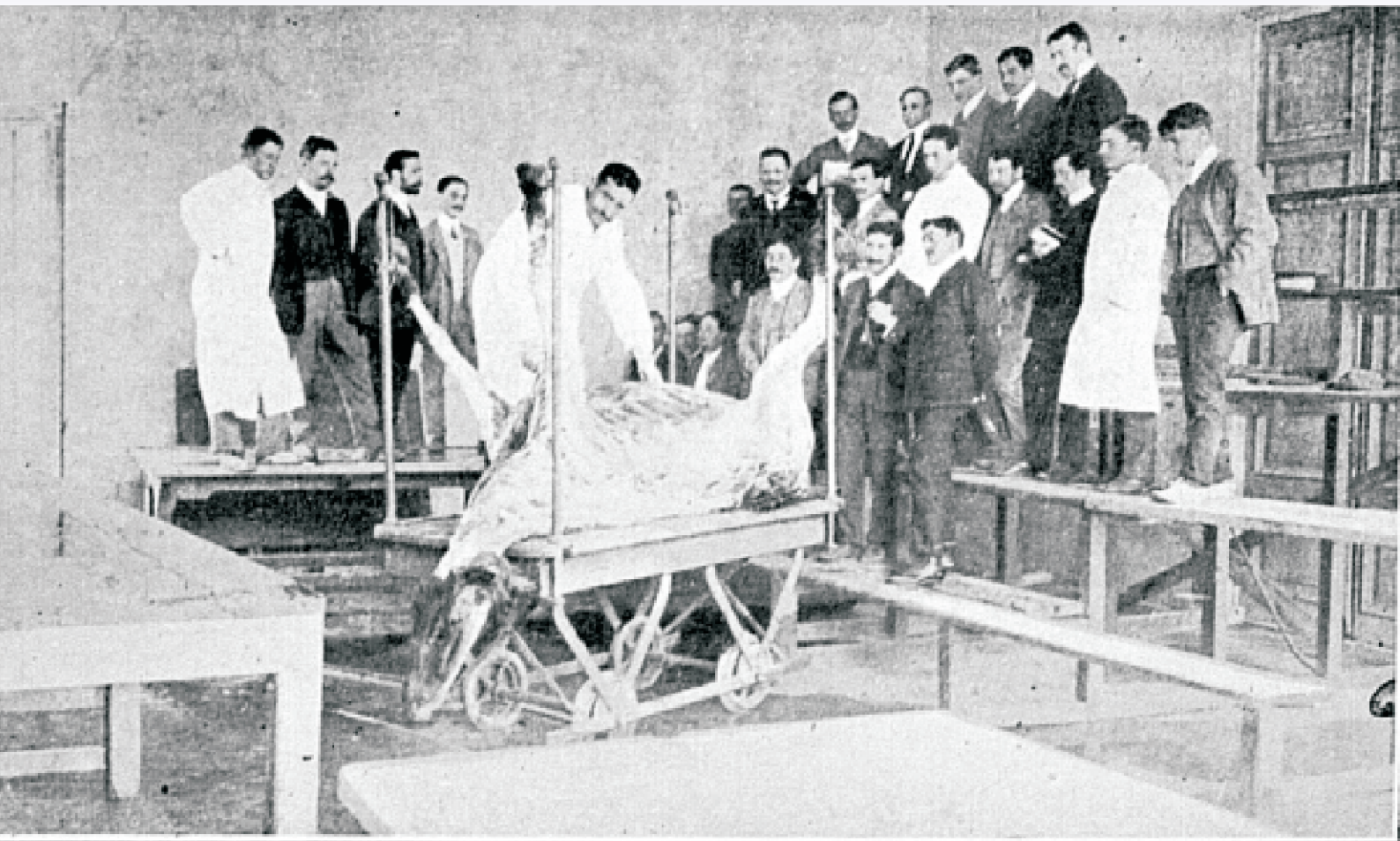


ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Volumen 32 nº 1 año 2012



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

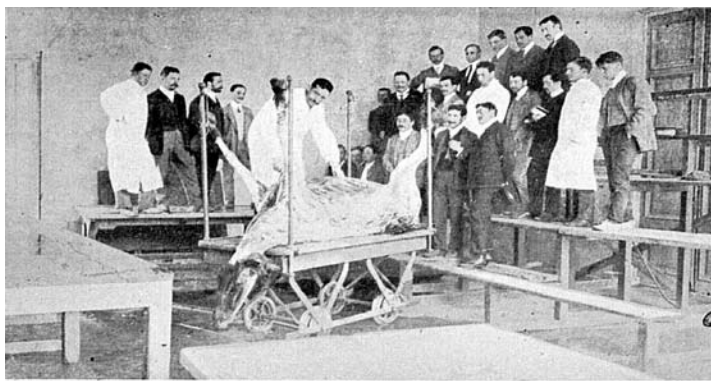


Foto de tapa: Facultad de Veterinaria (Alumnos Anatomía Patológica).

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

Prof.Dr. 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).

Impresión

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 32 n° 1, 2012

Artículos de Investigación/Research articles

**ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL ANTIBIÓTICO FOSFOMICINA EN CALOSTRO-
LECHE DE CERDAS.** STUDY OF THE DISTRIBUTION OF FOSFOMYCIN ANTIBIOTIC IN
SOWS COLOST. Fernández Paggi MB, Soraci AL, Tapia MO, Amanto FA 5-10

**RELACIÓN MÚSCULO-HUESO EN RATONES ADULTOS DE UNA POBLACIÓN SEGRE-
GANTE DISCRIMINADOS POR SU CONFORMACIÓN CORPORAL EN TRES EDADES**
MUSCLE-BONE RELATIONSHIP IN ADULT MICE OF A SEGREGATING POPULATION
DISCRIMINATED FOR THEIR BODY CONFORMATION AT THREE AGES. Pippa C, Silva
P, Font MT, Di Masso RJ 11-17

**EFFECTO DE DIFERENTES ÉSTERES DE ESTRADIOL UTILIZADOS PARA SINCRONIZAR
LA OVULACIÓN SOBRE EL PORCENTAJE DE PREÑEZ A LA IATF EN VACAS ANGUS**
EFFECT OF DIFFERENT ESTERS OF ESTRADIOL USED TO SYNCHRONIZE OVULATION
ON PREGNANCY RATE TO FTAI IN ANGUS COWS. Veiga P, Chayer R, Uslenghi G, Montiel
J, Callejas S 18-21

Comunicaciones breves/Short communications

**LESIONES MUSCULOESQUELETICAS CATASTRÓFICAS EN MIEMBROS POSTE-
RIORES ESTUDIO DE CASOS EN CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERAS EN EL
HIPODROMO “LA RINCONADA” CARACAS, VENEZUELA.** CATASTROPHIC MUSCU-
LOSKELETAL INJURY IN LEG CASE STUDY IN THOROUGHBRED RACE HORSES IN
THE RACECOURSE “LA RINCONADA” CARACAS, VENEZUELA. Morales A, García F,
Villoria D, Leal L, Gomez M 22-24

**GASTRIC NODULES WITH *Neospora caninum* ZOOITES IN A CONFIRMED CLINI-
CAL NEOSPORA CANINUM INFECTION IN A DOG.**
NÓDULOS GÁSTRICOS CON NEOSPORA EN UN CANINO. Gomez F, Massone A, Mouras
F, Basso W, Schares G, del Amo A 25-28

**SEVERED HEMOPARASITOSIS COMPLICATED IN A THOROUGHBRED HORSES
FROM VENEZUELA.** HEMOPARASITOSIS SEVERA COMPLICADA EN UN PURA SAN-
GRE DE CARRERAS EN VENEZUELA. Villoria D, Andrea J, Leal L, García F, Morales A. 29-32

Revisiones/Review

INTERÉS DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN CARDIOLOGÍA VETERINARIA
INTEREST OF THE NATRIURETIC PEPTIDES IN VETERINARY CARDIOLOGY. Meder AR,
Adagio LM, Desmaras EA, Arauz MS 33-43

BIOFILMS BACTERIANOS. BACTERIAL BIOFILMS. Meneses ML, Landoni MF 44-49

**INTERRUPCIÓN DE LA GESTACIÓN EN LA GATA DOMÉSTICA: ACTUALIZACIÓN BI-
BLIOGRÁFICA.** PREGNANCY TERMINATION IN THE QUEEN: UPDATE. García Mitacek
MC, Stornelli MC, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, Williams SI, de la Sota RL, Stornelli MA 50-56

**STOCHASTIC ESTIMATION FOR SEROPREVALENCE OF INFECTIOUS LARYNGO-
TRACHEITIS VIRUS IN BROILERS IN URUGUAY.** ESTIMACION ESTOCASTICA DE LA
SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA EN POLLOS
PARRILLEROS DE URUGUAY. Trenchi G, Suzuki K, Corva SG, Rodríguez G, Trenchi H,
Petruccelli M 57-60

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DEL ANTIBIÓTICO FOSFOMICINA EN CALOSTRO-LECHE DE CERDAS

Fernández Paggi MB^{1,2,3}, Soraci AL^{1,4}, Tapia MO^{1,4}, Amanto FA²

¹ Área Toxicología, Dpto. de Fisiopatología, Fac. Cs. Veterinarias, UNCPBA-Tandil

² Área Producción Porcina, Dpto. de Producción Animal, Fac. Cs. Veterinarias, UNCPBA-Tandil

³ CIC, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

⁴ CONICET, Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

RESUMEN: El uso de antibióticos (ATB) por vía sistémica en cerdas en producción durante el peri-parto es una práctica frecuente y poco racional, la cual se realiza con el objetivo de “disminuir la carga bacteriana” a la cual van a ser sometidos los lechones neonatos. No existe en la bibliografía estudios sobre la distribución de ATB en calostro o leche de cerda. El objetivo del trabajo fue estudiar la distribución del ATB fosfomicina disódica (FOS) en calostro y leche de cerda. FOS fue analizada por HPLC MS-MS. Las concentraciones de FOS tuvieron un rango máximo y mínimo de $1,60 \pm 0,89$ y $0,34 \pm 0,16$ $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. El consumo promedio de fosfomicina de la camada fue de $0,27$ mg/kg equivalente a $1,35$ % de la dosis terapéutica oral de fosfomicina en cerdos. El porcentaje promedio de dosis de fosfomicina eliminada por calostro fue de $1,8$ %. Dicho ATB podría ser utilizado en la cerda durante el parto-lactancia con cierta seguridad para el lactante. No obstante, se debería analizar el verdadero impacto de las concentraciones de FOS obtenidas en calostro para determinar los efectos de la droga sobre la implantación de la microbiota intestinal del lechón lactante.

PALABRAS CLAVES: calostro, fosfomicina, lechón, microbiota

STUDY OF THE DISTRIBUTION OF FOSFOMYCIN ANTIBIOTIC IN SOWS COLOSTRUM

ABSTRACT: The use of antibiotics (ATB) in sows during peripartum is a common practice in commercial pig farms. The aim of this practice is to reduce the bacterial load at which the suckling piglet will be exposed at birth. In the bibliography, there are not any studies on the distribution of fosfomicin in colostrum and milk sow. In this work we focus on the study of the distribution of disodium-fosfomicin antibiotic in colostrum and milk sow. Fosfomicin (FOS) concentrations were analyzed by HPLC MS-MS method. Colostral concentration shows a range of 1.60 ± 0.89 and 0.34 ± 0.16 $\mu\text{g/ml}$ between farrow and 10 h after the birth of the first piglet. The average consumption of litter fosfomicin was 0.27 mg/kg, equivalent to 1.35 % of the oral therapeutic dose in pigs. The percentage of IM dose of fosfomicin eliminated by colostrum was 1.8 %. Also, disodium-fosfomicin could be used during farrow-lactation in the sow with some safety measures for piglet suckling. However, the impact of the concentrations of FOS in colostrum should be analyzed to determine the effects of the drug on the intestinal microbiota implantation of the suckling piglet.

KEY WORDS: colostrum, fosfomicin, piglet, microbiota

Fecha de recepción: 01/11/12

Fecha de aprobación: 30/07/12

Dirección para correspondencia: Fernández Paggi, Ma. Belén. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, CP 7000, Buenos Aires, Argentina.

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

INTRODUCCIÓN

Una de las prácticas habituales y poco racionales realizadas en granjas comerciales de cerdos, es la administración “profiláctica” de antimicrobianos vía sistémica (particularmente vía intramuscular (IM)) a la cerda en el día o días previos al parto. El argumento de esta técnica es “disminuir la carga bacteriana” a la cual serán expuestos los lechones al nacimiento. Dicha práctica irracional favorece la subdosificación de los animales exponiendo a las bacterias a concentraciones subterapéuticas beneficiando el desarrollo de resistencia, sin tener en consideración la importancia del pasaje de concentraciones antibióticas a calostro y/o leche y el potencial impacto sobre el equilibrio y la salud intestinal del lechón lactante.

Dado que la leche de cerda no es una matriz biológica destinada al consumo humano en forma directa o indirecta a través de subproductos, existen muy pocos trabajos científicos en la bibliografía internacional sobre la distribución calostrual-láctea de antimicrobianos, como la disponible en bovinos de leche, ovinos y caprinos (1, 2, 3). Por tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar las concentraciones del antibiótico fosfomicina en calostro-leche, luego de la administración IM a cerdas durante el período de peri-parto.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ANIMALES-ALIMENTACIÓN-MANEJO

El trabajo experimental se desarrolló en una granja comercial ubicada en el partido de Tandil, Provincia de Buenos Aires. La explotación esta organizada de manera intensiva, en confinamiento total, con ciclo completo en un solo sitio y cuenta con 400 hembras en producción. Para el presente estudio se utilizaron nueve (n: 9) cerdas que no habían recibido antibióticos un mes antes del ensayo, de una misma línea genética, las cuales fueron seleccionadas atendiendo a los siguientes criterios productivos: 2.4 partos por cerda por año, >22 lechones destetados por cerda por año, >27 cerdos nacidos vivos por cerda por año. Las cerdas fueron alojadas en parideras de hierro en salas de maternidad. Las mismas fueron ingresadas 4 días previos al parto y se mantuvieron allí durante 21 días, hasta el destete de sus respectivos lechones.

