravo V, Borie C. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Arch Med Vet* 2005; 37: 117-123.
36. Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller R. Patterns of Antimicrobial Resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microbiol* 2008; 71 (3): 1394-1404.
37. Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (mar) mutants. *J Bacteriol* 1996; 178:306-08.
38. Piddock L. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 382-402.
39. Putman M, van Veen H, Konings W. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 672- 93.
40. Randall L, Ridley A, Cooles S, Sharma M, Sayers A, Pumbwe L et al. Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 507-10.
41. Lomovskaya O, Warren M, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 105-16.
42. Bina XR, Philippart JA, Bina JE. Effect of the efflux inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-b-naphthylamide on antimicrobial susceptibility and virulence factor production in *Vibrio cholera*. *J Antimicrob. Chemother* 2009; 63: 103-8.
43. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2242-46.
44. Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plesiat P. Antibiotic efflux pumps in procaryotic cells: occurrence, impact for resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:1167-73.
45. Van Bambeke F. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibacterial therapy and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery* 2010; 1: 138-75.13.
46. Li X, Zhang L, Srikumar R, Poole K. Beta -lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 399-403.
47. Nakae T, Nakajima A, Ono T, Saito K, Yoneyama H. Resistance to beta -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1301-03.
48. Xiaowen. Effect of the efflux inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-b-naphthylamide on antimicrobial susceptibility and virulence factor production in *Vibrio cholera*. *J Antimicrob. Chemother* 2009; 63: 103-8.
49. Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 565-70.
50. Mestorino N, Pesoa J, Turic E, Errecalde J. Florfenicol: Aspectos Farmacológicos. *Veterinaria Argentina* 1999; 16 (152): 127-139.
51. Bohnert J & Kern W. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 849-52.
52. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-naphthylamide. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:970-4.
53. Elkins C & Nikaido H. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J Bacteriol* 2002; 184: 6490-98.
54. Everett M, Jin Y, Ricci V, Piddock L. Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* isolates from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2380-86.
55. Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem* 2008; 283: 24245-53.
56. Zihra-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 287-91.

POISONOUS PLANTS FOR CATTLE IN COLOMBIA: RESEARCH PERSPECTIVES

Lozano MC¹, Diaz GJ²

¹ Toxicology Research Group, Pharmacy Department, Science Faculty. ² Animal Health Department, Veterinary Medicine Faculty, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia.

ABSTRACT: *Even though Colombian cattle-farming makes an important contribution to the national economy it also has great potential for growth; however, this activity is carried out in areas where animals may become naturally exposed to poisonous plants, affecting their health and production. It is recognised that some plants may damage the livestock sector in countries placing an important emphasis on cattle-rearing. Such problem has received scarce attention from academic research in Colombia, and the efforts made to do so date from the 1930s, 1940s, 1970s and 1980s without having had continuity. Many of the studies done in Colombia have been orientated towards establishing nitrate and cyanogenic glycoside content, ignoring other toxic metabolites. Likewise, certain vegetal species which can cause poisoning have not been fully studied, thereby hampering their management and treatment. It is thus important that studies are carried out in greater depth in Colombia concerning poisonous plants affecting livestock. A methodology is thus proposed which includes a search for initial information about suspicious plants, reproducing such poisoning experimentally (selecting the animal species, route, presentation and administration time, and evaluating effects) and searching for the chemical responsible for causing the poisoning. All these aspects are dealt with in the present review.*

Key words: cattle, poisonous plant, animal experimentation, phytochemistry

PLANTAS TÓXICAS PARA LOS BOVINOS EN COLOMBIA: PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

RESUMEN: *Además de un gran potencial de crecimiento, la ganadería bovina colombiana tiene un importante aporte a la economía nacional. Esta actividad se desarrolla en áreas donde los animales pueden exponerse naturalmente a plantas tóxicas, afectando su salud y producción. En países con una importante vocación ganadera se reconocen las plantas que pueden menoscabar el sector pecuario. En Colombia, escasamente ha sido estudiada esta problemática y los esfuerzos por hacerlo datan de las décadas de 1930, 1940, 1970 y 1980, sin que haya habido continuidad en los mismos. Muchos de los estudios realizados en el país han estado orientados a establecer el contenido de nitratos y glucósidos cianogénicos, ignorando otros metabolitos tóxicos. Así mismo, existen intoxicaciones por ciertas especies de vegetales que no han sido plenamente estudiadas, dificultando su manejo y tratamiento. Es importante que en el país se investigue con mayor profundidad sobre las plantas tóxicas de interés pecuario y para ello se propone una metodología que incluye selección de la planta sospechosa, reproducción experimental de la intoxicación (elección de la especie animal, vía, presentación y tiempo de administración y evaluación de efectos) y búsqueda de principios responsables de causar la intoxicación; estos aspectos se abordan en la presente revisión.*

Palabras clave: ganado bovino, plantas tóxicas, experimentación animal, fitoquímica

Fecha de recepción: 01/03/13

Fecha de aprobación: 27/08/13

Dirección para correspondencia: María Constanza Lozano Toxicology Research Group, Pharmacy Department, Science Faculty, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá Colombia Fax 0 57 1 3165060

E-mail: mclozanoa@unal.edu.co

INTRODUCTION

Colombia has an important cattle raising tradition, having almost 25 million head of cattle which thus places it amongst the first 9 countries having the greatest bovine production (1). The production systems, however, are mainly large-scale, having extensive areas given over to grazing. It has been calculated that 20 % of the area earmarked for cattle-raising is covered in weeds and stubble as its only vegetation (2), thereby introducing a very high probability that any animals grazing there will consume poisonous plants.

Most plant toxins are secondary metabolites since they are not essential for their growth or reproduction. Such substances represent a survival mechanism for poisonous plants since they are able to produce adverse physiological reactions in their predators and thus reduce the fact that they could become consumed (3).

Many factors predispose these plants to be eaten by cattle; some of them would be the use of fields covered in weeds, animals having nutritional deficiencies, including hunger, the arrival of new individuals which are "ignorant" of the place's particular poisonous plants, overgrazing leading to hardly appetizing forage and also exposing poisonous seeds present in the soil, some poisonous plants' high palatability and/or an alteration in poisonous plants' metabolism leading to the accumulation of some toxins caused by fertilising pastureland, treatment with herbicides or a change in climatic conditions (3,4).

The problem of animals being poisoned by plants has been studied in many countries and it could be stated that, in spite of some plants being able to adapt to different ecosystems, this varies depending on the each region's physiographic characteristics. Several bibliographic sources have thus described plant species which are poisonous for livestock, each being particular to a different country (5, 6), however such studies have been scarce in Colombia.

Research into plants which are demonstrably poisonous for cattle represents an urgent need in Colombia, bearing in mind that Colombia is the second country in the world regarding biodiversity (7), that the cattle-raising population is considerable and that it has large-scale production systems. The present paper was thus aimed at proposing a research strategy regarding poisonous plants in this tropical country.

BACKGROUND

Economic losses arising from poisoning by plants in the livestock sector are widely scrutinised in countries having recognised cattle-raising production. In Brazil that has the second greatest number of cattle herds; it has been calculated that 800,000 to 1,120,000 cattle die

from this cause annually (0.5 % to 0.7 % of bovine mortality) (8, 9). Data from 1976 estimated that mortality in cattle caused by this type of flora was around 0.5% annually in Colombia (10). Torres (1983) calculated that economic losses rose to US\$ 160,000 annually, their real value currently remaining unknown (11). Other factors which could lead to losses caused by poisoning with plants (in addition to mortality) would be reduced weight gain, reduced reproductive efficiency, expenses incurred in treating poisoned animals, restricted grazing and loss of usable forage due to direct competition with such plants (12).

Another impact produced by poisonous plants is related to toxins' effect on animal sub-products. The cattle's internal organs/intestines could be confiscated due to changes in their colouring or to them giving off disagreeable odours; such cases could be presented after consuming *Buchonsia pseudonitida* (13) which produces a pinkish colouring in tissue, or *Petiveria alliacea* which produces a bad smell in affected animals' meat (11). There is also the possibility that such toxins could be excreted in milk and thus become consumed by humans. Phytotoxins having these characteristics would be pyrrolizidine alkaloids present in plants from the genera *Senecio* and *Crotalaria* causing hepatotoxicity, piperidine alkaloids present in *Conium* spp., *Nicotiana* spp. and others causing neurotoxicity, selenium stored by accumulator plants (*Astragalus* spp., *Oonopsis* spp., *Aster* spp., etc.) which could cause multisystemic alterations (13) and ptaquilosides from ferns from the genus *Pteridium* which are considered to be carcinogenic (15).

The few studies published in Colombia to date, related to plants which are poisonous for cattle, resulted from work done by professors from the Universidad Nacional during the 1930s and 1940s and later on by functionaries from ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) during the 1970s and 1980s; it described different types of toxicosis, such as "cattle fall syndrome", photosensitivity, myopathy, bovine vesical haematuria, bovine chromatosis, selenosis, gastrointestinal disease and abortions (11,16, 17). The botanical species causing much of this poisoning have not been fully identified and, in many cases, poisonous ingredients and the clinical-pathological pictures originating them are not known in detail.

The technology implemented to date in Colombia for characterising the poisonous compounds present in the plants eaten by animals has been limited almost exclusively to spectrophotometrically determining nitrates, nitrites and qualitative analysis of cyanogenic glycosides (18). However, more than one hundred poisonous substances present in plants have been identified up to now. On the other hand, most knowledge about which plants are poisonous for animals

has mainly been based on research carried out in other countries which has not born in mind the Colombia's natural regions' physiographical conditions influencing plants' toxin production.

POISONOUS PLANT RESEARCH METHODOLOGY

Research into poisonous plants of interest regarding livestock must involve different aspects ranging from suspecting that disease is being caused by vegetal species to recognising the chemical ingredients responsible for the toxicosis. The research methodology adopted in this critical review of plants of interest regarding livestock has involved the following aspects: a search for initial information: toxic suspicion, experimental reproduction of the poisoning (selecting the animal species, route, presentation and vegetal material administration time, evaluating the poisonous effects) and the search for the active ingredients responsible for causing the poisoning. Each aspect is briefly described below.