Durante toda la gestación, las cerdas fueron alimentadas con un alimento comercial en base a “Fase gestación” de 3,0 Mcal EM/kg y 14% de proteínas. Para la lactación se utilizó alimento comercial “Fase lactancia” de 3,2 Mcal EM/kg y 16% de proteínas.

Las hembras fueron inducidas al parto a los 114 días con 1 ml de prostaglandina vía IM. Al mismo tiempo, se administró fosfomicina disódica (98% pureza Sigma-Aldrich®, solubilizada en Sol.

fisiológica), vía IM a razón de 15 mg/kg P.V. Se tomaron muestras de calostro y de leche (pool de 8 ml/cerda) de las mamas de la sección media en tubos de polipropileno (50 ml) inmediatamente después del parto (0) y a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 48 h post parto. Las muestras fueron almacenadas en freezer hasta ensayo (-80 °C).

2.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FOSFOMICINA

Las muestras de calostro y de leche fueron descongeladas a temperatura ambiente de laboratorio (21 °C) y posteriormente homogeneizadas en vortex durante 30 seg. Un (1) ml de calostro fue colocado en tubos de polipropileno, previamente rotulados y sometidos a una doble extracción líquido-líquido mediante el agregado de 6 ml de acetato de etilo. Los tubos fueron agitados durante 20 minutos (agitador automático), centrifugados a 2500 rpm a 4 °C durante 5 minutos y congelados en freezer. En cada extracción la fase orgánica fue descartada. Se agregó 1 ml de metanol a la fase acuosa con el objetivo de precipitar las proteínas hidrosolubles presentes en la misma. Las muestras fueron sometidas a vortex (30 seg) y centrifugadas a 9000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido fue filtrado mediante el uso de filtros de jeringa de 0,22 µm. Finalmente 100 µl del filtrado fueron diluidos (1/10) con agua HPLC des-ionizada e inyectados en el HPLC MS-MS (4, 5).

Para la realización de la curva de calibración se utilizó calostro proveniente de 5 cerdas controles (libres de antibióticos), recolectado inmediatamente después del parto. Estas hembras fueron mantenidas en iguales condiciones experimentales que las cerdas tratadas. Fudosteína fue adicionado en concentraciones conocidas a las muestras y utilizado como estándar interno. La curva de validación contempló 6 concentraciones por quintuplicado en un rango de 0.1 a 10 µg/ml. A partir de las mismas se determinó la homogeneidad de la linealidad (Test de Hartley). El límite de cuantificación fue calculado por sextuplicado tomando la última concentración (0,1 µg/ml) de la curva de validación. El porcentaje de extracción fue calculado en 3 concentraciones de la curva de validación (10, 5 y 0,1 µg/ml). Así mismo se calculó las variaciones inter día e intra día. La interferencia fue determinada por sextuplicado de extracto blanco de calostro libre de fosfomicina.

Las muestras se procesaron bajo la misma metodología descripta para la extracción y purificación de fosfomicina. Se utilizó un equipo HPLC MS/MS Thermo Inc. con inyector automático termostatzado a 14 °C, con bomba de gradiente cuaternario. La fase móvil estuvo compuesta por acetonitrilo:agua 20:80, trabajando en modo isocrático a un flujo de 250 µl/min.

La separación cromatográfica se realizó en una columna Phenomenex de fase CN, tamaño de partícula 5 µm, 4,6 mm de diámetro interno y 75 mm de largo, en horno a 30 °C. El volumen de inyección fue de 20 µl y el tiempo de corrida para una muestra fue de 6 minutos. La detección de fosfomicina fue realizada por un analizador-detector de triple cuádruplo, marca Thermo (TSQ Quantum). La fuente de iones fue ESI trabajando en modo negativo. La detección se realizó utilizando SRM para las transiciones 137 -> 79 y 178 -> 91 de fosfomicina y fudosteína respectivamente. Los iones precursores de m/z 137 y 178 fueron seleccionados en el primer cuádruplo (Q1). Luego de la fragmentación inducida por colisión con gas argón en Q2, los iones productos de m/z 79 y 91 fueron monitoreados en Q3.

Los parámetros de validación de fosfomicina en leche y calostro fueron determinados acorde a las exigencias de las guías internacionales (6).

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de concentraciones del antibiótico fueron presentados como medias ± 1 desvío estándar. El Test de Hartley fue utilizado para el análisis de homogeneidad de varianzas de las curvas de calibración de fosfomicina. Los parámetros farmacocinéticos de área bajo la curva (AUC), concentración máxima (C_{max}) y vida media (T_{1/2}) fueron calculados mediante el empleo del software PK Solutions 2.0 (Summit Research Services, Asland, OH, USA).

2.4 ESTIMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CALOSTRO-LECHE EN CERDAS Y DE LA CANTIDAD MEDIA DE CALOSTRO INGERIDA POR CAMADA

Un sistema de video-grabación continua (PSS, Pro Surveillance System®) fue montado en la sala de maternidad un día antes del parto de cada cerda. Todos los lechones provenientes de cada cerda en ensayo fueron numerados y pesados inmediatamente al parto y a las 24 h de nacidos. Por medio del sistema de video-grabación se determinó, para cada lactante, el intervalo de tiempo entre el nacimiento y el comienzo de masaje de mama, toma de pezón y mamada efectiva. Los datos obtenidos fueron incorporados a un programa previamente diseñado en una hoja de cálculo (programa Microsoft Excel®), acorde a la metodología descrita por Devillers et al. (2005) (7), y de esta manera fueron calculadas la producción de calostro-leche para cada cerda y el consumo de calostro-leche de los lechones de cada camada. La producción total de calostro-leche de las hembras se obtuvo a partir de la suma del consumo de calostro y leche de cada lechón durante las primeras 24 h luego del parto.

Fórmula de Devillers et al.

$$C = -217.4 + 0.217 \times t + 1861019 \times BW/t + BWb \times (54,80 - 1861019/t) \times (0,9985 - 3.7 \times 10^{-4} \times tf + 6,1 \times 10^{-7} \times tf^2).$$

Tabla 1. Producción de calostro-leche en cerdas y consumo de calostro-leche promedio/camada.
Table 1. Colostrum and milk production in sows. Average colostrum intake and milk for litter.

Parámetros	Cerda 1	Cerda 2	Cerda 3	Cerda 4	Cerda 5	Cerda 6	Cerda 7	Cerda 8	Cerda 9	Media	1 ± SD
Producción calostro-leche/24 h (ml)	3781	2902	4758	2973	1223	2923	4906	973	1851	2921	1408
Consumo promedio calostro-leche por camada/24 h (ml)	252.1	371.6	366.0	300.7	308.5	290.1	446.0	104.8	243.3	294.2	105.6

En la tabla 2 se presentan las concentraciones de fosfomicina (µg/ml) en calostro en función del tiempo, obtenidas luego de la administración IM de 15 mg/kg de fosfomicina disódica en cerdas durante el peri parto.

Tabla 2. Concentraciones individuales y promedio de fosfomicina (n: 9)
NC: no cuantificable (0.1 µg/ml)
Table 2. Fosfomycin individual concentrations and average (n: 9).
NC: lower limit of quantification (0.1 µg/ml)

Tiempo (h)	Media (µg/ml)	1 ± SD
0	1.60	0.89
2	1.10	0.58
4	1.02	0.52
6	0.75	0.40
8	0.73	0.43
10	0.54	0.16
12	NC	NC

En la tabla 3 se presentan los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de las concentraciones calostrales de fosfomicina luego de su administración a razón de 15 mg/kg en cerdas durante el peri-parto.

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos de fosfomicina en calostro.
Table 3. Pharmacokinetic parameters of fosfomycin in colostrum.

Parámetros	Calostro
AUC ₀₋₁ µg.h/ml	9.10 ± 1.43
C _{max} µg/ml	1.60 ± 0.89
T _{1/2} h	1.80 ± 0.37

La ecuación está basada en el peso corporal en kg del lechón al nacimiento (BWb), el peso corporal en kg a las 24 h post nacimiento (BW), el intervalo entre mamadas efectivas en minutos (tf) y la edad en minutos a las 24 h de nacido ($t = 1400$ minutos). Los diferentes valores que apa-

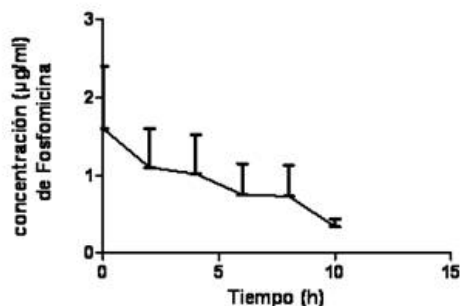


Fig. 1. Evolución del perfil calostroal de fosfomicina en cerdas.
Fig. 1. Evolution profile of fosfomicin in sows.

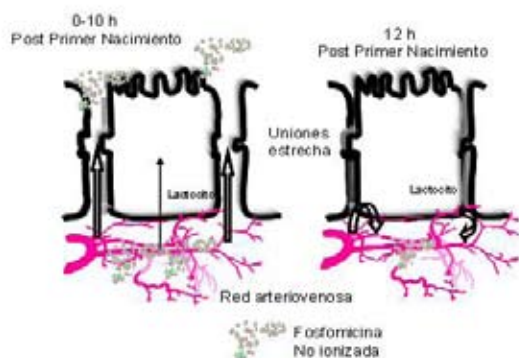


Fig. 2. Representación esquemática del pasaje de fosfomicina a calostro.
Fig. 2. Schematic representation of fosfomicin passage in colostrum.

recen en la fórmula son constantes calculadas por el autor.

RESULTADOS

La utilización de un sistema de análisis de triple cuádruplo asegura selectividad y sensibilidad en la detección de fosfomicina. En las condiciones operatorias seleccionadas, el efecto de la supresión de iones no implica modificaciones analíticas a los tiempos de retención del antibiótico. La cuantificación fue lineal ($r^2: 0.9995$) a los rangos de concentraciones de ensayo y el estudio estadístico aplicado a la linealidad (Test de Hartley) demostró que las varianzas fueron homogéneas. La metodología fue precisa con una exactitud de ER menor a 2 %. El porcentaje de recuperación de los analitos en los diferentes niveles de concentración estuvo dentro del rango 94,9-106,2 % acorde con los criterios de aceptación de las guías internacionales (6). El límite de cuantificación en leche y calostro fue establecido a 0,1 µg/ml.

En la tabla 1 se muestra la producción individual y promedio de calostro-leche en cerdas y el consumo promedio de calostro-leche en cada camada.

En la Fig. 1 se muestra el perfil de las concentraciones calostrales promedio en función del tiempo, obtenidas luego de la administración IM de 15 mg/kg de fosfomicina disódica en cerdas durante el peri-parto.

DISCUSIÓN

El calostro de cerda es un fluido dinámico cuya composición evoluciona rápidamente en el curso de las horas siguientes al inicio del primer nacimiento, para transformarse progresivamente en leche a las 24 horas. Esa dinámica calostroal, fuertemente asociada a cambios hormonales y/o morfo-fisiológicos de la glándula mamaria, puede afectar la cinética de distribución de antibióticos administrados a la cerda en momentos del peri-parto (8). En el presente estudio la producción de calostro-leche de cada cerda y el consumo de calostro-leche/camada fueron de 2921 ± 1408 y $294,2 \pm 105,6$ ml respectivamente. Dichos valores fueron similares a los reportados por Devillers et al. (2005) y Le Dividich et al. (2004) (7, 8). La amplia variación de producción de calostro y leche de la cerda es un hallazgo común ya que la producción de dichos fluidos es dependiente de una amplia variedad de factores fisiológico-productivos intervinientes (producción de hormonas, tamaño y característica de la camada, situaciones inherentes al momento del parto (duración), entre otros) (7, 8, 9). Las concentraciones calostrales mostraron un rango de $1,60 \pm 0,89$ a $0,34 \pm 0,16$ µg/ml entre el parto y 10 h posteriores al primer nacimiento de la camada respectivamente, para caer por debajo del límite de cuantificación de fosfomicina ($0,1$ µg/ml) a las 12 h post primer nacimiento (AUC0-t: $9,1 \pm 1,43$ µg h/ml). El porcentaje promedio de dosis de fosfomicina eliminada por calostro fue de 1,8 %, calculado a partir de la dosis administrada a las cerdas (15 mg/kg PV) y el consumo promedio de fosfomicina por kg de lechón ($0,27$ mg/kg).

Es importante destacar que luego de la inducción de los partos (momento en que se administró la fosfomicina), hasta el primer nacimiento (primera muestra de calostro obtenida), transcurrió un lapso de aproximadamente 12 h. A dicho tiempo, las concentraciones calostrales obtenidas se corresponden con los últimos valores de concentraciones plasmáticas observados luego de la administración de 15 mg/kg por la vía IM en cerdos (rango de concentraciones plasmáticas 1,5-0,5 µg/ml) (4). En el presente estudio no se consideró la posibilidad de extraer muestras seriales de sangre de las cerdas en parición ya que el estrés (el cerdo es la especie productiva más sensible y con mayor memoria de estrés) (10, 11, 12) inducido por las maniobras de inmovilización y toma serial de sangre durante el parto, modifica considerablemente el mismo, la producción y disposición de calostro-leche (10) y por ende el

objetivo central del estudio.

El comportamiento de la distribución calostrual de fosfomicina observado puede encontrar respuesta en las características fisicoquímicas, liposolubilidad y difusibilidad de este antibiótico y en los aspectos morfo-funcionales plasmáticos-mamarios de la cerda (7). La fosfomicina es un antibiótico hidrosoluble que posee un pKa de 6,7, un bajo peso molecular (PM de 137), una insignificante unión a proteínas plasmáticas y tisulares (13), con un moderado a bajo volumen de distribución (Vd ml/kg 273,00 ± 40,70) y un rápido clearance corporal en cerdos (131,50 ± 30,07 ml/kg/h) (4).

El principal mecanismo de pasaje a través de las membranas biológicas descrito para fosfomicina es la difusión pasiva de la fracción libre (no unida a proteínas) y no ionizada de la molécula. En el estadio fisiológico de peri-parto - inicio de lactación, la difusión pasiva de fármacos se encuentra fuertemente facilitada por la apertura temprana de las uniones estrechas de los lactocitos hormonalmente modificadas (8, 9, 14, 15, 16, 17). Ello explicaría entonces, las concentraciones más altas determinadas al momento del parto. La relación pKa de fosfomicina (pKa 6,7) y de pH del fluido calostrual (pH 6,9) haría que el 50 % de fracción se encuentre no ionizada y en equilibrio con el plasma, no existiendo fenómeno de ión trapping. El perfil plasmático y el comportamiento farmacocinético de fosfomicina observado luego de su administración intramuscular ($T_{1/2}$: 1,85 ± 0,19 h ; CL: 131,50 ± 30,07 ml/kg/h) (4) sumado a un progresivo cierre de las uniones estrechas entre las células epiteliales mamarias, asociado a cambios hormonales (aumento de cortisol, prolactina y caída de la progesterona), acontecidos en las siguientes primeras horas post parto (7, 8, 9), disminuiría la penetración de fosfomicina en este fluido, no encontrando concentraciones cuantificables para dicho antibiótico en ninguna cerda sometida a tratamiento a las 12 h post primer nacimiento (ver Fig. 2).

En función de las concentraciones de fosfomicina obtenidas en el calostro, se podría hacer una estimación teórica sobre el potencial impacto de dicho antibiótico en la microbiota del lactante (18, 19) a partir de la siguiente fórmula:

Dosis Antibiótico recibida por el lactante:

Concentración del Antibiótico en calostro x Volumen de calostro o leche ingerido (19)

La cantidad media de calostro ingerida por lactante (con un peso promedio de peso 1,5 kg) fue de 294,2 g/kg PV, lo que hace un consumo promedio por animal de 441,3 g de calostro. Si referimos las concentraciones calostruales de fosfomicina obtenidas durante 10 h en nuestro ensayo, con el consumo promedio total de calostro, la

dosis promedio ingerida del antibiótico/lactante sería de 0,27 mg/kg. Ello representa un 1,35 % de una dosis terapéutica oral (20 mg/kg).

Finalmente se podría estimar que, teniendo en cuenta los máximos y mínimos de las concentraciones promedio obtenidas (máx: 1,60 ± 0,89 y min: 0,34 ± 0,16, respectivamente) y un consumo de calostro promedio/h de 44,1 g, los primeros lechones nacidos dentro de la hora, serán sometidos a mayores concentraciones de fosfomicina (alrededor de 70,56 µg totales), con respecto a los nacidos más tardíamente.

En conclusión podríamos decir que la distribución de fosfomicina a fluido mamario luego de la administración IM de 15 mg/kg, es baja, abarcando 10 h del periodo calostrual (AUC0-t: 9,1 ± 1,43 µg h/ml). Dichas concentraciones se mantuvieron por encima de la CIM durante más de 8 h para bacterias patógenas de importancia productiva e involucradas en procesos infecciosos de mastitis y/o metritis (20) (*E. coli* y *Streptococcus* sp. CIM90: 0,25-0,5 µg/ml respectivamente) (21). Ello indicaría que la fosfomicina podría ser utilizada en procesos infecciosos bacterianos en la cerda durante el peri-parto-lactancia. No obstante, sería totalmente irracional su administración preventiva, ya que por un lado, las concentraciones residuales de fosfomicina halladas en calostro, podrían inducir desequilibrios sobre una microbiota incipiente en fase de colonización gastrointestinal en el lactante (4, 18, 19). Por otro lado, existen sospechas muy fundadas de que la excreción de antibióticos y/o sus metabolitos activos ejercen presión de selección sobre la flora bacteriana comensal, generando un "reservorio" de genes codificadores de resistencia, que pasan de bacteria en bacteria y pueden alcanzar, eventualmente a la población humana (22, 23). Según algunos autores, cepas bacterianas saprófitas del mismo género y especie, sometidas a diferentes grados de presión antibiótica, comparten resistencia a los mismos antibióticos (22, 24, 25). La diseminación de la resistencia a los antibióticos representa una amenaza continua, y es una de las mayores preocupaciones en el ámbito de la salud pública y de la sanidad animal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mestorino N, Landoni MF, Alt M, Errecalde JO. The pharmacokinetics of thiamphenicol in lactating cows. *Vet Res Comm* 1993; 17: 295-303
2. Mestorino N, Marchetti ML, Turic E, Pesoa J, Errecalde J. Concentrations of danofloxacin 18 % solution in plasma, milk and tissues after subcutaneous injection in dairy cows. *Anal Chim Acta* 2009; 637: 33-39
3. Lucas MF, Errecalde JO, Mestorino N. Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J Vet Pharmacol Ther* 2010; 33: 132-40

M. Fernández Paggi y col.

4. Soraci AL, Pérez DS, Martínez G, Dieguez S, Tapia MO, Amanto FA, et al. Disodium-fosfomicin pharmacokinetics and bioavailability in post weaning piglets. *Res Vet Sci* 2011; 90: 498-502
5. Soraci AL, Pérez DS, Martínez G, Dieguez S, Tapia MO, Coulsi A, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of fosfomicin in broiler chicken. *Rev Med Vet* 2011; 162: 358-363
6. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation 2001.
7. Devillers N, Le Dividich J, Farmer C, Mounier AM, Lefebvre M, Prunier A. Origine et conséquences de la variabilité de la production de colostrum par la truie et de la consommation de colostrum par les porcelets. *J Rech Porcine* 2005; 37: 435-442
8. Le Dividich J, Martineau GP, Thomas F, Demay H, Renoult H, Homo C, et al. Acquisition de l'immunité passive chez les porcelets et production de colostrum chez la truie. *J Rech Porcine* 2004; 36: 451-456
9. Farmer C. The role of prolactin for mammatogenesis and galactopoiesis in swine. *Livest Prod Sci* 2001; 70: 105-113
10. McGlone JJ, Salak JL, Lumpkin EA, Nicholson RL, Gibson M. y Norman RL. Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity and leukocyte numbers. *J Anim Sci* 1993; 71: 888-896
11. Smith CA, Ficken MD. Non-surgical cannulation of the vena cava for chronic blood collection in mature swine. *Lab Anim Sci* 1991; 41: 274-278
12. Dubreuil P, Farmer C, Couture Y, Petitclerc D. Hematological and biochemical changes following an acute stress in control and somatostatin-immunized pigs. *Can J Anim Sci* 1993; 73: 241-252
13. Kirby WM. Pharmacokinetics of fosfomicin. *Chemotherapy* 1977; 23: 141-151
14. Cregan MD, Hartmann PE. Computerized breast measurement from conception to weaning: clinical implications. *J Hum Lact* 1999; 15: 89-96
15. Fleishaker JC. Models and methods for predicting drug transfer into human milk. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 643-652
16. Pons G, Rey E. Passage des médicaments Dans le lait. *Les médicaments en périnatalogie*. Masson (Paris), 2003; p. 17-26
17. Lee KG. Lactation and drugs. *J Paediatr Child Health* 2007; 17: 68-71
18. Gremmo-Féger G, Dobrzynski M, Collet M. Allaitement maternel et médicaments. *J Gynecol Obstet Biol* 2003; 32: 466-475
19. Damase-Michel C, Rolland M, Assouline C, Tricoire J, Lacroix I. Médicaments et allaitement maternel. *EMC-Médecine* 2004; 1: 417-432
20. Martineau GP. Maladies d'élevage des porcs. Ed. France Agricole 1997; p. 174-209
21. Sumano LH, Ocampo CL, Gutierrez OL. Intravenous and intramuscular pharmacokinetics of a single-dayly dose of disodium-fosfomicin in cattle, administered for 3 days. *J Vet Pharmacol Ther* 2007; 30: 49-54
22. Levy SB. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. In *Antibiotic Resistance: Origins, evolution, selection and spread* edited by D. J. Chadwick, J. Goode. West Sussex, England: Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 207) 1997; p. 1-14
23. European Medicines Agency –EMA-. Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines 1999
24. van den Bogaard AE, London N, Driessen C, Stobbering EE. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 663-671
25. Wise R. Maximizing efficacy and reducing the emergence of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 37-42

RELACIÓN MÚSCULO-HUESO EN RATONES ADULTOS DE UNA POBLACIÓN SEGREGANTE DISCRIMINADOS POR SU CONFORMACIÓN CORPORAL EN TRES EDADES

Pippa C¹, Silva P¹, Font MT^{1,2}, Di Masso RJ^{1,2,3}

¹Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR. ²CIC-UNR.

³Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR.

RESUMEN: La hipótesis de Hooper postula que el crecimiento longitudinal de un hueso produce un aumento en la masa de los músculos que en él se insertan la que a su vez afecta el peso del hueso. Con el objetivo de caracterizar estas asociaciones se estudió la relación músculo-hueso en ratones machos y hembras pertenecientes a una población segregante (F2) derivada del cruzamiento entre dos líneas seleccionadas por conformación corporal que difieren en peso corporal pero no en la longitud de sus fémures. Los animales, dentro de sexo, se discriminaron utilizando los valores del peso corporal y de la longitud caudal registrados en el momento del destete (21 días), a la edad de selección (49 días), y los valores asintóticos de ambas variables estimados con el modelo de Gompertz. Se definieron cuatro grupos resultantes de todas las combinaciones posibles entre alta y baja biomasa y alta y baja longitud del esqueleto. El estudio del efecto del grupo de pertenencia sobre cinco indicadores de la relación músculo-hueso (peso del fémur y tibia, longitud del fémur y tibia y peso del músculo tríceps sural) determinados a los 150 días de edad permitió corroborar la hipótesis postulada por Hooper, en particular con bajos pesos corporales condición en la cual la biomasa sustentada no representa una restricción frente a la presión selectiva ejercida sobre la longitud de los huesos.

Palabras clave: fémur, tibia, tríceps sural, ratón

MUSCLE-BONE RELATIONSHIP IN ADULT MICE OF A SEGREGATING POPULATION DISCRIMINATED FOR THEIR BODY CONFORMATION AT THREE AGES

ABSTRACT: Hooper's hypothesis postulates that the longitudinal growth of bone increases the mass of the skeletal muscles inserted which in turn affects the weight of the bone. In order to characterize these associations, the muscle-bone relationship in male and female mice belonging to a segregating population (F2) derived from crossing two lines selected for body conformation that differ in body weight but not in femur length was studied. Animals, within sex, were discriminated using the individual values of body weight and skeletal length recorded at weaning (21 days), at the age of selection (49 days), and the asymptotic values of both variables estimated using the Gompertz equation. Four groups resulting from all possible combinations between high and low biomass and high and low skeleton length were defined. The study of group effect on five indicators of muscle-bone relationship (femur and tibia weight, femur and tibia length and weight of triceps surae muscle) recorded at 150 days of age allowed to corroborate the hypothesis postulated by Hooper, particularly under low body weight conditions in which the biomass sustained does not represent a constraint against the selective pressure exerted to change the length of the bones.

Key-words: fémur, tibia, triceps surae, mice

Fecha de recepción: 02/02/12

Fecha de aprobación: 02/08/12

Dirección para correspondencia: R.J. Di Masso, Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR.

E-mail: rydimasso@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El ratón de laboratorio (*Mus musculus*) es una especie ampliamente utilizada en genética del crecimiento (1). Tanto el peso corporal a una edad determinada como el aumento de peso entre dos edades dadas son dos variables de fácil medición, con buena heredabilidad y de indudable importancia en producción animal, razón por la cual ambas han sido ampliamente utilizadas como indicadores de crecimiento en las investigaciones genéticas llevadas a cabo tanto con diferentes especies de interés productivo como con ratones. Por otra parte, en esta especie, al igual que en la rata, la longitud caudal ha sido propuesta y utilizada como un estimador de la longitud del esqueleto (2) y dada su correlación con el peso corporal (3, 4, 5) la combinación de ambas variables se ha empleado para caracterizar distintas conformaciones definidas como cantidades variables de biomasa distribuidas en cuerpos de longitud también variable (6). La similitud en el control genético cuantitativo del crecimiento de músculos y huesos en ratones seleccionados por alto o bajo peso corporal llevó a Hooper (7, 8) a postular la hipótesis que el crecimiento longitudinal de un hueso produce un aumento en la masa de los músculos que en él se insertan y que esa mayor masa se refleja, a su vez, en un mayor peso del hueso. La contrastación empírica de esta hipótesis utilizando como material biológico ratones seleccionados en forma divergente en sentido contrario a la correlación genética positiva entre el peso corporal y la longitud caudal (selección disruptiva antagónica), permitió postular que dicha relación músculo-hueso podía ser alterada genéticamente de manera tal de aumentar la longitud de los huesos seleccionando animales por esqueleto largo y evitar la respuesta correlacionada esperada sobre el peso del músculo seleccionando simultáneamente por bajo peso corporal (9).

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de esta asociación se estudió la relación músculo-hueso a la edad adulta en ratones de una población segregante (F2) derivada del cruzamiento entre dos líneas producto de un experimento de selección divergente antagónica por conformación corporal (CBi/C: alto peso-esqueleto corto, CBi/L: bajo peso-esqueleto largo), que difieren en su biomasa pero no en la longitud de sus huesos (10).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratones pertenecientes a una población segregante (F2) derivada de los cruza- mientos recíprocos entre dos líneas seleccionadas por conformación corporal (CBi/L: baja biomasa-esqueleto largo y CBi/C: alta biomasa-esqueleto corto) (11) que difieren en peso corporal (Media \pm error estándar - CBi/L - Machos: 32,0 g \pm 0,39,

Hembras: 25,6 g \pm 0,21; CBi/C - Machos: 51,7 g \pm 0,82, Hembras: 47,6 g \pm 0,98) pero no en la longitud de sus fémures (Media \pm error estándar - CBi/L - Machos: 16,8 mm \pm 0,08, Hembras: 17,0 mm \pm 0,07; CBi/C - Machos: 16,7 mm \pm 0,06, Hembras: 17,2 mm \pm 0,06), generada en el marco de un proyecto de identificación de QTLs relacionados con el crecimiento dimensional.