SEARCHING FOR THE INITIAL INFORMATION: SUSPICIOUS PLANTS

When trying to clarify the cause of a disease in which the possible aetiological agent is a plant then the specific region's botanical species must be surveyed (9). One way of doing this is to use ethnobotany which studies human groups' interaction with plants where popular knowledge about vegetal species which could alter human beings and animals' health represents a valuable source of information (19). Another way to initiate the study of suspicious plants is by studying cases of mass poisoning in livestock species of interest where a systematic report of the case has been made and recognising the plants which might be responsible for such event by observation (20, 21, 22).

Chromatosis represents an example of a case in which a plant has been identified as the causal agent of a disease. This condition is characterised by deposit of pink or violet pigmentation on the teeth, in the mucosa, elastic, subcutaneous and muscular tissues, the urine and sometime in the milk from cattle and sheep. The syndrome was first described in Colombia in 1963 in the Huila and Tolima departments as well as in warm (500–600 masl) and cold regions (2,600 masl). One observational study involved more than 60 plants being collected and identified from cold and hot climates where clinical cases of chromatosis had been presented, the presence of the genus *Buchonsia* being found in both regions (*B. armeniaca* in the cold and *B. pseudonitida* in the hot climate). These plants led to reproducing the disease in experimental animals later on (13).

Whether through ethnobotany or clinical

reports and observation, many plants indicated as being suspicious could already have been described as poisonous species and, in such case, once taxonomic determination has been made by specialists, the scientific literature is relevant for obtaining more information.

EXPERIMENTALLY REPRODUCING THE POISONING

Biological assays using sensitive species have to be performed to confirm that a suspicious plant is responsible for poisoning (9). Part of the scientific literature related to toxicological tests in animals is orientated towards evaluating the risk that plants used in therapeutic preparations or for nutritional ends could be causing poisoning in human beings (23, 24). In this case, interest in evaluating vegetal specie's toxic potential is framed within safety studies which are carried out on laboratory animals and the results are extrapolated (not always correctly) to human beings. Experimental poisoning should ideally be done in the same animal species or in closely-related species when studying poisonous plants of interest regarding livestock (9).

EXPERIMENTAL ANIMAL

Many studies have been carried out using small ruminants (goats and sheep) either because they are the species in which poisoning has initially been described or because an attempt is being made to extrapolate the results to cattle. For example, Medeiros et al., (2009) confirmed that the plant *Centratherum brachylepsis* was the causal agent of a disease related to anorexia, ruminal indigestion, facial oedema, keratinocyte vacuolisation and vesicle formation in the ruminal epithelium of cattle and goats from the state of Paraíba in northern Brazil when they were fed it; similar signs and lesions were obtained in sheep and goats (22). Another example would be *Ipomoea carnea*, a plant containing indolizidine alkaloid (swainsonine), causing the cellular accumulation of oligosaccharides by inhibiting the α -mannosidase enzyme, leading to neuronal vacuolisation and the presentation of neurological disorders (25). Cattle and caprines are the most commonly affected species and the disease has been successfully reproduced in the latter species (26).

Some cases have been reported in which the totality of lesions could not be reproduced, in spite of the species involved in natural and experimental presentation of a particular disease being ruminants. The cardiotoxic plant *Nerium oleander* is especially poisonous for sheep; cardiac glycosides from the cardenolides group are its main active ingredient. Barbosa et al., (2008)

managed to reproduce the clinical picture in goats, characterised by apathy, colic, vocalisation, dyspnoea and ruminal distension; however, they did not report any pathological lesions in the liver and brain (i.e. such events happening in sheep) (27). Even though occurring less frequently, experimental studies have also been carried out on cattle where young animals of around one year old are preferred (28, 30).

Laboratory animals may be of interest when studying poisonous plants, whether for support when isolating active ingredients or as an auxiliary resource in recognising some plants whose poisonous effects could become presented in different species (31). For example, hepatotoxicosis caused by *Heliantherpium circinatum* (a plant containing pyrrolizidine alkaloids) has been reproduced in rats (32). However, these animals have not been a good model for reproducing the alpha-mannosidosis caused by the swainsonine present in *I. carnea* (33), whilst the guinea pig has been a suitable model for such toxicosis (34). Likewise, the poisoning caused by *Baccharis coridifolia* has been successfully reproduced in mice; this plant accumulates macrocyclic trichothecenes (35). Rabbits have been used in biological tests to confirm reports of poisoning by different plants (14, 36).

As plants' toxins can become metabolised and their poisonous effects can become modified in animals' digestive tracts (especially in polygastric animals), then the ideal scenario consists of experimenting with the particular species implicated in cases of poisoning. If the affected species is bovine then cattle must be used for conducting experiments or, failing that, small ruminants. However, using more easily handled, cheaper, laboratory species, allowing more individuals to be used, could provide relevant information about the effect of a poison and, on specific occasions, could represent a useful model for studying poisonous plants of interest regarding livestock. Such studies must be accompanied by preliminary phytochemical studies and selective chemical investigations tending to identify the active compound implicated in cases of poisoning.

VEGETAL MATERIAL'S CONSUMPTION ROUTE, PRESENTATION AND ADMINISTRATION TIME

As the ideal course in experimentation is reproducing the natural conditions of poisoning, then recently collected fresh vegetal material must be orally administered (31), either by voluntary consumption, mixing the plant in the food or via orogastric probe. However, some authors have used dried, finely ground up plants which they have dissolved in water (37) or mixed with the animals' food (38). Vegetal material extracts

obtained by using different solvents have also been used (39). Brazilian researchers have reported that *I. carnea* is very palatable for goats, meaning that the vegetal material collected for experimentation must be voluntarily consumed by the caprines (26, 40). Another way to ensure that animals voluntarily consume a plant of interest is by leading the animals to pastures already infested with it (28).

Some authors have reported success in reproducing poisoning by placing small amounts of the fresh plant in the mouths of sheep and goats (20, 22). Some studies in ruminants have proved successful by mixing the vegetal material (fresh or dried) with the animals' food ration (29, 41). However, a more precise dose could be achieved by administering dried and ground up plant, suspended in water, via an orogastric probe (42, 43).

When the poisonous ingredient has become known and the necessary methodology for determining it is available, then the plant administered to the animals could be analysed for determining toxin content and thus calculate the dose to be used in experiments. Such is the case of studies carried out with hypericin, the main poisonous compound in *Hypericum perforatum* (43), monocrotaline present in *Crotalaria retusa* (44) and with cyanogenic glycosides present in *Prunus virginiana* (45).

The dried plant could be supplied mixed in food (32, 34), in watery or oily suspension via probe (35, 36) or in alcoholic extract in studies involving laboratory animals (33, 46). Likewise, extracts and fractions from the plant of interest are habitually administered to small rodents in the search for active compounds (47).

Drying the plant for biological assays (in some cases) could make poisonous compounds lose their toxic activity. It has been shown that the toxicity of *Baccharis coridifolia*, containing macrocyclic trichothecenes, becomes reduced by half if the plant has been dried (35). Other poisonous molecules such as cyanogenic glycosides are very volatile, thus making it necessary to supply the fresh plant or, failing that, keeping it refrigerated from when it has been collected to when it is administered (37).

An investigator's objectives and a plant's characteristics determine the dose to be administered and the duration of the poisoning, respectively. For example, *I. carnea* could cause sudden death by being consumed in large amounts (9) but it has been used in chronic poisoning studies, even being administered for four months in low doses (26). Cyanogenic glycoside-accumulating plants, recognised as causing sudden death, have been administered for 30 days consecutively in experiments designed to evaluate the effects of prolonged administration (37, 45).

Toxicosis can become rapidly reproduced, such as the case of the cardiotoxic cardenolides present in *Nerium oleander*, where a single dose of vegetal material has led to the signs appearing even during the first hour after being administered (27, 42). The poisoning could become rapidly reproduced with plants like *Plumbago scandens*, *Mascagnia rigida* and *Palicourea corymbifera*, given that they are responsible for causing sudden death (20, 27, 46); of these three plants, the metabolite responsible for the poisonous effect is only known for the last one (monofluoroacetic acid) (31).

The factors influencing toxicity must be born in mind for biological tests to be successful, such as the administration route, the presentation and the time spent exposed to the plant. It is important that maximum experimental conditions are ensured, as similar to naturally occurring ones as possible.

EVALUATING POISONOUS EFFECTS

Animals must be clinically evaluated during the time spent during an experimental process. Clinical exams are performed more frequently once the symptoms have appeared. Paraclinical tests regarding haematology and blood chemistry provide important information about toxicosis. Likewise, some diagnostic aids could contribute towards a disease being characterised with greater precision, for example, electrocardiograms when experimenting with cardiac glycoside-rich plants (27). It is worth mentioning that experimenting with small ruminants or rabbits could provide better information than doing so with laboratory rodents because of the animal's size.

An animal's weight must be monitored before, during and on finishing an experimental process as large variations in weight could indicate physiological alterations. The weight of the organs, regarding body weight (relative weight), particularly in laboratory animals, also provides relevant information about poisoning (48).

Macroscopic and microscope pathology is a tool allowing affected systems to be defined with greater precision and also ascertain characteristic lesions contributing towards a diagnosis of spontaneous poisoning. Using histochemical techniques is useful in cases of toxicosis related to some plants causing structural cellular alterations as happens with those accumulating swainsonine (i.e. *I. carnea* and *Sida carpinifolia*) thereby leading to the formation of cellular carbohydrate deposits made visible by reacting with specific lectins (34). Some intracellular lesions may also be characterised by using an electron microscope (29, 40).

THE SEARCH FOR ACTIVE INGREDIENTS RESPONSIBLE FOR CAUSING POISONING

Research groups focusing on poisonous plants of interest regarding livestock have not traditionally elucidated the actual substances responsible for poisoning. In many cases, the researchers' final goal has been concerned with trying to reproduce particular types of poisoning in experimental animals and characterise the main pathological lesions, possibly due to the complexity represented by isolating, purifying and identifying as yet unknown chemical compounds and/or the absence of interdisciplinary work with experts in the field of chemistry who could thus make a great contribution to such work.