Todos los animales provenían de camadas estandarizadas a ocho crías al momento del nacimiento y se criaron en grupos de seis individuos del mismo sexo en cajas de polipropileno (32x24x10 cm), provistas con viruta de madera, a partir del destete. Durante todo el experimento recibieron agua y alimento balanceado (Cargill Rata-Ratón) *ad libitum* y se mantuvieron en un ambiente controlado con una temperatura de 23 \pm 1 °C y un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

A los 150 días de edad 328 machos y 332 hembras se sacrificaron por exposición al CO₂. Inmediatamente después del sacrificio se les extrajo el músculo tríceps sural (sóleo y gemelos) derecho e izquierdo y se registró su peso en balanza de precisión con aproximación a la décima de miligramo. Posteriormente se extrajeron los fémures y las tibias de ambos miembros, se los limpió a mano para despojarlos de todos los restos musculares, se los pesó en balanza de precisión con aproximación a la décima de miligramo y se midió su longitud con un calibre con aproximación al mm.

Los animales de cada sexo se categorizaron por separado en cuatro grupos correspondientes a cada uno de los cuatro cuadrantes del plano cartesiano definido por los valores del peso corporal (abscisa) y la longitud caudal (ordenada) [Cuadrante I: alta biomasa/esqueleto largo; Cuadrante II: baja biomasa/esqueleto largo; Cuadrante III: baja biomasa/esqueleto corto y Cuadrante IV: alta biomasa/esqueleto corto], utilizando tres criterios. El primer criterio utilizó los valores del peso corporal (g) y de la longitud caudal (cm) registrados en el momento del destete (edad temprana: 21 días de edad). El segundo criterio utilizó los valores de las mismas variables pero determinados a la edad de selección (49 días). El tercer criterio utilizó los estimadores de peso corporal asintótico y longitud caudal asintótica derivados del ajuste de los datos longitudinales peso corporal-edad cronológica y longitud caudal-edad cronológica con la función sigmoidea de Gompertz. En cada caso se consideró como alta biomasa y como esqueleto largo a los valores de cada una de estas dos variables mayores a sus respectivos promedios en la población F2; y como baja biomasa y como esqueleto corto los valores menores a los promedios correspondientes.

El efecto del grupo de pertenencia (cuadrante) sobre cada uno de los cinco indicadores

Tabla 1 – Relación músculo hueso en machos de una población segregante de ratones discriminados por su conformación corporal al destete (21 días)

	Cuadrante			
	I (n = 125)	II (n = 39)	III (n = 125)	IV (n = 37)
	alta biomasa esqueleto largo 14,6 g ± 0,09a 7,7 cm ± 0,03a	baja biomasa esqueleto largo 12,5 g ± 0,08b 6,9 cm ± 0,03b	baja biomasa esqueleto corto 11,5 g ± 0,10c 6,2 cm ± 0,03b	alta biomasa esqueleto corto 14,0 g ± 0,11d 6,4 cm ± 0,04b
Longitud del fémur (mm)	16,69 a ± 0,035	16,62 ab ± 0,060	16,46 b ± 0,033	16,65 a ± 0,066
Longitud de la tibia (mm)	18,22 a ± 0,031	18,17 a ± 0,055	17,93 b ± 0,033	18,08 ab ± 0,050
Peso del fémur (g)	0,1065 a ± 0,00071	0,1037 ab ± 0,00115	0,1010 b ± 0,00074	0,1057 a ± 0,00100
Peso de la tibia (g)	0,0742 a ± 0,00053	0,0741 a ± 0,00121	0,0734 a ± 0,00108	0,0731 a ± 0,00074
Peso del músculo (g)	0,2451 a ± 0,00174	0,2369 ab ± 0,00342	0,2284 b ± 0,00181	0,2428 a ± 0,00276
Todos los valores corresponden al promedio ± error estándar abc Valores con diferente letra difieren al menos al 5%				

Tabla 2. Relación músculo hueso en hembras de una población segregante de ratones discriminadas por su conformación corporal al destete (21 días)

	Cuadrante			
	I (n = 132)	II (n = 34)	III (n = 131)	IV (n = 35)
	alta biomasa esqueleto largo 14,2 g ± 0,08a 7,2 cm ± 0,03a	baja biomasa esqueleto largo 12,1 g ± 0,11b 6,9 cm ± 0,03b	baja biomasa esqueleto corto 11,3 g ± 0,10c 6,1 cm ± 0,03c	alta biomasa esqueleto corto 13,6 g ± 0,11d 6,2 cm ± 0,08c
Longitud del fémur (mm)	17,06 a ± 0,035	16,99 ab ± 0,066	16,92 b ± 0,031	16,88 ab ± 0,055
Longitud de la tibia (mm)	18,72 a ± 0,025	18,66 ab ± 0,050	18,53 b ± 0,025	18,58 ab ± 0,043
Peso del fémur (g)	0,0982 a ± 0,00060	0,0970 a ± 0,00123	0,0960 a ± 0,00062	0,0962 a ± 0,00126
Peso de la tibia (g)	0,0667 a ± 0,00044	0,0662 ab ± 0,00080	0,0644 b ± 0,00040	0,0649 ab ± 0,00081
Peso del músculo (g)	0,1968 a ± 0,00157	0,1951 ab ± 0,00232	0,1894 b ± 0,00127	0,1918 ab ± 0,00290
Todos los valores corresponden al promedio ± error estándar abc Valores con diferente letra difieren al menos al 5%				

Tabla 3. Relación músculo hueso en machos de una población segregante de ratones discriminados por su conformación corporal a la edad de selección (49 días)

	Cuadrante			
	I (n = 80)	II (n = 67)	III (n = 97)	IV (n = 84)
	alta biomasa esqueleto largo 37,9 g ± 0,17a 10,4 cm ± 0,04a	baja biomasa esqueleto largo 34,3 g ± 0,18a 10,3 cm ± 0,03a	baja biomasa esqueleto corto 43,6 g ± 0,16b 9,4 cm ± 0,03b	alta biomasa esqueleto corto 37,9 g ± 0,16a 9,6 cm ± 0,03b
Longitud del fémur (mm)	16,82 a ± 0,039	16,68 a ± 0,038	16,37 b ± 0,040	16,49 b ± 0,036
Longitud de la tibia (mm)	18,27 a ± 0,035	18,21 a ± 0,042	17,89 b ± 0,030	17,97 b ± 0,044
Peso del fémur (g)	0,1098 a ± 0,00068	0,1019 b ± 0,00078	0,0976 c ± 0,00071	0,1065 d ± 0,00074
Peso de la tibia (g)	0,0770 a ± 0,00100	0,0736 a ± 0,00116	0,0732 a ± 0,00144	0,0728 a ± 0,00057
Peso del músculo (g)	0,2499 a ± 0,00207	0,2359 b ± 0,00185	0,2255 c ± 0,00174	0,2359 b ± 0,00248
Todos los valores corresponden al promedio ± error estándar abc Valores con diferente letra difieren al menos al 5%				

Tabla 4. Relación músculo hueso en hembras de una población segregante de ratones discriminadas por su conformación corporal a la edad de selección (49 días)

	Cuadrante			
	I (n = 86)	II (n = 84)	III (n = 85)	IV (n = 71)
	alta biomasa esqueleto largo 31,3 g ± 0,13a 10,0 cm ± 0,03a	baja biomasa esqueleto largo 27,9 g ± 0,14b 9,9 cm ± 0,03a	baja biomasa esqueleto corto 27,8 g ± 0,15b 9,2 cm ± 0,03b	alta biomasa esqueleto corto 31,1 g ± 0,16a 9,3 cm ± 0,03b
Longitud del fémur (mm)	17,02 a ± 0,043	17,04 a ± 0,048	16,90 a ± 0,035	16,97 a ± 0,044
Longitud de la tibia (mm)	18,68 a ± 0,027	18,71 a ± 0,036	18,53 b ± 0,031	18,60 ab ± 0,036
Peso del fémur (g)	0,0967 a ± 0,00076	0,0970 ab ± 0,00091	0,0947 b ± 0,00064	0,0978 ac ± 0,00087
Peso de la tibia (g)	0,0668 a ± 0,00051	0,0658 ab ± 0,00058	0,0639 b ± 0,00044	0,0658 ab ± 0,00062
Peso del músculo (g)	0,1973 a ± 0,00157	0,1945 ab ± 0,00263	0,1887 b ± 0,00149	0,1920 ab ± 0,00175
Todos los valores corresponden al promedio ± error estándar abc Valores con diferente letra difieren al menos al 5%				

Tabla 5 – Relación músculo hueso en machos de una población segregante de ratones discriminados por su conformación corporal en la asintota de su crecimiento dimensional

	Cuadrante			
	I (n = 84)	II (n = 76)	III (n = 85)	IV (n = 79)
	alta biomasa esqueleto largo 44,4 g ± 0,17a 11,1 cm ± 0,04a	baja biomasa esqueleto largo 40,7 g ± 0,15b 11,1 cm ± 0,03a	baja biomasa esqueleto corto 39,9 g ± 0,21c 10,3 cm ± 0,04b	alta biomasa esqueleto corto 44,6 g ± 0,19d 10,3 cm ± 0,03b
Longitud del fémur (mm)	16,81 a ± 0,041	16,67 ac ± 0,037	16,35 b ± 0,039	16,55 c ± 0,039
Longitud de la tibia (mm)	18,24 a ± 0,037	18,21 a ± 0,040	17,87 b ± 0,032	18,04 c ± 0,043
Peso del fémur (g)	0,1090 a ± 0,00074	0,1029 b ± 0,00081	0,0974 c ± 0,00079	0,1066 a ± 0,00070
Peso de la tibia (g)	0,0759 a ± 0,00099	0,0742 a ± 0,00121	0,0678 a ± 0,00061	0,0795 a ± 0,00063
Peso del músculo (g)	0,2468 a ± 0,00240	0,2361 b ± 0,00179	0,2248 c ± 0,00181	0,2408 ab ± 0,00236
Todos los valores corresponden al promedio ± error estándar abc Valores con diferente letra difieren al menos al 5%				

de la relación músculo-hueso (peso del fémur, peso de la tibia, longitud del fémur, longitud de la tibia y peso del músculo tríceps sural) se evaluó, dentro de sexo, con un análisis de la variancia a un criterio de clasificación seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni (12)

RESULTADOS

La discriminación de los animales por los valores del peso corporal y de la longitud caudal medidos al destete (Tablas 1 y 2) mostró un amplio predominio de individuos en los cuadrantes I y III que corresponden a asociaciones entre ambas variables en el mismo sentido que la co-

relación positiva entre ellas (Machos: 250/326 = 76,7%; Hembras: 263/332 = 79,2 %).

La comparación de los grupos de alta biomasa y diferente longitud del esqueleto (Cuadrantes I y IV) puso en evidencia una tendencia en el sentido esperado, con mayores valores de todas las variables en los animales de esqueleto largo, sin que ninguna de dichas diferencias alcanzara el significado estadístico. Esta respuesta fue común a ambos sexos. La misma respuesta se observó al comparar los grupos divergentes en longitud del esqueleto y con baja biomasa (Cuadrantes II y III), tendencia que en el caso de la longitud de la tibia alcanzó significado esta-

Tabla 6 – Relación músculo hueso en hembras de una población segregante de ratones discriminadas por su conformación corporal en la asintota de su crecimiento dimensional

	Cuadrante			
	I (n = 74)	II (n = 69)	III (n = 74)	IV (n = 69)
	alta biomasa esqueleto largo 37,8 g ± 0,22a 10,9 cm ± 0,03a	baja biomasa esqueleto largo 33,4 g ± 0,16b 10,9 cm ± 0,03a	baja biomasa esqueleto corto 33,2 g ± 0,18b 10,1 cm ± 0,04b	alta biomasa esqueleto corto 38,1 g ± 0,24a 10,2 cm ± 0,03b
Longitud del fémur (mm)	16,99 ab ± 0,045	17,05 a ± 0,049	16,88 b ± 0,040	17,03 ab ± 0,045
Longitud de la tibia (mm)	18,66 a ± 0,027	18,70 a ± 0,037	18,50 b ± 0,033	18,67 a ± 0,041
Peso del fémur (g)	0,0987 a ± 0,00080	0,0974 ab ± 0,00093	0,0946 b ± 0,00078	0,0985 a ± 0,00085
Peso de la tibia (g)	0,0666 a ± 0,00053	0,0662 a ± 0,00059	0,0640 b ± 0,00057	0,0662 a ± 0,00059
Peso del músculo (g)	0,1960 a ± 0,00165	0,1914 ab ± 0,00172	0,1858 b ± 0,00163	0,1954 a ± 0,00177
Todos los valores corresponden al promedio ± error estándar abc Valores con diferente letra difieren al menos al 5%				

dístico en machos.

La discriminación basada en los valores del peso corporal y de la longitud caudal medidos a la edad de selección (49 días) mostró (Tablas 3 y 4) una distribución más uniforme de los individuos en los cuatro cuadrantes (Machos - Cuadrante I: 80/328 = 24,4%, Cuadrante II: 67/328 = 20,4%, Cuadrante III: 97/328 = 29,6% y Cuadrante IV: 84/328 = 25,6%; Hembras - Cuadrante I: 86/326 = 26,4%, Cuadrante II: 84/326 = 25,8%, Cuadrante III: 85/326 = 26,1% y Cuadrante IV: 71/326 = 21,8%). En los machos (Tabla 3), tanto con alta como con baja biomasa, los animales con esqueleto largo presentan huesos más largos y más pesados y músculos más pesados. En el caso de las hembras (Tabla 4) se observaron las mismas tendencias aunque sin alcanzar significado estadístico.

La discriminación de los animales de uno y otro sexo por los valores asintóticos de peso corporal y longitud caudal (Tablas 5 y 6) mostró una distribución entre cuadrantes aún más uniforme que la ya descrita en la clasificación efectuada con el criterio de los 49 días de edad (Machos - Cuadrante I: 84/324 = 25,9%, Cuadrante II: 76/324 = 23,5%, Cuadrante III: 85/324 = 26,2% y Cuadrante IV: 79/324 = 24,4%; Hembras - Cuadrante I: 74/286 = 25,9%, Cuadrante II: 69/286 = 24,1%, Cuadrante III: 74/286 = 25,9% y Cuadrante IV: 69/286 = 24,1%). En los machos (Tabla 5) con alta biomasa (Cuadrantes I y IV) la diferente longitud caudal no afectó significativamente el peso de los huesos. La longitud de los huesos, por el contrario respondió en el mismo sentido que la longitud caudal correspondiendo fémures y tibias más largos a aquellos animales caracterizados como de esqueleto largo. No se ob-

servaron diferencias significativas en el peso promedio del músculo. En las hembras (Tabla 6) con alto peso corporal asintótico no se observó ningún efecto de la divergencia en longitud caudal, sobre ninguna de las cinco variables analizadas. En el caso de aquellas de baja biomasa (Cuadrantes II y III) las de esqueleto largo presentan tibias más pesadas, igual tendencia si bien sin alcanzar el significado estadístico en el caso del fémur, fémures y tibias de mayor longitud promedio y una tendencia del músculo a ser más pesado en el grupo de esqueleto largo.

DISCUSIÓN

Goodale (13) fue el primero en demostrar la posibilidad de seleccionar poblaciones de ratones utilizando como criterio el peso corporal. Su trabajo brindó evidencia empírica acerca de la naturaleza al menos parcialmente aditiva de la variancia genética para peso corporal en el ratón de laboratorio. A partir de ese momento se sucedieron un gran número de trabajos que corroboraron la efectividad de la selección artificial como estrategia genética para modificar el crecimiento dimensional tanto en modelos animales experimentales como en diversas especies de interés productivo. En 1954, basado en información disponible que indicaba que los ratones seleccionados por alto peso tenían colas de mayor longitud que aquellos con selección negativa para el carácter, Falconer informó la primera corroboración empírica de la teoría de la respuesta correlacionada a la selección en el ratón (3). En la misma época, y utilizando los mismos caracteres, Cockrem (4) estableció que la existencia de una correlación genética significativa entre peso corporal y longitud caudal no

constituía un impedimento para seleccionar por combinaciones opuestas al signo de la misma. La selección divergente basada en este principio, y aplicada a una población de ratones de cría libre, permitió obtener dos líneas con diferente conformación corporal (C*Bi*/L: conformación longilínea, baja biomasa y esqueleto largo; C*Bi*/C: conformación compacta, alta biomasa y esqueleto corto), con diferente peso y longitud corporal pero igual longitud del fémur. Se ha propuesto que en estas líneas la respuesta correlacionada en longitud del fémur hizo uso de diferentes fuentes de variancia genética para longitud del hueso. C*Bi*/L habría alargado el fémur en respuesta a la selección por esqueleto largo mientras que C*Bi*/C, pese a ser seleccionada por esqueleto corto, habría alargado sus fémures en respuesta a la selección por alta biomasa dada la imposibilidad de reducir la longitud de un hueso de sostén en presencia de la demanda derivada de una mayor biomasa (10). Es decir que pese a no diferir en la longitud de sus fémures los genes que determinan mayor longitud del hueso en C*Bi*/L serían diferentes de aquellos que determinan mayor longitud del fémur en C*Bi*/C, en ambos casos en relación a los valores de la variable registrados en la población testigo. Ello explicaría el efecto sobredominante observado en los híbridos recíprocos entre ambas líneas que, al acumular genes para mayor longitud del hueso de uno y otro origen, presentan fémures de mayor longitud promedio que cualquiera de las dos líneas parentales (10). La condición heterocigota de los individuos F1 utilizados para generar la población F2 permitió la apertura de variancia para el carácter lo que permitió disponer, tanto en machos como en hembras, de individuos con diferente longitud corporal. En términos generales las asociaciones observadas entre los indicadores utilizados para caracterizar la relación músculo-hueso responden a lo propuesto por Hooper en su hipótesis. Los animales con huesos de mayor longitud tienden a presentar músculos más pesados, diferencia que es estadísticamente significativa en muchos casos y que se traduce en un mayor peso del músculo. Estos efectos se hacen más evidentes cuando los animales han finalizado su crecimiento y se encuentran en la asíntota tanto de peso como de longitud corporal debido a que los patrones dinámicos no coinciden en uno y otro caso de manera tal que en edades cronológicas tempranas (destete, 49 días) los animales presentan diferente madurez para cada una de las dos variables.

La discriminación efectuada en ese momento mostró en los machos con alto peso un efecto no significativo de la diferencia en longitud caudal promedio. Tanto el fémur como la tibia mostraron similares pesos promedio independientemente de si la alta biomasa sustentada estuvo acompañada de un esqueleto largo o corto. Si bien la tendencia

observada en el caso del fémur fue en el sentido esperado (mayor longitud del esqueleto, mayor peso del fémur) particularmente en machos, en el caso del otro hueso largo considerado se observó el comportamiento inverso con tibias con tendencia a ser más pesadas en el grupo de machos con esqueleto corto. La longitud de ambos huesos sí respondió en el mismo sentido de la longitud del esqueleto, y el grupo de animales ubicados en el Cuadrante I mostró fémures y tibias en promedio más largos que los del Cuadrante IV. Pese a que las diferencias observadas en el peso promedio del músculo tríceps sural no alcanzaron significado estadístico, la tendencia observada es coherente con la hipótesis de que a mayor longitud del hueso corresponde mayor peso del músculo. Sin embargo, esa diferencia en el peso del músculo no sería de magnitud suficiente como para afectar el peso del hueso. En los machos con bajo peso, la mayor longitud del esqueleto estuvo asociada con huesos más largos, músculos más pesados y huesos más pesados. La utilización del mismo criterio, en el caso de las hembras también puso de manifiesto diferentes respuestas según se consideren los animales de alta biomasa o los de baja biomasa. En el primer caso, tanto las hembras de esqueleto largo como las de esqueleto corto presentan valores similares de las cinco variables. Con elevada biomasa a sustentar, la diferente longitud del esqueleto no se refleja en diferencias en la longitud ni del fémur ni de la tibia. A igual peso corporal promedio, no difieren ni el peso promedio de ambos huesos ni el peso promedio del músculo. Es decir que pese a la menor longitud del esqueleto los huesos largos no se acortan sino que muestran la misma longitud y son igualmente pesados al igual que el músculo. En condiciones de alto peso no es posible diferenciar los efectos de la diferente longitud del esqueleto sobre la longitud de los dos huesos considerados, sobre su peso y sobre el peso del músculo al igual que lo observado en la línea parental C*Bi*/C. En condiciones de baja biomasa, por el contrario, las hembras de esqueleto largo presentan una tibia más pesada, fémures y tibias de mayor longitud y una tendencia en el sentido esperado del peso del fémur y del peso del músculo. Dado que las hembras de estos dos grupos no difieren en la biomasa sustentada –presentan, en promedio, el mismo peso corporal– puede especularse que es la diferencia en la longitud del esqueleto la que se traduce en huesos más largos, respuesta que a su vez se traduce en un mayor peso del músculo y ello, finalmente, en un mayor peso de los huesos al igual que lo observado en la línea parental C*Bi*/L.

En conclusión, la disociación de las respuestas esperadas en términos de relación músculo-hueso producto de la selección divergente antagónica al signo de la correlación positiva en-

tre peso y longitud corporal (9) es identificable en la población segregante derivada del cruzamiento entre las dos líneas seleccionadas de manera tal que en condiciones de bajo peso, en las que la biomasa a sustentar no representa una limitación frente a la presión para modificar la longitud de los huesos, se constata el cumplimiento de las predicciones derivadas de la hipótesis de Hooper.

BIBLIOGRAFÍA

1. Efstratiadis, A. Genetics of mouse growth. *Int.J.Dev. Biol.* 42: 955-976, 1998.
2. Hetzel, D.; Nicholas, F. Growth, efficiency and body composition of mice selected for post-weaning weight gain on ad libitum or restricted feeding. *Genet. Res.* 48: 101-109, 1986.
3. Falconer, D.S. Validity of the theory of genetic correlation: An experimental test with mice. *Heredity* 45: 42-44, 1954.
4. Cockrem, F. Selection for relationships opposite to those predicted by the genetic correlation between two traits in the house mouse (*Mus musculus*). *Nature* 183: 342-343, 1959.
5. Rutledge, J.J.; Eisen, E.J.; Legates, J.E. An experimental evaluation of genetic correlation. *Genetics* 75: 709-726, 1973.
6. Di Masso, R.J. Patrón de crecimiento de ratones de cinco genotipos seleccionados por conformación corporal según dos criterios. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario, 2003.
7. Hooper, A.C.B. Bone length and muscle weight in mice subjected to genetic selection for the relative length of the tibia and radius. *Life Sci.* 22: 283-286, 1978.
8. Hooper, A.C.B. Muscles and bones of large and small mice compared at equal body weights. *J. Anat.* 127: 117-123, 1978.
9. Di Masso, R.J.; Silva, P.S.; Font, M.T. Muscle-bone relationships in mice selected for different body conformations. *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* 4 (1):41-47, 2004.
10. Di Masso, R.J.; Zerpa, C.M.; Silva, P.S.; Font, M.T. Femoral morphometry and femur length in mice selected for different body conformations. A potential animal model suitable for QTLs mapping. *Archives of Animal Breeding* 50(3) 309-319, 2007.
11. Di Masso, R.J.; Abdala, S.B.; Sánchez, S.M.; Font, M.T. Respuesta a la selección divergente por conformación corporal en el ratón. *Mendeliana* 9 (2): 79-92, 1991
12. Sheskin, D.J. Handbook of parametric and non-parametric statistical procedures. Chapman & Hall. USA. 2000.
13. Goodale, H.D. A study of the inheritance of body weight in the albino mouse by selection. *J. Hered.* 29: 101-112, 1938.

EFECTO DE DIFERENTES ÉSTERES DE ESTRADIOL UTILIZADOS PARA SINCRONIZAR LA OVULACIÓN SOBRE EL PORCENTAJE DE PREÑEZ A LA IATF EN VACAS ANGUS

Veiga P¹, Chayer R², Uslenghi G^{3, 5}, Montiel J⁴, Callejas S⁵

¹Méd. Vet. Act. Privada. Los Lazos S.A. (Cabaña El Volcán).

²Méd. Vet. Act. Privada, Integrante de CONPAS; Docente y Tutor Externo. Fac. Cs. Vet. UNCPBA.

³Becario Posgrado CONICET. ⁴ Méd. Vet. Act. Privada. Dinfe S.A. (Cabaña Santo Domingo).

⁵Docente Área de Reproducción. FISFARVET. Fac. Cs. Vet. UNCPBA.

RESUMEN: *El Cipionato de estradiol (CPE) permite inseminar animales a tiempo fijo (IATF) realizando tres encierres. Recientemente han surgido resultados variables, por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso del CPE administrado al retirar un dispositivo intravaginal sobre el porcentaje de preñez a la IATF. Se realizaron 2 ensayos (E1 y E2), utilizando 273 vacas con cría. El día 0 se colocó un dispositivo más BE. El día 8 se retiró el dispositivo, se administró prostaglandina, y los animales recibieron aleatoriamente, CPE en ese momento o BE 24 h posteriores. El día 10, 50-53 h post retiro, se realizó IATF utilizando semen de toros de probada fertilidad (E1: GS y SE; E2: M y ME) y dos inseminadores. El día 40 se realizó diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía. No se observaron efectos del tratamiento (CPE: 55,17%; BE: 58,59%), inseminador (T: 54,79%; A: 59,06%), toro (E1: GS: 55,3% y SE: 60,0%; E2: M: 51,5% y SE: 59,1%) y de sus interacciones sobre el porcentaje de preñez ($P>0,05$). Se concluye que en las condiciones del presente trabajo se puede utilizar CPE al retirar un dispositivo en lugar de BE a las 24 h sin afectar el porcentaje de preñez.*

Palabras clave: Cipionato de estradiol, benzoato de estradiol, inseminación artificial a tiempo fijo, porcentaje de preñez.

EFFECT OF DIFFERENT ESTERS OF ESTRADIOL USED TO SYNCHRONIZE OVULATION ON PREGNANCY RATE TO FTAI IN ANGUS COWS

ABSTRACT: *The estradiol cypionate (ECP) allows animals inseminated at fixed time (FTAI) performing three enclosures. Recently there have been varying results, therefore, the objective of this work was to evaluate the use of ECP administered at device removal upon pregnancy rate after FTAI. Two trials were conducted (E1 and E2), using 273 lactating beef cows. On day 0 cows received a progesterone intravaginal device plus EB. On day 8, the intravaginal device was removed, cows received a luteolytic dose of PGF and were randomized to receive either ECP at 0 h or EB at 24 h. On day 10, 50-53 h after device removal, fixed-time artificial insemination was performed using frozen/thawed semen of proven fertility bulls (E1: GS y SE; E2: M y ME) and two inseminators. Pregnancy diagnosis was performed on day 40 by ultrasonography. Pregnancy rates were not different between treatments (ECP: 55,17%; EB: 58,59 %), inseminators (T: 54,79%; A: 59,06%) and bull (E1: GS: 55,3% y SE: 60,0%; E2: M: 51,5% y SE: 59,1%). Interactions were not significant ($P>0,05$). In conclusion, according to our finding, estradiol cypionate could be used instead of estradiol benzoate to synchronize ovulation without affecting the pregnancy rate at fixed timed artificial insemination.*

Key words: Estradiol cypionate, estradiol benzoate, fixed-time artificial insemination, pregnancy rates.

Fecha de recepción: 29/02/12

Fecha de aprobación: 07/08/12

Dirección para correspondencia: Santiago Callejas, Fac. Cs. Vet. UNCPBA. Paraje Arroyo Seco s/n. (7000) Tandil. Tel./Fax.: (02293) 43-9850.

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

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial es una herramienta que permite incorporar genética de calidad en los rodeos comerciales (1). Para su implementación a gran escala, se realizan tratamientos hormonales que permiten aplicarla en muchos animales en un mismo momento, conociendo a esta técnica como Inseminación Artificial a Tiempo Fijo (IATF; 1, 2).

El tratamiento más difundido consiste en la utilización de dispositivos intravaginales con progesterona (DISP) durante 7 a 9 días, combinados con benzoato de estradiol (BE) y un agente luteolítico. El dispositivo intravaginal simula una fase luteal de vida media corta. El agente luteolítico se aplica al retirar el dispositivo y produce la lisis del cuerpo lúteo, en caso que esté presente. El BE es aplicado al inicio para inducir una nueva onda de crecimiento folicular, y 24 h posteriores al retiro del dispositivo para sincronizar la ovulación (3, 4). De esta manera, se sincronizan las ovulaciones y se puede realizar la IATF a las 52-56 horas de retirado el dispositivo (3). Adicionalmente, estos tratamientos posibilitan inducir actividad ovárica cíclica en animales en anestro (5).