Characterising the active ingredients present in plants could be useful for relating toxins' mechanisms of action to suggesting possible treatment. Likewise, this could provide relevant information leading to synthesising useful molecules. In fact, many drugs have been prepared from toxins isolated from plants; such is the case of taxol, an alkaloid derived from the plant *Taxus baccata* causing sudden death in cattle; it is currently being used as an antitumor drug (25). Chemotaxonomy (the discipline classifying plants regarding the structure of their chemical constituents) represents a means by which the poisonous metabolites present in a botanical species from a particular family may be deduced (49). A series of processes, including extraction, purification and structural analysis, must be performed when chemically characterising a plant.

Adding solvents to dry pulverised vegetal material leads to different components being extracted from a plant, according to solvent polarity. The initial preparation of ethanol extracts means that they can be used for evaluating activity in laboratory animals. Using simple techniques, including colorimetry and thin-layer chromatography with developers, extracts may be evaluated for determining the presence of certain groups of compounds (terpenes, phenols, alkaloids, cardenolides and flavonoids) (50).

The following step is to apply separation techniques aimed at purifying active substances from amongst the rest of the components from the vegetal extract's matrix. One way of doing this is to use fractioning, using chromatographic techniques (open column chromatography being most widely used). The fractions so obtained are then biologically tested for determining activity (49). The pure compounds of interest could be submitted to structural elucidation techniques such as UV spectrometry, infra-red, nuclear magnetic resonance or mass spectroscopy. If a

molecule cannot be purified by the above, then hybrid techniques combining separation and detection could be used for isolating a compound of interest which could then become structurally elucidated. Liquid or gas chromatography coupled to mass spectrometry is the technique which provides the best information from amongst the aforementioned techniques (49).

Investigating plants of interest for livestock is an integral process which must include studying these species' active components. Identifying the responsible molecules and also submitting them to activity studies could contribute towards the search for useful compounds for humanity.

STRATEGIES FOR APPROACHING KNOWLEDGE REGARDING POISONOUS PLANTS

Given the large amount of plants which are poisonous for animals, it is necessary to group them to facilitate their study. The most usual ways of classifying them are according to geo-

graphical region (e.g. poisonous plants from the state of Texas), the infected animals' pathological clinical picture (plants causing acute mortality, plants causing photosensitivity), the affected systems (cardiotoxic plants, hepatotoxic plants), the botanical families (Poaceae, Apocynaceae) and the predominant poisonous compound (nitrate-accumulating plants, cyanogenic glycoside-accumulating ones, etc.). Table 1 lists some of the poisonous plants present in Colombia grouped according to their chemical classification as well as indicating the main effects produced by each of them (3). Table 2 lists the main poisonous plants present in Colombia, classified according to the affected system (3).

RESEARCH PERSPECTIVES REGARDING POISONOUS PLANTS IN COLOMBIA

Colombia is the second country in the world having the greatest diversity of flora as well as great cattle-raising potential this being mainly

Table 1. Examples of plants which are poisonous for animals present in Colombia, classified according to their main chemical compounds

Chemical Group	Toxic Substance	Plant	Effect
Alcohols and acids	Monofluoroacetic acid	<i>Palicourea</i> spp.	Neurotoxic
	Cicutoxin	<i>Cicuta maculata</i> .	Neurotoxic.
	Calcium insoluble oxalates	<i>Philodendron</i> spp., <i>Monstera</i> spp., <i>Caladium</i> spp.	Irritation of the oral cavity.
	Soluble oxalates	<i>Rumex</i> sp., <i>Chenopodium</i> sp., <i>Rheum</i> sp.	Hypocalcemia, nephrotoxic.
Alkaloids	Diterpenes	<i>Aconitum</i> spp.	Neuromuscular.
	Indolizidine	<i>Ipomoea carnea</i> , <i>Sida rhombifolia</i> .	Neurotoxic, infertility.
	Piperidine	<i>Conium maculatum</i>	Neurotoxic
	Piridine	<i>Nicotiana tabacum</i> .	Neurotoxic.
	Prrolizidine	<i>Senecio</i> spp, <i>Crotalaria</i> spp.	Hepatotoxic, photosensitivity
	Quinolizidine	<i>Lupinus</i> spp.	Teratogenic, myotoxic, neurotoxic
	Tropane	<i>Datura</i> spp.	Anticholinergic
Glycosides	Cardiac	<i>Nerium oleander</i> , <i>Digitalis purpurea</i> .	Cardiotoxic
	Cyanogenic	<i>Prunus</i> sp., <i>Sorghum</i> sp., <i>Trifolium repens</i> .	Respiratory, nervous.
	Phytoestrogen	<i>Medicago sativa</i>	Infertility
	Ptaquiloside	<i>Pteridium aquilinum</i> ,	Enzootic hematuria, Aplastic anemia.
Proteins and aminoacides	Lectins	<i>Momordica charantia</i> , <i>Ricinus communis</i> .	Gastrointestinal.
	Thiaminase	<i>Pteridium aquilinum</i> , <i>Equisetum</i> spp.	Neurotoxic.

Table 2. Examples of plants which are poisonous for animals present in Colombia, classified according to the affected system

Affected system	Plant	Toxic substance
Cardiovascular	<i>Thevetia peruviana</i>	Cardenolides
	<i>Nerium oleander</i>	Cardenolides
	<i>Sorghum vulgare</i>	Nitrates
Gastrointestinal	<i>Ricinus communis</i>	Lectins
	<i>Panicum coloratum</i>	Steroidal saponines
	<i>Senecio</i> spp.	Pyrrolizidine alkaloids
Urinary	<i>Rumex</i> spp.	Oxalates
	<i>Amaranthus</i> spp.	Oxalates
	<i>Pteridium aquilinum</i>	Ptaquiloside
Nervous	<i>Equisetum</i> spp.	Tiaminase
	<i>Conium maculatum</i>	Piperidine alkaloids
	<i>Prunus</i> spp.	Cyanogenic glycosides
Skeletal muscular	<i>Senna occidentalis</i>	Anthraquinones
Skin and appendages	<i>Fagopyrum esculentum</i> .	Fagopyrin
	<i>Lantana</i> spp.	Triterpenes
	<i>Brachiaria decumbens</i> .	Sporidesmin (produced by <i>Pythomyces chartarum</i>)
Reproductive	<i>Trifolium subterraneum</i> .	Isoflavones
	<i>Medicago sativa</i>	Steroidal saponines
	<i>Lolium perenne</i>	Nitrates

carried out on natural pastures which man has scarcely interfered with; large-scale production systems are used thereby representing a high risk of poisoning by the plants eaten by the cattle. Colombia does not have a system for recording possible cases of animals becoming poisoned by plants, making this phenomenon practically unknown to such an extent that nitrates and cyanogenic glycosides are usually considered as being exclusively responsible for poisoning by plants. There are very few publications about poisonous plants in Colombia, most existing ones having been published in non-scientific journals and practically none in internationally indexed journals, thereby creating a large conceptual vacuum concerning material related to this problem.

Research into poisonous plants of interest regarding livestock in Colombia must consider different aspects involving compiling an inventory by natural regions regarding plants which have been empirically recognised as being poisonous in each area, identifying poisonous plants by performing suitably designed toxicological studies, carrying out phytochemical studies leading to recognising the main metabolites responsible for toxicity and estimating the economic losses generated by poisonous plants for cattle-raising, bearing in mind the morbidity, mortality and costs incurred in prevention and treatment.

CONCLUSIONS

Cattle-raising potential, exploitation system characteristics and the great biodiversity of flora in Colombia are factors which, added to the emergent investigation being developed to date regarding plants which are poisonous for animals, justify suitable exploration of this problem. A methodology must be designed for correctly researching this field which has been based on identifying suspicious plants until the responsible active ingredients have been elucidated, characterising the clinical, paraclinical and pathologic picture in species which habitually become affected. Studying plants which are poisonous for animals could make exploitation systems more productive, thereby endeavouring to ensure a lower economic impact or contributing towards knowledge about this subject concerning public health.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank COLCIENCIAS for financing the research (project No. 1101-452-21116) which led to this review article.

BIBLIOGRAPHY

1. FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistical developmental series 12, Rome (Italia), 2010

2. MADR Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y CCI Corporación Colombia Internacional. Oferta agropecuaria, ENA, cifras 2006, Bogotá (Colombia), 2006
3. Diaz GJ. Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal. Ed. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (Colombia), 2010
4. Diaz GJ, Lozano MC. Introducción a la toxicología veterinaria. Ed. Unibiblos Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (Colombia), 2006
5. Youngken B, Blohm H. Poisonous plants of Venezuela. Harvard University Press. Cambridge (United Kingdom), 1962
6. Burrows GE, Tyrl RJ. Handbook of toxic plants of North America. Blackwell publishing. Iowa (USA), 2006
7. Romero M, Cabrera E, Ortiz N. Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2006-2007. Instituto de Investigación Alexander von Humboldt. Bogotá (Colombia), 2008
8. Riet-Correa F, Medeiros RM. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesq Vet Bras* 2001; 21 (1):38-42
9. Tokarnia CH, Dobereiner J, Vargas P. 2002. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon* 2002; 40(12):1635-1660
10. Peña NE, Villamil LC, Parra D, Lobo CA. Las enfermedades de los animales en Colombia. Situación por regiones naturales. Ministerio de Agricultura ICA. Bogotá (Colombia) 1980
11. Torres JE. Intoxicación de Bovinos por Plantas. ICA informa 1983; 17 (1):6-16
12. Nielsen D. Economic impact of poisonous plants on the rangeland livestock industry. *J Anim Sci* 1988; 66(9):2330-2333
13. Torres JE, Echeverry R, Mejía B, Peña N. Cromatosis de los bovinos o vaca morada en Colombia (I parte). *Carta ganadera* 1983; 20 (1): 23-30
14. Panter KE, James LF. Natural plant toxicants in milk: a review. *J Anim Sci* 1990; 68 (3): 892-904
15. Alonso-Amelot ME, Avendaño M. Human Carcinogenesis and Bracken Fern: A Review of the Evidence. *Curr Med Chem* 2002; 9(6):675-686
16. Mora CR. Contribución al estudio de las plantas tóxicas en medicina veterinaria. *Revista de Medicina Veterinaria* 1943; 83 (1):5-38
17. Perez-Arbeláez. Plantas venenosas de Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria* 1931; 23 (1):18
18. Vargas OM, Quiñónez LM, Parra JL. Plantas tóxicas para los bovinos en la vega del río Arauca. Manual de asistencia técnica No. 03. CORPOICA – PRONATTA. Villavicencio (Colombia), 1998
19. Al-Qura'n, S. Ethnobotanical survey of folk toxic plants in southern part of Jordan. *Toxicon* 2005; 46 (2):119-129
20. Medeiros RM, Barbosa RC, Lima EF, Simões SV, Riet-Correa F. Intoxication of goats by *Plumbago scandens* in Northeastern Brazil. *Vet Hum Toxicol* 2001; 43 (3):167-169
21. Santos J, Riet-Correa F, Dantas AF, Barros SS, Molyneux RJ, Medeiros RM, da Silva DM, de Oliveira OF. Toxic hepatopathy in sheep associated with the ingestion of the legume *Tephrosia cinerea*. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19(6):690-694
22. Medeiros RM, Yassaki JK, de Araujo JA, Dantas AF, Riet-Correa F. Poisoning by *Centratherum brachylepis* in ruminants. *Toxicon* 2009; 54 (1):77-79
23. Kumar RS, Gupta M, Mazumdar UK, Rajeshwar Y, Kumar TS, Gomathi P, Roy R. Effects of methanol extracts of *Caesalpinia bonducella* and *Bauhinia racemosa* on hematology and hepatorenal function in mice. *J Toxicol Sci* 2009; 30(4): 265-74
24. Babayi HM, Udemé JJ, Abalaka JA, Okogun JI, Salawu OA, Akumka DD, Zarma SS, Adzu BB, Abdulmumuni SS, Ibrahim K, Elisha BB, Zakariys SS, Inyang US. Effect of oral administration of aqueous whole extract of *Cassytha filiformis* on haematograms and plasma biochemical parameters in rats. *J Med Toxicol* 2007; 3(4):146-151
25. Molyneux RJ, Lee ST, Gardner DR, Panter KE, James LF. 2007. Phytochemicals: the good, the bad and the ugly? *Phytochemistry* 2007; 68 (22-24):2973-2985
26. Schumacher-Henrique B, Górniak SL, Dagli ML, Spinosa HS. The clinical, biochemical, haematological and pathological effects of long-term administration of *Ipomoea carnea* to growing goats. *Vet Res Commun* 2008; 27(4): 311-319
27. Barbosa RR, Fontenele-Neto JD, Soto-Blanco B. Toxicity in goats caused by oleander (*Nerium oleander*). *Res Vet Sci* 2008; 85 (2):279-81
28. Collazo L, Riet-Correa F. Experimental intoxication of sheep and cattle with *Wedelia glauca*. *Vet Hum Toxicol* 1996; 38(3): 200-203
29. Tabosa IM, Riet-Correa F, Barros SS, Summers BA, Simões SV, Medeiros RM, Nobre VM. Neurohistologic and ultrastructural lesions in cattle experimentally intoxicated with the plant *Prosopis juliflora*. *Vet Pathol* 2006; 43(5):695-701
30. Woods WL, Lisle WG, Mark LA, Woods DM, Filigenzi MS, Puschner B. Evaluation of the toxicity of *Adonis aestivalis* in calves. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19(5): 581-585
31. Tokarnia CH, Dobereiner J, Vargas P. Plantas tóxicas do Brasil. Ed. Helianthus. Rio de Janeiro (Brazil), 2000
32. Eröksüz H, Eröksüz Y, Ozer H, Ceribasi AO, Tosun F, Tamer U, Kizilay CA. Toxicity of dietary *Heliotropium circinatum* to rats. *Veterinary and Human Toxicology* 2003; 45(4): 198-201
33. Hueza IM, Guerra JL, Haraguchi M, Naoki A, Górniak SL. The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 57(1): 53-58
34. Cholich LA, Gimeno EJ, Teibler PG, Jorge NL, Acosta de Pérez OC. The guinea pig as an animal model for *Ipomoea carnea* induced alpha-mannosidosis. *Toxicon* 2009; 54(3): 276-282
35. Varaschin MS, Alessi AC. Poisoning of mice by

- Baccharis coridifolia*: an experimental model. *Vet Hum Toxicol* 2003; 45(1): 42-44
36. Medeiros RM, Neto SA, Barbosa RC, Lima EF, Riet-Correa F. Sudden bovine death from *Mascagnia rigida* in northeastern Brazil. *Vet Hum Toxicol* 2002; 44(5): 286-288
37. Soto-Blanco B, Górniak SL. Toxic effects of prolonged administration of leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to goats. *Exp Toxicol Pathol* 2010; 62 (4): 361-366
38. Anjos BL, Nobre VM, Dantas AF, Medeiros RM, Oliveira TS, Molyneux RJ, Riet-Correa F. Poisoning of sheep by seeds of *Crotalaria retusa*: acquired resistance by continuous administration of low doses. *Toxicon* 2010; 55 (1):28-30
39. Hueza IM, Dagli ML, Górniak SL, Paulino CA. Toxic effects of prenatal *Ipomoea carnea* administration to rats. *Vet Hum Toxicol* 2003; 45(1): 298-302
40. Armién AG, Tokarnia CH, Peixoto PV, Frese K. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (Convolvulaceae). *Vet Pathol* 2007; 44(2):170-84.
41. Soto-Blanco B, Fontenele-Neto JD, Silva DM, Reis PF, Nóbrega JE. Acute cattle intoxication from *Nerium oleander* pods. *Trop Anim Health Prod* 2006; 38(6): 451-454.
42. Adam SE, Al-Yahya MA, Al-Farhan AH. Toxicity of *Nerium oleander* and *Rhazya stricta* in Najdi sheep: hematologic and clinicopathologic alterations. *Am J Chin Med* 2002; 30(2-3):255-262
43. Bourke CA. The effect of shade, shearing and wool type in the protection of Merino sheep from *Hypericum perforatum* (St John's wort) poisoning. *Aust Vet J* 2003; 81(8):494-498.
44. Nobre VM, Dantas AF, Riet-Correa F, Barbosa RR, Filho JM, Tabosa IM, Vasconcelos JS. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. *Toxicon* 2005; 45(3):347-352
45. Soto-Blanco B, Stegelmeier BL, Pfister JA, Gardner DR, Panter KE. Comparative effects of prolonged administration of cyanide, thiocyanate and chokecherry (*Prunus virginiana*) to goats. *J Appl Toxicol* 28(3): 356-363
46. Ribeiro de Assis JC, Suffredini IB, Moreno PR, Young MC, Varella AD, Younes RN, Bernardi MM. Analysis of the toxic potential of *Palicourea corymbifera* (Müll. Arg.) Standl. in laboratory animals. *Res Vet Sci* 2006; 80(2): 209-217
47. Hueza IM, Guerra JL, Haraguchi M, Naoki A, Górniak SL. The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 57 (1):53-58
48. Beck BD, Slayton TM, Calabrese E, Baldwin L, Rudel R. The use of toxicology in the regulatory process. In: Hayes W. (editor). *Principles and methods of toxicology*. 4th ed. Taylor and Francis Press. Philadelphia (USA), 2001
49. Hostettmann K, Gupta M, Martson A, Ferreira E. *Manual de Estrategias para el Aislamiento de Productos Naturales Bioactivos / Handbook Of Strategies for The Isolation Of Bioactive Natural Products*. Cytel-Convenio Andres Bello. Bogotá (Colombia), 2008
50. Sanabria A. Análisis fitoquímico preliminar: metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (Colombia), 1983

ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN ANIMALES DOMÉSTICOS. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL GATO (*Felis silvestris catus*)

R Nuñez Favre^{1,2}, MC Bonaura^{1,3}, MC García Mitaceck^{1,2}, MC Stornelli¹, MA Stornelli¹, RL de la Sota^{1,2}

¹Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. ²CONICET. ³CIC.

Resumen: Algunas especies de animales como los pequeños rumiantes y algunos roedores presentan un período de reposo sexual estacional de duración e intensidad variable. Esta estacionalidad está directamente relacionada con las horas luz diarias (fotoperiodo) a las que se hallan sometidos los animales y se evidencia en las localizaciones geográficas en las que existen marcadas variaciones en la duración del día durante el año. En el caso de los pequeños rumiantes, ambos sexos tienen una actividad sexual mínima en primavera-verano y máxima en otoño-invierno. En el felino doméstico (*Felis silvestris catus*) la estacionalidad ovulatoria y estral de la hembra se halla bien documentada y ocurre durante los días que presentan más de 12 horas de luz (primavera-verano). Sin embargo la estacionalidad reproductiva del gato ha sido definida recientemente. El presente trabajo tiene como finalidad revisar los estudios existentes en relación a la influencia del fotoperiodo natural y manejo artificial del mismo sobre la actividad reproductiva en diferentes especies con especial énfasis en el gato doméstico.

Palabras clave: Estacionalidad reproductiva, fotoperiodo, gato doméstico.

SEASONALITY OF REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS: NEW PERSPECTIVES IN DOMESTIC CATS (*Felis silvestris catus*)

Abstract: Some domestic and wild animals have seasonal reproduction performance due to photoperiod. This seasonality is observed in geographic locations where large differences between hours of light during the year are present and occurs as an adaptation to annual changes in the habitat. Small ruminants have sexual activity during fall and winter ceasing during spring and summer. In the domestic cat (*Felis silvestris catus*) the queen has ovarian activity during the long days of spring and summer (> 12 h light) ceasing during short days of fall and winter. However, seasonality in the male has been recently defined. The aim of this study was to present a review about natural and artificial photoperiod changes over reproductive activity in different species with special emphasis in the domestic cat.