El tratamiento hormonal descrito requiere del encierre de los animales en cuatro oportunidades, lo cual dificulta el manejo de los mismos y resulta poco práctico. Con el objetivo de disminuir el movimiento de animales y favorecer la implementación de la IATF a gran escala, es que se comenzó a trabajar para evitar un encierre. En este sentido, se ha utilizado el BE inyectado en el momento de retirar el dispositivo (6) o la GnRH administrada en el momento de realizar la IATF (7); ambos tratamientos sustituyen al BE que se administra a las 24 h de retirado el dispositivo (7). Sin embargo, el BE inyectado al retirar el dispositivo produce un adelanto en las ovulaciones y requiere que la IATF se realice a las 48 h, pues un retraso en la misma (54 h) ha afectado negativamente la preñez (6). En cuanto a la GnRH los resultados son equivalentes al tratamiento tradicional, aunque incrementa el costo del tratamiento (7). Por otro lado, se ha difundido en los últimos años el uso del cipionato de estradiol (CPE) inyectado al momento de retirar el dispositivo con porcentajes de preñez equivalentes a aquellos que se obtienen con el tratamiento de 4 encierres (7, 8); no obstante, se ha observado que produce una mayor dispersión en las ovulaciones (9).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso del CPE administrado al retirar un DISP sobre el porcentaje de preñez que se obtiene luego de realizar una IATF en vacas con cría al pie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar, animales, alimentación. El trabajo se realizó en un establecimiento de producción

agropecuaria, ubicado en Olavarría, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Se realizaron dos ensayos (EI, n: 112; EII, n: 161) utilizando vacas Aberdeen Angus puro controladas, con un rango post parto de 46 a 105 días y una condición corporal (media \pm desvío estándar) de $2,9 \pm 0,4$ en el E1, y $3,0 \pm 0,5$ en el E2 sobre una escala de 1 (excesivamente flaca) a 5 (obesa). La alimentación de los animales se basó en campo natural con suplementación de silo de sorgo autoconsumo (15 kg de MV/día), teniendo libre acceso al agua.

Tratamientos y servicio. En el día 0 se colocó a todos los animales un dispositivo intravaginal con progesterona (1,9 g de P4, CIDR primer uso en el EII y CIDR de segundo uso en el EI, Pfizer Argentina), más una inyección intramuscular (im) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE, Estradiol 10, Laboratorio Rio de Janeiro, Argentina). El día 8 se retiró el dispositivo, se administró 12,5 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse, Pfizer, Argentina) im y los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos para recibir 1 mg de CPE (Laboratorio König) im en ese momento o 1 mg de BE im a las 24 h posteriores. En el día 10, 50-53 h post retiro de los dispositivos, se realizó la IATF utilizando semen congelado/descongelado en pajuelas de 0,5 ml proveniente de toros de probada fertilidad: 2 en cada ensayo (EI: GS y SE; EII: M y ME). En los dos ensayos se utilizaron dos inseminadores.

Diagnóstico de gestación. A los 30 días post IATF, se realizó ultrasonografía (Aloka 500 SSD, transductor lineal de 5 MHz) del útero para determinar la presencia del embrión y evaluar el porcentaje de preñez a la IATF.

Análisis estadístico. Se evaluó dentro de cada ensayo, los efectos: tratamiento, toro, inseminador y sus interacciones sobre el porcentaje de preñez. Se utilizó el Proc CATMOD del SAS, fijando un nivel de confianza del 95 % ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

No se observaron efectos del tratamiento, del inseminador, del toro y de sus interacciones sobre el porcentaje de preñez ($P>0,05$; Tabla 1).

DISCUSIÓN

El principal aporte del presente trabajo, es que se dispone de un protocolo de control del ciclo estral que permite realizar una IATF de manera exitosa en vacas con cría, logrando un gran impacto en los sistemas productivos, y facilitando su implementación, ya que con la utilización del CPE al retiro del dispositivo se evita un encierre y se obtienen porcentajes de preñez similares a los logrados con el tratamiento tradicional. Incluso, el costo de la técnica no varía, debido a que el CPE, al igual que el BE son hormonas de bajo costo, en contraposición con lo que ocurre cuando se utiliza GnRH como inductor de la ovulación (7).

Tabla 1. Porcentaje de preñez a la IATF en vacas que recibieron CPE o BE como inductor de la ovulación al final de un tratamiento con dispositivos intravaginales con progesterona.

Tratamientos	Ensayos:	EI	EII
CPE		53,3 (32/60)	56,5 (48/85)
BE		63,5 (33/52)	55,3 (42/76)
Toros	GS	55,3 (26/47)	
	SE	60,0 (39/65)	
	M		51,5 (35/68)
	SE		59,1 (55/93)
Inseminador	T	55,0 (33/60)	54,7 (47/86)
	A	61,5 (32/52)	57,3 (43/75)

No se observaron efectos del tratamiento sobre el porcentaje de preñez a la IATF, lo cual coincide con lo informado por otros investigadores (7, 9). En vacas con cría, disminuir un encierres de gran importancia, porque facilita el manejo de los animales, particularmente por la presencia de los terneros. En este sentido, Meneghetti *et al.* (2009) realizaron una serie de experimentos en vacas Nelore con cría, y obtuvieron 50,8% y 51,9% de preñez utilizando CPE al retiro y BE a las 24 h respectivamente, concluyendo que el CPE puede reemplazar al BE como inductor de la ovulación sin afectar los porcentajes de preñez en un protocolo para IATF. Si bien los porcentajes de preñez obtenidos en el presente trabajo son levemente superiores (CPE: 55,2%; BE: 58,6%), diferencias de raza, estado corporal, días post parto y técnicos inseminadores podrían explicar parte de las diferencias observadas. Adicionalmente, los resultados del presente trabajo (EI: 58,0%; EII: 55,9%) se encuentran dentro del rango de preñez que cita la bibliografía para la implementación de protocolos de IATF, que es de 23,6% a 74,4% (4, 10). Incluso, a pesar del amplio margen existente, se lograron resultados que coinciden con los más altos índices de preñez, superiores al promedio (51,3%; 4) en los dos ensayos.

La calidad del semen utilizado en los programas de IATF es un factor muy importante que puede influir significativamente en el resultado, así lo manifiestan numerosos autores (11, 12, 13, 14, 15). En el presente trabajo se utilizó semen de diferentes toros, y a pesar de eso no fueron observadas diferencias significativas en el porcentaje de preñez entre los mismos, de igual manera a lo informado en otros trabajos (15, 16, 17).

En todos los ensayos realizados fueron utilizados dos inseminadores experimentados. Según lo expuesto por Kaproth *et al.* (2005), la experiencia del técnico inseminador juega un papel preponderante en el resultado. En el presente trabajo no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de preñez logrado por cada inseminador, lo cual concuerda con lo informado por Chesta *et al.* (2009) y Amirat-Briand *et al.* (2010).

Se concluye que en las condiciones del presente trabajo, y a pesar de haber utilizado varios toros y dispositivos con diferente concentración de progesterona, se puede utilizar CPE administrado al retirar un DISP en lugar de BE 24 h posteriores sin afectar el porcentaje de preñez luego de realizar una IATF en vacas con cría.

BIBLIOGRAFÍA

- Bó GA, Adams GP, Pierson RA and Mapletoft RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 31-40.
- Lane EA, Austin EJ, Roche JF and Crowe MA. The effect of estradiol benzoate on synchrony of estrus and fertility in cattle after removal of a progesterone-releasing intravaginal device. *Theriogenology* 2001; 55: 1807-1818.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R. The control of follicular wave development for self appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002; 57: 53-72.
- Bó, GA.; Baruselli, PS.; Martínez, MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2003; 78: 307-326.
- Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RCP, Rodrigues CA, Madureira EH, Bó GA, Baruselli PS. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology* 2010; 73: 651-658.
- Ayres, H.; Martins, CM.; Ferreira, RM.; Mello, JE.; Dominguez, JH.; Souza, AH.; Valentin, R.; Santos, ICC.; Baruselli, PS. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. *Anim. Reprod. Sci.* 2008; 109: 77-87.
- Meneghetti M, Sá Filho OG, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis por development of protocols. *Theriogenology* 2009; 72: 179-189.
- Macmillan KL, Segwagwe BE, Pino CS. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*

2003; 78: 327-344.

9. Sá Filho MF, Sales JNS, Baruselli PS. Atualização dos protocolos de IATF em fêmeas bovinas de corte. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal 2011. IRAC. Córdoba. Argentina. Págs. 165-189.

10. Colazo MG, Kastelic JP, Whittaker PR, Gavaga QA, Wilde R, Mapletoft RJ. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 81: 25-34.

11. Christensen P, Brockhoff PB and Lehn-Jensen H. The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls. *Reprod. Dom. Anim.* 1999; 34: 503-507.

12. De Jarnette J. Impacto del toro, de la calidad seminal y del técnico inseminador sobre las tasas de concepción en rodeos lecheros. Memorias Segundas Jornadas Taurus de Reproducción Bovina. Buenos Aires, Argentina, 16 y 17 de septiembre de 2004, 54-73.

13. Bó G, Cutaia L, Chesta P, Balla E, Picinato D, Peres L, Maraña D, Avilés M, Menchaca A, Veneranda G, Baruselli P. Implementación de Programas de Inseminación Artificial en rodeos de cría de Argentina. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal 2005. IRAC. Córdoba, Argentina. Págs. 97-128.

14. Sá Filho OG, Meneghetti M, Peres RFG, Lamb GC, Vasconcelos JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 2009; 72: 210-218.

15. Amirat-Briand L, Bencharif D, Vera-Munoz O, Pineau S, Thorin C, Destrumelle S, Desherces S, Anton M, Jouan M, Shmitt E, Tainturier D. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Anim. Reprod. Sci.* 2010; 122: 282-287.

16. Beriso R, Oca C, Teruel M, Callejas S. Uso de dispositivos con diferentes cantidades de progesterona y eCG en vacas con cría en buena condición corporal. VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal 2009. IRAC. Córdoba, Argentina. Formato CD/nº1.

17. Chesta P, Filippi L, Ramos M, Racca D, Bó, G. Evaluación de las tasas de preñez en protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) utilizando diferentes dosis de cipionato de estradiol en vaquillonas holando. VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal 2009. IRAC. Córdoba. Argentina. Formato CD/nº12.

18. Kaproth MT, Rycroft HE, Gilbert GR, Abdel-Azim G, Putnam BF, Schnell SA, Everett RW, Parks JE. Effect of semen thaw method on conception rate in four large commercial dairy heifer herds. *Theriogenology* 2005; 63: 2535-2549.

LESIONES MUSCULOESQUELETICAS CATASTRÓFICAS EN MIEMBROS POSTERIORES ESTUDIO DE CASOS EN CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERAS EN EL HIPODROMO “LA RINCONADA” CARACAS, VENEZUELA

Morales A¹, Garcia F¹, Villoria D², Leal L², Gomez M¹

¹Departamento de Patología Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela. Maracay, Estado Aragua Venezuela. ²Hipódromo “La Rinconada”. Caracas, Venezuela

RESUMEN: El objetivo de este estudio fue describir la prevalencia de lesiones musculoesqueléticas catastróficas en miembros posteriores de caballos Pura Sangre de Carreras. Se estudiaron 17 casos de fracturas, con edades entre 2-3 años, de un total de 216 fracturas en equinos de raza Pura Sangre de Carrera del Hipódromo “La Rinconada”, durante los años 2000-2011. Todos los equinos presentaron historia de fracturas de miembros posteriores y fueron evaluados clínicamente. Se les practicó eutanasia, posteriormente necropsia y toma de muestras de tejidos. Las muestras tomadas fueron fijadas en formol al 10% y procesadas por los métodos convencionales histológicos. Los resultados fueron de un total de 216 fracturas 17 correspondieron a fracturas de miembros posteriores, 8% aproximadamente. El miembro posterior izquierdo presentó un 65% de afección, el miembro posterior derecho evidenció 35%. Las bases anatómicas afectadas fueron la tibia 88%, seguida del fémur 6% y metatarso principal 6%. Las fracturas bilaterales de la tibia y peroné se observaron en 3 oportunidades 18%. Las fracturas en todos los casos estudiados fueron expuestas, con severo compromiso vascular. En conclusión reportamos 17 casos de lesiones musculoesqueléticas catastróficas en miembros posteriores en equinos Pura Sangre de Carreras en el Hipódromo “La Rinconada” Caracas, Venezuela.

Palabras claves: fracturas, CMI, tibia, fémur, equino, patología.

CATASTROPHIC MUSCULOSKELETAL INJURY IN LEG CASE STUDY IN THOROUGHBRED RACE HORSES IN THE RACECOURSE “LA RINCONADA” CARACAS, VENEZUELA

ABSTRACT: The aim of this study was to describe the prevalence of catastrophic musculoskeletal injuries hind Thoroughbred Racing. We studied 17 cases of fractures, aged 2-3 years, a total of 216 fractures in Thoroughbred horses from the Hippodrome “La Rinconada”, during the years 2000-2011. All horses have a history of broken hind legs and were evaluated clinically. They were euthanized, necropsy and subsequent tissue sampling. The samples were fixed in 10% formalin and processed by conventional histological methods. The results were a total of 216 fractures, 17 fractures were for Hind 8%. The left hind foot 65% of present condition, the right hind limb evidenced 35%. The anatomical bases affected were the tibia 88%, followed by the femur and metatarsus 6% 6% lead. Bilateral fractures of the tibia and fibula were observed in 3 chances 18%. The fractures in all the cases studied were exposed, with severe vascular compromise. In conclusion we report 17 cases of catastrophic musculoskeletal injuries in equine hind Thoroughbred racing at the Hippodrome “La Rinconada” Caracas, Venezuela.

Keywords: fractures, CMI; tibia, femur, equine, pathology.