Key words: Seasonal reproduction, photoperiod, domestic cat.

Fecha de recepción: 07/06/13

Fecha de aprobación: 29/08/13

Dirección para correspondencia: R. Nuñez Favre, Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; B1900AVW La Plata

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

ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA: INFLUENCIA DEL MEDIO AMBIENTE Y REGULACIÓN ENDOCRINA

A través de años de evolución, los mamíferos se han adaptado a vivir en casi cualquier hábitat. Los diferentes hábitats están sometidos, en mayor o menor medida, a fluctuaciones climáticas y variaciones en las horas de luz diaria, las cuales son más pronunciadas a medida que aumenta la latitud afectando la disponibilidad de alimentos. Los mamíferos que habitan regiones con diferencias marcadas en la cantidad de horas luz diarias a lo largo del año se adaptaron a estos cambios exhibiendo cambios cíclicos en su fisiología y comportamiento. De esta forma, el cambio adaptativo principal resulta en restringir la actividad reproductiva al momento del año en el cual es posible cubrir las demandas energéticas más altas (fines de la gestación, parto, lactancia y destete). Es así que la etapa reproductiva es coincidente con la mayor disponibilidad de alimento para asegurar la sobrevivencia de la cría.

En zonas templadas, las mencionadas condiciones medioambientales ocurren en primavera y principios de verano. En tanto, en regiones tropicales y áridas estas condiciones están asociadas principalmente a la temporada de lluvias (1, 2). Por otra parte, existe también un factor social dado por el estímulo táctil, señales visuales, auditivas y olfativas, a través de feromonas, que influyen sobre el estado reproductivo en ovinos, bovinos, roedores y cerdos (3-6). En ovinos, estas señales sexuales están dadas por la interacción entre machos y hembras. Las hembras al estimularse entre sí logran inducir ciclos estrales y adelantar el inicio de la temporada reproductiva.

Los machos producen un estímulo visual y olfativo sobre las hembras que, a través de feromonas, inducen ovulación de hembras en anestro tardío; así como también, retrasan el final de la temporada reproductiva. A su vez, las hembras inducen un aumento en el volumen testicular, la secreción de las glándulas anexas y los niveles de testosterona sobre los machos (6).

La manera en que cada animal interactúa con estos factores depende, de la especie, de su genética individual y de su estado reproductivo en ese momento específico. La influencia de los factores ambientales sobre la regulación de la actividad sexual de mamíferos ha sido ampliamente estudiada. Actualmente se sabe que la estacionalidad reproductiva en especies que habitan zonas templadas, está regida por el fotoperiodo, es decir por la variación en la cantidad de horas luz diarias a través del año. La variación en la duración de los días es uno de los factores más importantes en la regulación de la estacionalidad reproductiva debido a que se mantiene constante de un año a otro, siendo así altamente previsible, a diferencia de otros factores climáticos como la

temperatura y las lluvias que presentan mayores variaciones anuales (7). Es así, que los animales presentan periodos de actividad sexual seguidos por periodos de reposo, de duración e intensidad variable regulados ambos por el fotoperiodo (8).

La manera en la que los animales sincronizan la actividad reproductiva en un momento específico del año comienza a estudiarse a principios de siglo, a partir del interrogante de los anatomistas acerca de la relación entre glándula pituitaria y las gónadas. Con el paso del tiempo, se creó una subdisciplina orientada a estudiar los patrones regulatorios encefálicos. Las primeras comunicaciones de sustancias endocrinas neurales que regulan la actividad reproductiva datan de la década del 40 y fueron realizadas en ratas domésticas. A partir de ese momento el estudio sobre este tópico se extendió a otras especies y esta subdisciplina se transformó en especialización, la endocrinología reproductiva que, en un principio fue orientada hacia patrones bioquímicos y luego moleculares (2).

Actualmente el conocimiento en este área es inmenso y detallado. Es así, que se ha comprobado que el mecanismo por el cual el fotoperiodo regula la actividad reproductiva en animales de zonas templadas se encuentra relacionado estrechamente con la actividad de la glándula pineal y de su producto de secreción. De esta forma la cantidad de horas de luz diaria es captada a nivel ocular y transformada al ciclo diario de secreción de melatonina por la glándula pineal. La secreción nocturna de esta hormona refleja la duración de la noche, regulando así la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) desde el hipotálamo. Así mismo las variaciones en la secreción de GnRH inducen variaciones en la secreción de hormona luteinizante (LH) responsable de la presencia o ausencia de ovulación en la hembra, y de variaciones en la producción espermática en el macho (9). Debido a que la melatonina no se almacena en la glándula pineal, la concentración sérica refleja fielmente su síntesis y liberación las cuales a su vez, están fuertemente ligadas al ciclo luz/oscuridad (10). Un cambio en la duración del tiempo de liberación de melatonina durante la noche, relacionado con la estación del año, estimula o frena el pulso de GnRH, la cual activa o suprime la liberación de LH y hormona folículo estimulante (FSH) hipofisarias, según la especie sea fotoperiódica positiva o negativa (9, 11, 12, 13). La estimulación o inhibición en la liberación de gonadotropinas está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativo con sus productos finales de secreción (inhibina y testosterona).

En pequeños rumiantes que habitan zonas templadas, las variaciones fotoperiódicas son el factor medioambiental principal utilizado para regular la actividad reproductiva. En ovinos, la

raza determina la sensibilidad a estas variaciones fotoperiodicas, mientras que la temperatura y la disponibilidad alimentaria son considerados moduladores de la actividad reproductiva (14). Sin embargo, en zonas tropicales con variaciones fotoperiódicas mínimas, las ovejas presentan un ritmo endógeno que alterna períodos de actividad sexual y quiescencia no sincronizado entre animales ni con el calendario anual. En estas zonas, el rol principal del fotoperiodo sería el de sincronizar el ritmo endógeno de los ciclos estrales (10, 15, 16).

En términos generales, en regiones templadas las ovejas domésticas comienzan a ciclar a mediados del verano, cuando los días se están acortando. Estos ciclos estrales se repetirán de forma continua cada 17 días, de no mediar gestación, hasta mediados de invierno a medida que los días se alargan. En este momento los ciclos ovulatorios cesan y los animales se mantienen en anestro (17). Esta estacionalidad es regida por la acción de melatonina, estimulando la pulsatilidad de la hormona GnRH durante las noches largas de la temporada reproductiva (9).

En esta especie, el periodo de acortamiento así como el de alargamiento de los días son importantes para situar, en el momento del año adecuado, la temporada reproductiva del año siguiente. (18). De esta forma los cambios fotoperiódicos estacionales actuales sincronizan el ritmo endógeno reproductivo de la temporada siguiente.

Los machos acompañan la estacionalidad reproductiva de la hembra evidenciando cambios reproductivos 1,5 a 2 meses antes debido a que la sensibilidad al fotoperiodo es diferente (17). El cambio de días largos a días cortos produce un aumento en la secreción de gonadotrofinas relacionado con el aumento en la duración de las noches. Como cada pico secretorio de LH induce posteriormente un pico secretorio de testosterona, esta última aumentará su concentración en conjunto con la mayor pulsatilidad de LH (17). Como consecuencia de estas modificaciones endocrinológicas ocurre un aumento en el tamaño testicular y epididimal así como en la cantidad de espermatozoides presentes en el eyaculado, aproximadamente 2 a 3 semanas posteriores al cambio lumínico (19). Así mismo se ha comunicado un mayor tamaño de la vesículas seminales durante la época reproductiva (20).

Estos cambios estacionales modifican la concentración de hormonas gonadotróficas así como de otras hormonas como la prolactina, evidenciándose una disminución de esta hormona concomitante con el paso de días largos a días cortos al tiempo que los niveles de FSH, LH y posteriormente, testosterona se incrementan. La situación inversa se evidencia con el paso a días largos en donde prolactina es esencial en el de-

sarrollo mamario y la producción láctea (17, 21).

En los caprinos, las hembras presentan actividad sexual fuertemente estacional, ovulando cuando descienden las horas luz (22). En concordancia con la estacionalidad de las hembras, los machos cabríos muestran una marcada estacionalidad reproductiva, ocurriendo actividad sexual durante el otoño. Si bien los machos de esta especie presentan espermatogénesis continua, ocurren modificaciones cuantitativas y cualitativas durante el año. La disminución de la espermatogénesis durante la estación de reposo sexual provoca cambios en el tamaño testicular, así como también disminución en la actividad de las glándulas accesorias (23). Así mismo la concentración de testosterona sérica varía a través del año alcanzando niveles máximos desde comienzos del otoño hasta finales de primavera (24).

Así como sucede en otras especies, los felinos domésticos (*Felis silvestris catus*) que habitan zonas templadas, también evidencian estacionalidad reproductiva. Desde hace más de 3 décadas la gata ha sido clasificada como fotoperiódica positiva. Las gatas ciclan cuando los días presentan más de 12 horas luz y en concordancia con bajas concentraciones séricas de melatonina. Durante la temporada reproductiva los celos se manifiestan de forma ininterrumpida cada 14 a 19 días de no mediar gestación, pseudopreñez o enfermedad (25). Por el contrario, durante el invierno, cuando los días poseen menos de 8 horas de luz, la concentración sérica de melatonina aumenta, no se producen pulsos de GnRH y el eje hipofisario-gonadal está quiescente por lo que la actividad ovárica cesa y la hembra entra en anestro (26). Es así que puede inducirse el ciclo estral mediante el aumento artificial del fotoperiodo (27, 28, 29). Las concentraciones plasmáticas de melatonina están sincronizadas con las concentraciones plasmáticas de prolactina. Por lo que ambas hormonas se encuentran elevadas durante el fotoperiodo corto (estación no reproductiva) y bajas durante el fotoperiodo largo (estación reproductiva) (26, 30).

Si bien la estacionalidad reproductiva se encuentra claramente definida en la hembra felina desde hace décadas, hace solo pocos años que algunos investigadores sugirieron la influencia del fotoperiodo sobre la fisiología reproductiva de los machos. A fines de la década de los noventa, algunos autores comunicaron la ausencia de estacionalidad reproductiva en el gato (31). Sin embargo, estudios posteriores sugirieron una producción espermática estacional en machos felinos (32, 33, 34).

Así como ocurre en otras especies fotoperiódicas, los felinos domésticos presentan espermatogénesis continua mostrando solo variaciones en los parámetros seminales a lo largo del año, siendo éste el principal efecto del fotoperiodo. Ya en

la década del 80, Johnstone observó un aumento en el volumen seminal en eyaculados realizados durante la temporada reproductiva (35). Veinte años más tarde, la estacionalidad reproductiva en el gato doméstico fue sugerida por algunos autores quienes comunicaron que la cantidad y calidad de espermatozoides epididimales fue significativamente mayor en muestras provenientes de epidídimos de gatos castrados en días de más de 11 horas luz (36, 37). Dos años más tarde Reyna et al mostraron la ocurrencia de variaciones en la cantidad de espermatozoides testiculares en relación a la época del año (38). En concordancia con estos resultados, Blottner observó que si bien en todas las estaciones se mantiene la capacidad de producir semen, existieron variaciones en el peso testicular y en la cantidad de espermatozoides por testículo en muestras de animales castrados durante la primavera comparado con los estudiados en otoño-invierno. En este estudio también se encontraron diferencias en la motilidad y el porcentaje de espermatozoides normales en las mismas estaciones estudiadas (33). Así mismo, un estudio retrospectivo sobre morfología espermática realizado en Suecia, evidenció que el porcentaje de espermatozoides normales fue mayor en muestras seminales de gatos tomadas en ascenso lumínico (32). Similares resultados fueron hallados en Argentina, en donde también se evidenciaron variaciones estacionales en el desarrollo de la hilera seminal en gatos adultos castrados durante diferentes épocas del año, encontrándose un mayor desarrollo de la hilera seminal durante los meses con mayor cantidad de horas luz (39).

En la actualidad existe poca evidencia sobre la producción espermática del gato doméstico y cuál sería la calidad seminal en la época reproductiva de la hembra felina. Es así que, aún no se han definido los parámetros seminales del espermograma normal. Algunos autores han encontrado alrededor de 40% de espermatozoides morfológicamente normales en gatos mestizos, mientras que otros sugieren que el porcentaje sería mayor al 60% (32, 40, 41). Sin embargo, existe gran variabilidad entre diferentes gatos y entre muestras del mismo animal cuando se utiliza electroeyaculación (42, 43). Este hecho adquiere gran importancia al estimar los parámetros seminales normales para cada animal en particular, habiendo sido sugeridas al menos 5 evaluaciones repetidas en el tiempo para evaluar la fertilidad de un gato (35).

Un estudio reciente realizado con 43 gatos castrados en las últimas dos semanas de cada estación del año ha mostrado que los animales castrados en épocas con días en ascenso lumínico (invierno-primavera) presentaron un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y de membrana plasmática íntegra significativa-

mente superior a los gatos castrados en descenso lumínico (verano-otoño). En concordancia, los animales castrados en ascenso lumínico mostraron una tendencia a tener un mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y una mayor cantidad de espermatozoides totales comparados con aquellos castrados en descenso lumínico (44).

En estudios realizados en los últimos años, las variaciones observadas en la calidad de los espermatozoides recuperados a través del año mostraron acompañar cambios histológicos testiculares. Si bien en todas las estaciones se evidenciaron túbulos seminíferos con diferentes grados de maduración, los animales castrados durante ascenso lumínico mostraron una mayor proporción de túbulos con espermátides maduras en comparación con los animales castrados en días con descenso lumínico. De manera inversa, en épocas con descenso lumínico se encontró una mayor proporción de túbulos con espermátides inmaduras. Así mismo, los animales castrados durante ascenso lumínico presentaron una mayor cantidad de células de Sertoli por túbulo y de células intersticiales de Leydig por campo, en comparación con los animales castrados en descenso lumínico (39, 44). No obstante la concentración de testosterona sérica mantuvo valores similares en los periodos evaluados (ascenso vs. descenso lumínico; $0,76 \pm 0,15$ vs. $0,59 \pm 0,19$ ng/dl; $P > 0,51$; (44). Así mismo y en concordancia con lo previamente descrito por otros autores se encontró gran variabilidad individual entre los animales muestreados (33, 45, 46).

En el gato doméstico se ha demostrado que la producción diaria de espermatozoides por gramo de testículo es de 16 millones y el peso promedio de cada testículo es de 1,2 gramos. La duración de la espermatogénesis es de 47 días, esto significa que cada 47 días los espermatozoides de la misma generación son eliminados hacia el epidídimo (47). En el epidídimo se produce la maduración espermática, mediante la cual los espermatozoides se capacitan para penetrar la zona pelúcida y fecundar al oocito. Así como también los espermatozoides listos para ser eyaculados se almacenan en la cola del epidídimo. Durante el pasaje por el epidídimo, la mayor parte del fluido testicular, rico en Na-Cl es reabsorbido e intercambiado por K con el fin de deshidratar y estabilizar la membrana del espermatozoide, ya que las altas concentraciones de Na promueven la capacitación y la reacción acrosómica. Las células epididimales también producen y secretan fosfatasa alcalina. Ésta puede utilizarse para diferenciar entre un eyaculado incompleto, conteniendo solo fluido proveniente de las glándulas accesorias, de un eyaculado completo, conteniendo además fluido epididimal (48). Este órgano presenta un epitelio

seudoestratificado en el cual pueden observarse tres tipos celulares (células principales, apicales y basales). En el gato doméstico, las células principales se dividen en células claras y oscuras. Esta característica tintorial observada al microscopio óptico podría relacionarse con diferencias en la fisiología de cada tipo celular. En invierno, se ha evidenciado una menor proporción de células oscuras y mayor de células claras, mientras que la situación inversa se observó durante los días de verano-otoño. Este hecho podría sugerir una mayor actividad celular epididimal, relacionada con la producción de factores implicados en la maduración espermática, en la etapa de mayor producción de espermatozoides (49). Así mismo, se ha evidenciado que animales castrados durante los meses de primavera y verano presentaron un mayor porcentaje de células PAS positivas. Este hallazgo se correlacionaría con una mayor actividad secretora del epidídimo en concordancia con la época de mayor producción espermática en el gato doméstico. Mostrando una mayor producción de mucopolisacáridos en la estación del año con días más largos (50).

REFRACTARIEDAD AL ESTÍMULO LUMÍNICO

En ovinos y caprinos además de estacionalidad en la actividad reproductiva también se ha evidenciado un fenómeno de insensibilidad al estímulo lumínico constante denominado foto-refractariedad. El mismo, se manifiesta luego de mantener a los animales durante periodos prolongados a una cantidad fija de horas luz diaria. Es decir, que a pesar de que los días cortos estimulan la actividad reproductiva, un periodo prolongado de días cortos induce insensibilidad al estímulo lumínico con el consiguiente cese de la actividad reproductiva (51). Así mismo, si los animales son mantenidos durante un largo periodo de días largos la actividad sexual comienza de manera espontánea como una adaptación al estímulo lumínico constante (52). Este fenómeno foto-refractario puede ser evitado exponiendo a los animales a periodos alternados de días largos y cortos. Este manejo es esencial para el control fotoperiódico de la actividad sexual en animales mantenidos en ambientes controlados (51, 53). Al realizar cambios lumínicos cada 30 o 60 días, los animales responden siempre al fotoperiodo del ambiente, manteniéndose la actividad reproductiva (54, 55). Esta alternancia mensual entre días cortos y largos es usada en carneros y chivos en centros de inseminación artificial, para inhibir el efecto foto-refractario obteniendo semen todo el año sin variaciones en la calidad espermática ni en la fertilidad. Mediante este manejo lumínico se ha logrado mantener la calidad seminal por 3 años consecutivos (55).

Los roedores también han mostrado presentar este fenómeno foto-refractario. Es así que, el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), el cual presenta actividad reproductiva durante los días largos de primavera-verano, evidencia refractariedad al estímulo lumínico constante. Esta refractariedad se manifiesta en algunos animales 10 a 12 semanas después de comenzado el periodo inhibitorio de días cortos, evidenciándose reactivación gonadal espontánea con activación espermatogénica y de los ciclos estrales. Esta reactivación gonadal se produce incluso en ausencia total de luz y estos animales son denominados foto-refractarios. Los animales foto-refractarios, no solo no responden al estímulo lumínico inhibitorio, sino que también son refractarios a la acción de melatonina exógena, posiblemente debido a insensibilidad de los tejidos blanco para esta hormona. Esta refractariedad puede ser revertida exponiendo a los animales a un periodo de 11 semanas de días largos luego de los cuales, tanto los machos como las hembras, vuelven a ser sensibles nuevamente al fotoperiodo corto (56, 57, 58).