Fecha de recepción: 14/09/11

Fecha de aprobación: 30/07/12

Dirección para correspondencia: Abelardo Morales. Departamento de Patología Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela. Maracay, Est. Aragua Venezuela. Caracas, Venezuela

E-mail: aamorales13@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las lesiones musculo esqueléticas catastróficas (CMI) en caballos Pura Sangre de Carreras, generan grandes pérdidas económicas y un efecto negativo en la percepción pública de la industria de las carreras (5). La prevalencia de las muertes debidas a lesiones catastróficas, fatal en caballos de carreras es inferior al 2 por 1000 comienza la carrera (desde 0,14 hasta 0,17%) (1). Lesiones músculo-esqueléticas son responsables de 77% de las 946 muertes en caballos de carreras de California de 1997-1999 (1). Existen reportes que sugieren una prevalencia de lesiones en miembro posterior izquierdo de aproximadamente 9% (7/78) y miembro posterior derecho 1.3% (1/78) (Morales, et al., 2009); la prevalencia de fracturas en miembros posteriores fue de 2% (1/51), específicamente fractura de la tibia del miembro posterior izquierdo (3). Las fracturas por estrés de la tibia recientemente se han convertido en una causa bien conocida de claudicación en caballos de carreras (2). El objetivo de este estudio fue describir la prevalencia de lesiones musculo esqueléticas catastróficas en miembros posteriores de caballos Pura Sangre de Carreras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población: se estudiaron 17 casos de fracturas (6 caballos y 11 yeguas), con edades comprendidas entre 2-3 años, de un total de 216 fracturas en equinos de raza Pura Sangre de Carrera del Hipódromo "La Rinconada", Departamento de Patología Caracas Venezuela, durante los años 2000-2011.

Historia clínica: 17 equinos presentaron historia de fracturas de miembros posteriores y fueron evaluados clínicamente.

Necropsia: A cada uno de los ejemplares se les practicó eutanasia, posteriormente necropsia y toma de muestras de tejidos según el protocolo sistemático descrito para equinos (3). Las muestras tomadas fueron fijadas en formol al 10% y procesadas por los métodos convencionales histológicos (3).

Los resultados fueron de un total de 216 fracturas 17 correspondieron a fracturas de miembros posteriores, 8% aproximadamente. El miembro posterior izquierdo presentó un 65% (11/17) de afección, el miembro posterior derecho evidenció 35% (6/17). Con respecto a las bases anatómicas afectadas la tibia mostró mayor prevalencia 88% (15/17), seguida del fémur 6% (1/17) y metatarso principal 6% (1/17) respectivamente. Las fracturas bilaterales de la tibia y peroné se observaron en 3 oportunidades 18% (3/17). Las fracturas en todos los casos estudiados fueron expuestas, con severo compromiso vascular. Las fracturas de tipo oblicuas se

Tabla 1.- Frecuencia de lesiones de miembros posteriores y base anatómica involucrada.

MIEMBRO POSTERIOR IZQUIERDO	MIEMBRO POSTERIOR DERECHO
Fémur	
Tibia y peroné	
Tibia y peroné	Tibia y peroné
Tibia y peroné	
Tibia y peroné	
Tibia y peroné	Tibia y peroné
Tibia y peroné	
Tibia y peroné	
Tibia y peroné	Tibia y peroné
	Tibia y peroné
	Tibia y peroné
	Tibia y peroné
Metatarso	

observaron en la diáfisis de la tibia, involucrando el peroné. La fractura del fémur fue en la extremidad distal, de tipo conminuta traumática. La fractura del metatarso principal fue conminuta. Los cortes histológicos de tejido óseo mostraron focos de condromalacia con exposición del hueso subcondral (enfermedad degenerativa articular), y osteomalacia. En 5 casos fue observada hipertrofia de glándulas paratiroides. El hígado presentó telangiectasia hepática y necrosis periácinar en todos los casos. En el tejido renal se evidenció nefritis intersticial y glomerulonefritis membrano-proliferativa. Los resultados se expresan en la siguiente tabla:

DISCUSIÓN

Los resultados sugieren una prevalencia de 8% relativamente baja de lesiones musculo esqueléticas catastróficas en miembros posteriores. Esto parece coincidir con los resultados en la literatura donde sugieren una prevalencia de 10% (3). La mayoría de las fracturas en caballos de carrera son fracturas por estrés y fracturas completas. (4). Las fracturas de tibia por estrés predominaron en potros de dos años de edad (4, 5, 6), esto parece coincidir con nuestros resultados. La falta de predilección por el sexo o la integridad física, la baja tasa de recurrencia de y la incidencia moderada de fracturas de tibia es consistente con otros estudios (4). Las fracturas de la tibia se presentaron a nivel de la diáfisis fracturas caudolateral (4,5), esto fue similar a los resultados obtenidos en este estudio. La fractura de la diáfisis del fémur fue predominante en un estudio de 38 equinos menores de 1 año (6). En un estudio en Uruguay, la región anatómica involucrada en las lesiones fueron de la siguiente

A. Morales y col.

43% en el menudillo conjunta (en particular, las fracturas de hueso sesamoideo), el 19% tendones y ligamentos involucrados con el restante 38% la participación del metacarpo, carpo, columna vertebral, pelvis, escápula, la tibia y el fémur (4, 5).

En conclusión reportamos 17 casos de lesiones musculoesqueléticas catastróficas en miembros posteriores de equinos Pura Sangre de Carreras en el Hipódromo "La Rinconada" Caracas, Venezuela.

AGRADECIMIENTOS: A la Dirección de los Servicios Veterinarios y Fomento Equino de la Junta Liquidadora Instituto Nacional de Hipódromos Caracas-Venezuela y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.

BIBLIOGRAFÍA

1. Estberg L, SM Stover, IA Gardner, BJ Johnson, RA Jack, JT Case, A Ardans, DH Read, ML Anderson, BC Barr, BM Daft, H Kinde, J Moore, J Stoltz, L Woods. 1998. Relationship between race start characteristics and risk of catastrophic injury in thoroughbreds: 78 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1992;15, 544-9.
2. Hance SR, Bramlage LR, Schneider RK, Embertson RM. Retrospective study of 38 cases of femur fractures in horses less than one year of age. *Equine Vet J*. 1992; 24(5):357-63.
3. Morales B., Abelardo, Bermudez G., Víctor, García G., Francisco et al. Lesiones músculo esqueléticas catastróficas en caballos pura sangre de carrera, Caracas-Venezuela. *Rev. Investig. Vet. Perú*, 2009, vol.20, no.2, p.243-248.
4. Ruggles AJ, Moore RM, Bertone AL, Schneider RK, Bailey MQ. Tibial stress fractures in racing standardbreds: 13 cases (1989-1993). *J Am Vet Med Assoc*. 1996 1;209(3):634-7.
5. Russell L. Tucker, Thomas E. Wilkinson, Vania M. Machado V. Radiographic, mri and necropsy analysis of thoroughbred racehorse fatalities within Washington state, 2006-2008. Proceedings of the 11th International Congress of World Equine Veterinary Association, 2009 - Guarujá, SP, Brazil.
6. Wright IM. Fractures of the lateral malleolus of the tibia in 16 horses. *Equine Vet J*. 1992;24(6):424-9.

GASTRIC NODULES WITH *Neospora caninum* ZOOITES IN A CONFIRMED CLINICAL NEOSPORA CANINUM INFECTION IN A DOG

Gomez F¹, Massone A², Mouras F³, Basso W^{4, 5}, Schares G⁶, del Amo A¹

¹ Clínica de Pequeños Animales, ² Anatomía y Fisiología Patológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

³ Profesional Independiente, Argentina. ⁴ Laboratorio de Inmunoparasitología

⁵ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

⁶ Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Epidemiology, Seestraße 55 (16868) Wusterhausen, Germany.

ABSTRACT: *Generalized neosporosis was diagnosed in a two year old rottweiler. The dog had a history of tetraparesis, muscle atrophy, regurgitation and vomiting. Serological analysis by indirect fluorescent antibody test was 1/400 for Neospora caninum. Contrasted radiological surveys showed megaesophagus and during ultrasonografic examination an 8.2 mm diameter mural nodule was observed at the pyloric region. Citologic evaluation revealed highly number of zooites. Microscopically, severe myositis were observed in histologic muscle sections and several groups of tachyzoites and tissue cysts were associated with these lesions. The result of the immunohistochemical staining was: protozoa in muscle sections of the dog stained strongly using 5.2.15 monoclonal antibodies against N. caninum tachyzoites. This paper describes a clinical case of canine neosporosis with vomiting associated to Neospora gastric nodule.*

Keywords : Neosporosis- polimiositis- dog- gastric nodules

NÓDULOS GÁSTRICOS CON NEOSPORA EN UN CANINO

RESUMEN: *Se realizó el diagnóstico de neosporosis generalizada en un canino rottweiler de dos años de edad. El paciente presentaba las siguientes alteraciones: tetraparesia, atrofia muscular, regurgitación y vómito. El resultado del análisis serológico por prueba de inmunofluorescencia indirecta fue 1/400 para Neospora caninum. Los estudios radiológicos contrastados mostraron megaesófago y durante el examen ultrasonográfico se observó un nódulo mural de 8,2 mm de diámetro en la región pilórica. La evaluación citológica reveló numerosos zooitos. En las secciones histológicas de músculo se observaron varios grupos de taquizoitos y quistes asociados a miositis severa. El resultado de las técnicas de inmunohistoquímica fue: protozoos en secciones de músculo que se tiñeron fuertemente con 5.2.15 anticuerpos monoclonales contra taquizoitos de N. caninum. Este reporte describe un caso clínico de neosporosis canina con vómitos asociados a nódulo gástrico de Neospora.*

Palabras clave: Neosporosis- polimiositis- perro- nódulos gástricos.

Fecha de recepción: 23/10/11

Fecha de aprobación: 30/07/12

Dirección para correspondencia: A. Del Amo. Cátedra de Clínica de pequeños animales. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

INTRODUCTION

Neospora caninum is a coccidian parasite of animals. Dogs and coyotes are both the intermediate and definitive hosts for *N. caninum*. Infection may occur transplacentally or vertically in dogs fed with uncooked beef.

The most severe cases of neosporosis occur in young, congenitally infected puppies. Young dogs develop hind limb paresis that turns into a progressive paralysis. Neurologic signs are depend on the site parasitized. The hind limbs are more severely affected than the fore limbs and often in rigid hyperextension (Dubey Korean). Adult dogs more often present multifocal encefalomyelitis and polymyositis. Other systemic signs are dysphagia, regurgitation due to megaesophagus, fever, vomiting, icterus (associated to pancreatitis or hepatitis).

This paper describes a clinical case of canine neosporosis with vomiting associated to neospora gastric nodules. The patient also presented regurgitation due to megaesophagus and tetraparesis because of generalized polymyositis.

CASE REPORT

A two-year-old female rottweiler (22 kg) was presented with one month history of lameness, tetraparesis, inappetence, regurgitation and vomiting. It had been treated with corticosteroids a month before consultation.

On physical examination, the dog was in lateral recumbence with normal mental status. It exhibited generalized muscular pain, decreased muscle tone and atrophy. Spinal reflexes were alternatively normal and diminished. Sensitive evaluation was normal.

During internation it was observed regurgitation and intermittent bilious vomiting.

A CBC and serum biochemical analyses were performed. Moderated neutrophilic leukocytosis (22, 500 neutrophils/ μ l) was found. Biochemical abnormalities included: hyperglobulinemia (6 g/l) and increasing of creatine kinase (400 u/l U/L. Serological analysis by indirect fluorescent antibody test (IFAT) was negative for *Toxoplasma gondii* and 1/400 for *Neospora caninum*.

Contrasted radiological surveys showed megaesophagus and showed intestinal gas during abdominal survey. Ultrasonographic examination showed gastric wall thickening due to a thicker mucous layer. An 8,2 mm diameter mural nodule was also observed at the piloric region (Figure 1).

Within the first 24 hours of hospitalization, a gastric tube for enteral feeding was introduced. During the proceeding several smaller nodules were seen in the gastric fundus. A fine-needle aspirate was performed of the gastric nodule and

mesenteric lymph nodes. Cytologic evaluation of the gastric nodule revealed highly number of zoites and a few neutrophils (Figure 2). High count of lymphocytes (70%), neutrophils (20 %) and lymphoblasts (10%) were seen on lymph nodes smears.

Samples of apendicular muscle were taken for histopathologic and immunohistochemical evaluation by an open surgical biopsy procedure.

Histological examination revealed myositis with an abundant and predominantly histiocytic and plasmacytic infiltration, separates individual fibers, myofibers necrosis and atrophy. Tachyzoites were associated with these lesions, some of them were free, while others formed cystic. Segmental muscle fiber degeneration was observed.

Polymerase chain reaction (PCR). DNA was isolated from a paraffin-embedded muscle sample taken by biopsy using phenol extraction and ethanol precipitation as described by Moore (1992) with previous steps of xylol-ethanol treatment (2-times xylol 5 min, 2-times ethanol 100° C 5 min, ethanol 96° C 5 min, ethanol 70° C 5 min, ethanol 50° C 5 min and distilled water 5 min). The amplification was performed with the specific primer pair for *Neospora caninum* Np6+/Np21+ (Müller et al, 1996). The primers were used at a final concentration of 0.5 μ M and dNTP's at a final concentration of 250 μ M each (GE Healthcare, München, Germany). DyNAzyme II DNA polymerase, (Finnzymes, Espoo, Finland) was used as DNA polymerase at 1 U/25 μ l with the provided buffer. The PCR cycling conditions were 94° C for 5 min, followed by 10 cycles of 56° C (with a 0.5° C decrement per cycle after the first cycle) for 1 min, 72° C for 1 min and 94° C for 1 min, followed by 40 cycles of 51° C for 1 min, 72° C for 1 min and 94° C for 1 min. The PCR ended with 51° C for 1 min and a final extension at 72° C for 5 min. The amplification was performed in a thermal cycler (Personal Thermal Cycler, Eppendorf, Hamburg, Germany). The amplicons were analysed in 1.5% agarose gels using a 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) as reference. DNA isolated from NC 1- *N. caninum* tachyzoites and sterile RNase-free water (Sigma) were used as positive and negative controls, respectively.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING

Sections of muscle were immunohistochemically labelled with an anti *N. caninum* with the ABC test using a commercial kit (Vectastain Elite ABC Kit Mouse IgG, Vector Laboratories Inc., Peterborough, UK). Primary antibody was a monoclonal undiluted antibody 5.2.15, specific for *N. caninum* tachyzoites (Schaes et al., 1999). Horse anti-mouse IgG biotinylated antiserum was used as the secondary antibody. Incubation with

the primary antibody was performed overnight at room temperature. Positive controls were heart sections of a *N. caninum*-naturally infected calf and negative controls, lung and liver sections of a naturally infected meerkat (*Suricata suricatta*). The reaction was visualized using a 0.05 % diaminobenzidine solution in imidazol-buffer and hydrogen peroxide and Papanicolau solution as a contrast staining.