Como se mencionara anteriormente, las variaciones fotoperiódicas determinan la estación reproductiva en gatos domésticos que habitan zonas templadas. No obstante, esta estacionalidad no se observa en gatas que habitan en zonas ecuatoriales ni en gatas mantenidas bajo fotoperiodo largo artificial durante 6 meses (59). Así mismo, nuestro grupo de trabajo ha observado que las gatas ciclan en forma continua durante más de un año si se las mantiene con 12 horas luz diaria sin presentar evidencia de refractariedad (Gimenez et al. datos no publicados). Sin embargo, el fenómeno foto-refractario comunicado en otras especies fue descrito recientemente en gatos machos. Un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo evidenció este fenómeno en gatos mantenidos durante 18 meses con fotoperiodo estimulador (12 horas Luz-12 horas Oscuridad). En nuestro trabajo pudo observarse una disminución en la calidad seminal en todos los parámetros evaluados (motilidad, vigor, volumen, concentración espermática, cantidad de espermatozoides totales, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales) manteniendo los animales una producción espermática basal. Estos animales fueron sometidos a fotoperiodo corto (8L-16O) durante 2 meses después de los cuales retornaron a fotoperiodo largo. Con este manejo lumínico todos los animales mostraron una significativa mejora de los parámetros seminales evaluados. De esta forma al igual que en otras especies estacionales la disminución en la calidad seminal inducida por un prolongado periodo estimulador pudo ser

revertida por el cambio a días cortos. Esto indica que para mantener una buena calidad seminal en gatos es necesario realizar un manejo lumínico adecuado para inhibir el efecto foto-refractario (60).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En regiones templadas, los cambios foto-periódicos son la señal principal utilizado por pequeños rumiantes y roedores para estimular la actividad reproductiva (51, 57). En estas especies, durante la estación reproductiva, las hembras presentan ciclos estrales mientras que en los machos se observa un aumento del tamaño testicular, de las glándulas accesorias y una mejor calidad seminal. En el gato doméstico la estacionalidad ovulatoria y estral de la hembra se encuentra bien documentada (11). Sin embargo, en el macho la estacionalidad se ha definido recientemente. Es así que, si bien presentan espermatogénesis continua a través del año, acompañan la estacionalidad reproductiva de la hembra evidenciando una mejora de la calidad seminal durante la estación reproductiva (33, 44). Este hecho se evidencia también a nivel testicular con cambios en el desarrollo de la hilera seminal y de la cantidad de espermatozoides testiculares (38, 39). El manejo artificial del fotoperiodo es frecuentemente utilizado en pequeños rumiantes para inducir ciclos estrales a contra-estación, adelantar la pubertad en machos, así como para mejorar la calidad seminal en machos adultos utilizados en centros de inseminación artificial (51). Sin embargo, estas especies evidencian refractariedad a un fotoperiodo constante prolongado alterando su fisiología reproductiva. Es decir que, si bien los días cortos son necesarios para estimular la actividad reproductiva en ovinos y caprinos, un prolongado periodo de días cortos induce foto-refractariedad con el consecuente cese de la actividad reproductiva. Esta refractariedad puede ser revertida exponiendo a los animales a fotoperiodo largo, por lo que la alternancia entre días cortos y largos es esencial para mantener la actividad reproductiva (51, 53). Así como ocurre en pequeños rumiantes, recientemente se ha observado que, gatos domésticos expuestos a fotoperiodo largo constante, también evidencian foto-refractariedad. Esta refractariedad puede ser revertida exponiendo a los animales a fotoperiodo corto, luego del cual, al retornar a fotoperiodo de días largos la calidad seminal se restablece (60). Los estudios realizados en los últimos años han permitido aclarar los conocimientos sobre la fisiología reproductiva en felinos machos y han abierto nuevas perspectivas en el manejo productivo y reproductivo felino. Futuros estudios permitirán determinar el manejo lumínico adecuado para mantener la calidad seminal durante un tiempo prolongado en el gato doméstico, tal como se ha

logrado establecer en pequeños rumiantes (55).

BIBLIOGRAFÍA

1. Malpaux B. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third. Elsevier Inc. USA, 2006; 2231-2282.
2. Bronson F. Mammalian Reproductive Biology, The University of Chicago Press. Chicago, 1989.
3. Kirkwood RN, Forbes JM, Hughes PE. Influence of boar contact on attainment of puberty in gilts after removal of the olfactory bulbs. *J Reprod Fertil* 1981; 61 (1): 193-6.
4. Vandenberg JG. Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation. *J Reprod Fertil* 1976; 46 (2): 451-3.
5. Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO, Sekoni VO. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 2001; 65 (3-4): 157-70.
6. O'Callaghan D, Donovan A, Sunderland SJ, Boland MP, Roche JF. Effect of the presence of male and female flockmates on reproductive activity in ewes. *J Reprod Fertil* 1994; 100 (2): 497-503.
7. Thiery JC, Chemineau P, Hernandez X, Migaud M, Malpaux B. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23 (1-2): 87-100.
8. Malpaux B, Viguie C, Thiery J, Chemineau P. Contrôle photopériodique de la reproduction. in *INRA Prod. Anim.* 1996.
9. Malpaux B, Thiery JC, Chemineau P. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev* 1999; 39 (3): 355-66.
10. Malpaux B, Viguie C, Skinner DC, Thiery JC, Chemineau P. Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull* 1997; 44 (4): 431-8.
11. Leyva H, Madley T, Stabenfeldt GH. Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 39: 125-33.
12. Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005; 9 (1): 11-24.
13. Vieyetz M. Fisiología veterinaria, 1. Interamericana McGraw-Hill. Nueva York, 1995; 696-706.
14. Aisen EG. Reproducción Ovina y Caprina, 1°. Inter-Médica. Buenos Aires, 2004; 1-10.
15. Karsch FJ, Robinson JE, Woodfill CJ, Brown MB. Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. *Biol Reprod* 1989; 41 (6): 1034-46.
16. Robinson JE, Karsch FJ. Timing the breeding season of the ewe: what is the role of daylength? *Reprod Nutr Dev* 1988; 28 (2B): 365-74.
17. Ortavant R, Bocquier F, Pelletier J, Ravault JP, Thimonier J, Volland-Nail P. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Aust J Biol Sci* 1988; 41 (1): 69-85.

18. Malpaux B, Robinson JE, Wayne NL, Karsch FJ. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *J Endocrinol* 1989; 122 (1): 269-78.
19. Lincoln GA, Peet MJ, Cunningham RA. Seasonal and circadian changes in the episodic release of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rams exposed to artificial photoperiods. *J Endocrinol* 1977; 72 (3): 337-49.
20. Thimonier J. Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones. *J Reprod Fertil Suppl* 1981; 30: 33-45.
21. Langford GA, Ainsworth L, Marcus GJ, Shrestha JN. Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin cycles in rams in relation to testis size and semen quality. *Biol Reprod* 1987; 37 (2): 489-99.
22. Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiery JC, Pellicer-Rubio MT, Malpaux B. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 Suppl 2: 40-7.
23. Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 1991; 36 (5): 755-70.
24. Delgadillo JA, Cortez ME, Duarte G, Chemineau P, Malpaux B. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reprod Nutr Dev* 2004; 44 (3): 183-93.
25. Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. *Canine and Feline Theriogenology*, W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, 2001; 396-403.
26. Leyva H, Addiego L, Stabenfeldt G. The effect of different photoperiods on plasma concentrations of melatonin, prolactin, and cortisol in the domestic cat. *Endocrinology* 1984; 115 (5): 1729-36.
27. Leyva H, Madley T, Stabenfeldt GH. Effect of melatonin on photoperiod responses, ovarian secretion of oestrogen, and coital responses in the domestic cat. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 39: 135-42.
28. Michel C. Induction of oestrus in cats by photoperiodic manipulations and social stimuli. *Lab Anim* 1993; 27 (3): 278-80.
29. Hurni H. Daylength and breeding in the domestic cat. *Lab Anim* 1981; 15 (3): 229-33.
30. Verstegen JP. *Small animal reproduction and neonatology*, Cheltenham, United Kingdom., 1998; 105-111.
31. Spindler RE, Wildt DE. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic Cat. *Biol Reprod* 1999; 61 (1): 188-94.
32. Axner E, Linde Forsberg C. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. *Reprod Domest Anim* 2007; 42 (3): 282-91.
33. Blottner S, Jewgenow K. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. *Reprod Domest Anim* 2007; 42 (5): 536-40.
34. Stornelli MA. Basic and advanced evaluation of cat's semen. *Brazilian J. Anim. Reprod.* 2007; (31): 135-140.
35. Johnstone I. Electroejaculation in the domestic cat. *Aust Vet J* 1984; 61 (5): 155-8.
36. Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA, Stornelli MC, Desmarás E, de la Sota RL. Concentración y viabilidad de espermatozoides epididimales felinos en diferentes épocas del año. in VII Reunión Interamericana de Cátedras de Fisiología Animal. 2004 La Pampa.
37. Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli CM, Reyna JC, de la Sota RL. Influencia del fotoperiodo en la cantidad de espermatozoides epididimales en gatos. in I Congreso y IV Jornada Nacional de Felinos. 2004 Corrientes.
38. Reyna JC, Savignone CA, Stornelli MC, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, de la Sota RL, Stornelli MA. Estudio de la concentración espermática testicular en diferentes estaciones del año en el gato doméstico. in X Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Ciencias Morfológicas. 2006 Tandil, Buenos Aires.
39. Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, Nunez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, de la Sota RL. Seasonal changes in testicular cell morphology in domestic male cats (*Felis catus*). *Reprod Domest Anim* 2009; 44 Suppl 2: 287-90.
40. Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol Reprod* 1983; 29 (4): 1019-25.
41. Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl* 1990; 11 (3): 204-15.
42. Pineda MH, Dooley MP, Martin PA. Long-term study on the effects of electroejaculation on seminal characteristics of the domestic cat. *Am J Vet Res* 1984; 45 (5): 1038-41.
43. Zambelli D, Cunto M. Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology* 2006; 66 (2): 159-65.
44. Nuñez Favre R, Bonaura M, Tittarelli C, Mansilla-Hermann D, de la Sota R, Stornelli M. Effect of Natural Photoperiod on Epididymal Sperm Quality and Testosterone Serum Concentration in Domestic Cat (*Felis silvestris catus*). *Reprod Domest Anim* 2012; 47 Suppl 6: 232-4.
45. Tsutsui T, Murao I, Kawakami E, Ogasa A, Stabenfeldt GH. Androgen concentration in the blood and spermatogenic function of tom cats during the breeding season. *Nippon Juigaku Zasshi* 1990; 52 (4): 801-6.
46. Tsutsui T, Onodera F, Oba H, Mizutani T, Hori T. Plasma hormone levels and semen quality in male cats during non-breeding and breeding seasons. *Reprod Domest Anim* 2009; 44 Suppl 2: 291-3.
47. Franca LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm

production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod* 2003; 68 (5): 1554-61.

48. Axner E. Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology* 2006; 66 (1): 14-24.

49. Reyna JC, Nuñez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, Stornelli MC, Guzzetti J, García Mitacek MC, Stornelli MA. Influencia del fotoperiodo sobre la cantidad de células claras y oscuras en el gato doméstico. in IX Jornadas de divulgación técnico-científicas. 2008 Santa Fe.

50. Savignone CA, Reyna JC, Stornelli MC, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, García Mitacek MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Presencia de mucopolisacáridos en el epitelio epididimal del gato doméstico en diferentes épocas del año. in XXIV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán. 2007.

51. Chemineau P, Malpoux B, Delgadillo JA, Guérin Y, Ravault JP, Thimonier J, Pelletier J. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim Reprod Sci* 1992; (30): 157-184.

52. Howles CM, Craigon J, Haynes NB. Long-term rhythms of testicular volume and plasma prolactin concentrations in rams reared for 3 years in constant photoperiod. *J Reprod Fertil* 1982; 65 (2): 439-46.

53. Almeida OF, Lincoln GA. Reproductive photorefractoriness in rams and accompanying changes in the patterns of melatonin and prolactin secretion. *Biol Reprod* 1984; 30 (1): 143-58.

54. Legan SJ, Karsch FJ. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod* 1980; 23 (5): 1061-8.

55. Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. *Reprod Nutr Dev* 1993; 33 (6): 609-17.

56. Stetson MH, Watson-Whitmyre M, Matt KS. Termination of photorefractoriness in golden hamsters-photoperiodic requirements. *J Exp Zool* 1977; 202 (1): 81-8.

57. Stetson MH, Tate-Ostroff B. Hormonal regulation of the annual reproductive cycle of golden hamsters. *Gen Comp Endocrinol* 1981; 45 (3): 329-44.

58. Stetson MH, Watson-Whitmyre M, Tate-Ostroff B. Role of the pineal and its hormone melatonin in the termination of photorefractoriness in golden hamsters. *Biol Reprod* 1983; 29 (3): 689-96.

59. da Silva TF, da Silva LD, Uchoa DC, Monteiro CL, de Aguiar Thomaz L. Sexual characteristics of domestic queens kept in a natural equatorial photoperiod. *Theriogenology* 2006; 66 (6-7): 1476-81.

60. Nuñez Favre R, Bonauro M, Tittarelli C, Stornelli M, de la Sota RL. Effect of refractoriness to long photoperiod on sperm production and quality in tomcats. *Reprod Domest Anim* 2012; 47 Suppl 6: 235-7.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones. Asimismo, reflejará las actividades académicas de postgrado, de extensión y de educación a distancia que se desarrollan en esta Casa de Estudio. El idioma oficial es el español aunque se aceptarán trabajos en inglés que seguirán el mismo esquema detallado más abajo.

ANALECTA VETERINARIA seguirá los "Requerimientos uniformes" para la presentación de manuscritos en revistas biomédicas según la quinta edición de 1997 (*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirement for manuscript submitted to biomedical Journals*. N Engl J Med 1997; 336:309-15). Puede obtener el original en Inglés en: <http://www.icmje.org/index.html>. Una traducción de estos requerimientos pueden ser recuperada en INTERNET en la dirección electrónica:

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

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

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

Normas generales de redacción

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

Las fotografías en blanco y negro podrán ser incluidas en número no mayor a 3 por artículo. Otras inclusiones de fotografías en blanco y negro o en color tendrán un cargo extra y estarán a cargo de los autores. Las versiones electrónica y en CD-ROM de la revista podrán contener fotografías color sin costo para los autores. La inclusión de fotografías color en el material impreso deberá ser expresamente solicitado al editor. El material enviado estará listo para su reproducción, deberán además enviarse fotografías o gráficos en formato TIF, CRD o JPG.

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

El costo de cada artículo será de \$ 150 (o 50 U\$S si el lugar de trabajo del primer principal proviene del exterior) hasta 5 hojas (publicadas) y \$ 150 por cada hoja adicional que deberá ser abonado por los autores indefectiblemente antes de su publicación.

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

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

Normas particulares de redacción:

1.Trabajos de investigación:

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

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

b)Resumen: será redactado en castellano y en inglés (abstract) incluyendo además en este último caso el título en idioma inglés. El resumen deberá sintetizar los objetivos principales del trabajo, la metodología empleada, los resultados más sobresalientes y las conclusiones que se hayan obtenido. No

superará tanto en español como en inglés las 200 palabras.
c) Palabras clave: al finalizar el resumen y el "abstract" en renglón aparte, deberán consignarse palabras clave, cinco como máximo, colocándolas bajo el título Palabras clave o "Key Words" según corresponda.

d) Introducción: se señalarán los antecedentes sobre el tema, citando la bibliografía más relevante y especificando claramente los objetivos y el fundamento del trabajo.

e) Materiales y Métodos: toda técnica nueva deberá detallarse para facilitar su comprensión. Se evitará pormenorizar sobre métodos ya experimentados, citándose los materiales utilizados en la realización del trabajo. En los casos en que el diseño experimental requiera una evaluación estadística, se indicará el método empleado.

f) Resultados: se presentarán en forma clara, ordenada y breve.

g) Discusión: incluirá la evaluación y la comparación de los resultados obtenidos con los de otros autores, indicando las referencias bibliográficas correspondientes. Las conclusiones deberán sustentarse en los resultados hallados, evitando todo concepto vago o condicional.

h) Agradecimientos: colaboraciones, ayuda técnica, apoyo financiero, etc. deberán especificarse en agradecimientos. Estas personas deberán conceder su permiso para ser nombradas.

i) Bibliografía: deberá escribirse en hoja aparte ordenada según aparece en el texto y numerada correlativamente con números arábigos, contendrá todas las citas mencionadas en el texto teniendo en cuenta el siguiente formato:

Autores: Apellido, seguido por las iniciales del/los autor/res separados del siguiente autor por coma. Título: completo del trabajo en el idioma en que fue publicado. Nombre de la revista o publicación donde aparece el artículo abreviada de acuerdo al "US National Library of Medicine (NLM)" que usa el *Index Medicus* <http://www.nlm.nih.gov>. En forma seguida el año de publicación; en forma continuada el número de volumen de la revista, seguido de coma y el número de la revista (si lo posee), dos puntos, seguido del número de páginas de inicio y terminación del trabajo. Ej.

1. Rodríguez-Vivas RI, Domínguez-Alpizar JL. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. *Rev Biomed* 1998; 9 (1):26-37

En el texto del trabajo hacer referencia mediante números arábigos entre paréntesis.

Si se tratase de trabajos publicados en libros:

Apellido y nombres en forma similar al indicado para revistas periódicas. A continuación el nombre del libro, edición, editorial, ciudad, país entre paréntesis, seguidas del año de publicación y páginas consultadas. Ej.

1. Plonat H. Elementos de Análisis Clínico Veterinario, Ed. Acribia. Zaragoza (España), 1984; p.45-75

Las tablas se presentarán en hojas separadas y con títulos completos ubicados sobre el margen superior y numerados con números arábigos, deberá incluirse además el título en inglés. Los gráficos se presentarán también en hojas separadas pero con títulos explicativos ubicados al pie de los mismos y numerados consecutivamente con números romanos debiéndose incluir además el título en inglés. Las tablas, gráficos o fotos se adjuntarán al final del manuscrito debiéndose indicar en el texto la posición correspondiente "insertar" tabla N° o gráfico N° o foto N°. Las fotografías deberán remitirse con la numeración en el reverso escrito con lápiz (o pegar una etiqueta de papel) de acuerdo a su secuencia en el texto, así como también indicarse el título y

el autor del trabajo y cuál es la parte superior de la misma. El tamaño deberá ser de 10 por 15 cm, pudiendo reducirse en la publicación por lo que se sugiere la buena calidad del detalle que se quiera resaltar. Cada foto deberá ser acompañada de una breve reseña explicativa de la misma en español y en inglés.

MUY IMPORTANTE: No enviar trabajos con bibliografía numerada automáticamente por el procesador Word, tampoco copiar y pegar *link* de internet, estos deben ser tipeados en el procesador de texto por los autores.

II. Artículos de revisión

Versarán sobre temas relevantes incluyendo una revisión bibliográfica adecuada y sus autores deberán tener idoneidad en los mismos. Estos artículos incluirán las siguientes secciones: título, título en inglés, resumen, "abstract", texto, agradecimientos y bibliografía. La extensión de estos trabajos no excederán las cincuenta páginas y sesenta citas bibliográficas.

El autor no deberá solamente realizar una recopilación bibliográfica exhaustiva, sino que además deberá hacer una discusión crítica sobre el tema considerado, destacando la trascendencia actual y futura y los puntos sobre los que existan diferencias de opinión.

III. Comunicaciones breves

Esta sección estará destinada a la comunicación de hallazgos preliminares en trabajos de investigación en marcha y a la descripción de nuevas técnicas (de laboratorio, quirúrgicas, de producción), hallazgos clínicos exóticos o poco frecuentes, etc. Su organización deberá seguir el lineamiento general indicado en el ítem I. No deberán exceder las dos páginas incluyendo no más de 10 citas bibliográficas.

IV. Información institucional

Esta sección será destinada a difundir todas aquellas actividades o informaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata que tengan una relación directa con los objetivos dispuestos para la presente publicación.

V. Cartas al editor

En esta sección se incluirán actualizaciones breves y comentarios sobre artículos ya publicados. Las cartas (hasta 1000 palabras de texto) deberán ser en formato carta y no se dividirán en secciones. Las cartas comenzarán con una introducción breve sobre la relación del tema. Incluir desarrollo de métodos; referencias, en no más de cinco; y figuras o ilustraciones, en no más de dos.

Correspondencia

Toda correspondencia dirigida a esta revista deberá realizarse a la siguiente dirección:

Sr. Director ANALECTA VETERINARIA
CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA
TEL/FAX: 0221-4257980

Desde el exterior: +54-221-4257980

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

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