RESULTS:

PCR: After electrophoresis, a positive result (337 bp amplicons) was observed in the samples corresponding to the muscle biopsy and to the positive control in the *N. caninum* specific PCR.

Immunohistochemical staining: Protozoa in muscle sections of the dog stained strongly using 5.2.15 monoclonal antibodies against *N. caninum* tachyzoites (Figure 3).

Lactated Ringer’s solution was administered throughout hospitalization. The therapy used for neosporosis was clindamycin (20 mg/kg IM twice daily) until dog dyed, three days later. Owner refused necropsy.



Figure 1. Ultrasonographic examination showing gastric wall thickening and nodule

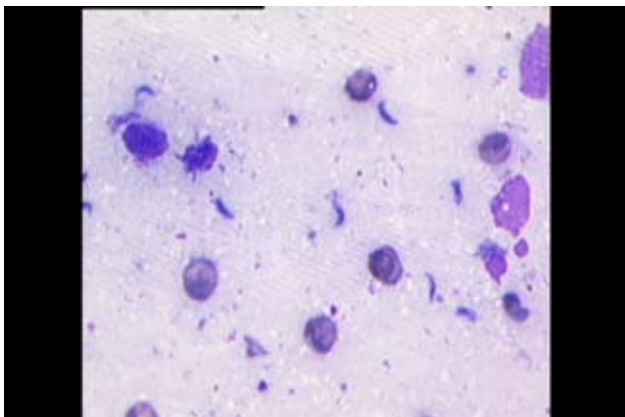


Figure 2. Cytologic evaluation revealing high number of zoites and a few neutrophils.

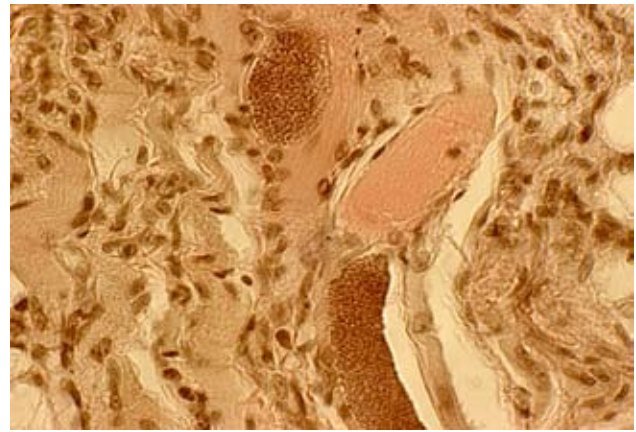


Figure 3. Protozoa in muscle section stained strongly using 5.2.15 monoclonal antibodies against *N. caninum* tachyzoites.

DISCUSSION

The combination of generalized lower motor neuron paralysis, muscle pain, high serum creatine kinase and lesions in muscle biopsy ensure that the dog fulfills the diagnostic criteria of polymyositis. Histological examination revealed myositis with tachyzoites associated, some of them free and others in cystic form. Polymyositis due to *Neospora caninum* has been documented by numerous authors (Podell, 2002, Green, 2006, Basso, 2005). The presence of megaesophagus associated with *N. caninum* infection has been reported before by Barber and Trees (1996) in 2 of 27 dogs. In this case such lesion was attributed to neosporosis. Several digestive signs have been described associated to canine neosporosis. They are regurgitation due to megaesophagus and vomiting, icterus and fever associated to pancreatitis and hepatitis (Green, 2006). The dog in the present case had gastric nodules with tachyzoites inside and vomiting. There are no previous reports of gastric affection in canine neosporosis infections. This is the first report of gastric nodules with tachyzoites in this disease. We assume that the stages observed in the muscle sections are tachyzoites because monoclonal antibodies 5.2.15 recognize only *N. caninum* tachyzoites and failed to detect tissue cysts in brain sections (Schaes et al, 1999). These antibodies react with a 38 kDa surface antigen that seems to be restricted to the tachyzoite stage and absent in bradyzoites (Schaes et al, 1999). Serological, histopathological and immunohistochemical studies allowed a final diagnosis of generalized neosporosis. The lesions and the presence of large numbers of tachyzoites suggested that the severity of the clinical signs observed were due to a *N. caninum* in

BIBLIOGRAPHY

1-Moore, DD. In: Short Protocols in molecular biology, 2nd Edition, 1992; Edited by Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl

F. Gómez y col.

K. Harvard Medical School. U.S.A. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons

2-Schares, G, Dubremetz, JF, Dubey, JP, Bärwald, A, Loyens, A, Conraths, FJ. *Neospora caninum*: Identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. *Exp Parasitol*. 1999; 92:109-119.

3- Podell MS. Inflammatory Myopathies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2002; 32:147-167.

4- Dubey JP, Lappin MR. Toxoplasmosis y Neosporosis, In; *Infectious Diseases of the dog and cat*. 3rd ed. Ed Greene. W.B. Saunders Elsevier. (USA), 2006; p.754-784.

5- Basso, W. y col. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. *Veterinary Parasitology* 2005; 131: 299-303.

SEVERED HEMOPARASITOSIS COMPLICATED IN A THOROUGHBRED HORSES FROM VENEZUELA

Villoria D, Andrea J, Leal L, García F, Morales A.

Veterinary Hospital of National Racetrack "La Rinconada" Department of Veterinary Pathology
Central University of Venezuela

ABSTRACT: *Equine piroplasmosis (EP) is the disease caused by protozoan hemoparasites Babesia caballi and/or B. (Theileria equi). The aim of this study was to report of case of severed hemoparasitosis complicated in a Thoroughbred horse from Venezuela. The equine present acute abdominal pain in 24 hours and complicated post 48 hours and death in the 72 hours. Temperature oscillate 41;2°C. Icterus and hematury severed. We realized a multidisciplinary study clinical, laboratory, biochemistry, necropsy, histopathology. Hematies: 10.6 mm³, Hb: 16.4 g/dL, Hto: 48%, plaques 305mm³, Leucocytes 4.7 x/mm³, Neutrophiles 47%, Lymphocytes 44%, Monocytes 1%, Eosinophiles 7%. Total Protein 7,2g/dL, Albumine 2.8g/dL, globulin 4.4g/dL, glicemia 85mg/dL, urea 29mg/dL, creatinine 3.0 mg/dL. BT 3.07mg/dL, BD 0.33mg/dL, BI 2.74mg/dL, GOT 416UI/I, CK 183 UI/I, Na 136mmol/dL, K 3.0 mmol/dL, Cl 98 mmol/dL, fibrinogeno 300mg/dL. Giemsa staining of blood smears followed by careful microscopic examination can reveal the intraerythrocytic parasites in acute cases. B. caballi can appear pyriform-shaped and occurs in pairs whereas B. equi appears as four pyriform parasites in a Maltese-cross formation. On necropsy, were observed severed icterus oral and mucosa, xantomathosis of subcutaneous tissue. Poliserositis, ascitis, anasarca. In the abdominal cavity was observed massive hemoperitoneum severe, adhesive fibrinous peritonitis by diapedesis. Spleen with hemosiderosis severed. Peritonitis fibrinous adhesive in external surface of small intestine. Severe disseminate coagulate intravascular, hemolysis acute and bacteraemia, septicaemia. In conclusion were reported of case of severed hemoparasitosis complicated in a Thoroughbred horse from Venezuela.*

KEYWORDS: hemoparasites, equine, Piroplasmosis.

HEMOPARASITOSIS SEVERA COMPLICADA EN UN PURA SANGRE DE CARRERAS EN VENEZUELA

RESUMEN: *La Piroplasmosis equina (EP) es una enfermedad causada por el protozoo hemoparásitos Babesia caballi y / o B. (Theileria equi). El objetivo de este estudio fue reportar un caso de hemoparasitosis severa complicada en un caballo Pura Sangre de Venezuela. El equino presento dolor abdominal agudo en 24 horas y 48 horas edema de miembros posteriores y muerte en las 72 horas. La temperatura oscilo entre 41, 2 ° C, presento ictericia y hematuria. Se realizó un estudio multidisciplinario clínicos, de laboratorio, bioquímica, necropsia e histopatología. Hematies: 10,6 mm³, Hb: 16,4 g / dl, Hto: 48%, plaquetas de 305 mm³, los Leucocitos 4,7 x / mm³, neutrófilos 47%, linfocitos 44%, monocitos 1%, Eosinófilos 7%. Total de proteínas 7,2 g / dl, Albúmina 2.8g/dL, 4.4g/dL globulina, glicemia 85mg/dL, urea 29mg/dL, creatinina 3,0 mg / dl. BT 3.07mg/dL, BD 0.33mg/dL, BI 2.74mg/dL, GOT 416UI / l, CK 183 UI / l, Na 136mmol/dL, K 3,0 mmol / dl, Cl 98 mmol / dL, fibrinógeno 300mg/dL. El frotis de sangre coloreado con Giemsa seguido por el examen microscópico revelo parásitos intraeritrocíticos. B. caballi puede aparecer en forma piriforme y se produce en parejas, mientras que B. equi aparece como cuatro parásitos piriformes en una formación de Cruz-Malta. En la necropsia, se observo la mucosa oral y conjuntival icterica, xantomathosis del tejido subcutáneo. Poliserositis, ascitis, anasarca. En la cavidad abdominal se observó hemoperitoneo masivo peritonitis fibrinosa severa adhesiva por diapédesis. Bazo con hemosiderosis, Coagulación intravascular diseminada, hemólisis aguda, bacteremia y septicemia. Se reporto un caso de hemoparasitosis severa complicado en un caballo pura sangre de Venezuela.*

PALABRAS CLAVES: hemoparasitos, equino, Piroplasmosis.

Fecha de recepción: 29/02/12

Fecha de aprobación: 07/08/12

Dirección para correspondencia: A.Morales, eterinary Hospital of National Racetrack "La Rinconada" Department of Veterinary Pathology Central University of Venezuela.

E-mail: diana_villoria@hotmail.com

INTRODUCTION

Equine piroplasmosis (EP) is the disease caused by protozoan hemoparasites *Babesia caballi* and/or *B. (Theileria) equi*. Are obligate intracellular parasites of the phylum Apicomplexa and cause hemoparasitic diseases in horses (1). The natural transmission of these parasites is through competent tick vectors (2). Incidence of clinical infection with *Babesia* organisms is highly variable from location-to-location. Infection depends on many factors: 1) an animal reservoir; 2) a *Babesia* to which humans are susceptible, or a human host who is asplenic or otherwise immunocompromised; 3) a genus of Ixodidae (hard bodied tick) which can transmit the parasite; and 4) a suitable tick habitat. Finally, humans must put themselves at risk by frequenting a tick habitat in an endemic area in the months when infective stages of ticks are feeding. Transfusion transmission can occur anywhere and outside of tick-feeding season, because blood for transfusion can be collected in a different region of the country and asymptomatic donors may carry the parasite (3).

Horses infected with either agent have similar clinical signs. Clinical signs of EP can include fever, anemia, icterus, and anorexia. Digestive tract signs can occur, including colic, constipation, or diarrhea (2). Thus, in some regions of the world where infection is common, little or no clinical disease may be observed in native horses. However, disease is frequently observed in adult horses suddenly introduced into areas with large numbers of infected ticks (2). The aim of this study was to report of case of severe hemoparasitosis complicated in a Thoroughbred horse from Venezuela.

MATERIAL AND METHODS

History: an equine mare Thoroughbred, of 2 year old. The equine present acute abdominal pain in 24 hours and complicated post 48 hours and death in the 72 hours.

Clinical sign: Fever: Temperature oscillate 39.4 °C; 39.6 °C (24 hours), 39.7 °C (48 hours), 40.1 °C; 41;2 °C (72 hours).

Icterus: severe 48 hours.

Hematury: severe 48 hours.

Acute abdominal pain: gastric dilatation, persistent abdominal pain, intestinal motility normal, loss major colon; no refluxed in the 48 hours and abundant and severe refluxed.

Cardiac Frequency: 68, 68 (24 hours), 92, 84 (48 hours), 84, 92 (72 hours), 120, 120 lpm.

Laboratory Test: Bloods of sample were collected previous at mortem.

Treatment: emergence acute abdominal pain: acepromazine, xilacine, Dipirona, flunixin meglumine, clorure potassium, colicor, Ringer lactated 24L, 24L, 40L.

Infectious: Penicillin, enrofloxacin, diminazeno, ivermectina, vitamin B12.

Necropsy: Were examined by necropsy and samples of tissue were recollected (4, 5).

Histopathology: The tissue samples were fixed in formalin and processed by conventional H&E techniques (5).

RESULTS

Laboratory results were: Hematias: 10.6 mm³, Hb: 16.4 g/dL, Hto: 48 %, plaques 305 mm³, Leucocytes 4.7 x/mm³, Neutrophils 47 %, Lymphocytes 44 %, Monocytes 1 %, Eosinophiles 7 %. Total Protein 7.2 g/dL, Albumine 2.8 g/dL, globulin 4.4g/dL, glicemia 85 mg/dL, urea 29 mg/dL, creatinine 3.0 mg/dL. BT 3.07 mg/dL, BD 0.33 mg/dL, BI 2.74 mg/dL, GOT 416 UI/L, CK 183 UI/L, Na 136mmol/dL, K 3.0 mmol/dL, Cl 98 mmol/dL, fibrinogeno 300mg/dL.

Giemsa staining of blood smears followed by careful microscopic examination can reveal the intraerythrocytic parasites in acute cases. *B. caballi* can appear pyriform-shaped and occurs in pairs whereas *B. equi* appears as four pyriform parasites in a Maltese-cross formation. On necropsy, were observed severe icterus oral and mucosa, xantomatosis of subcutaneous tissue. Poliserositis, ascitis, anasarca. In the abdominal cavity was observed massive hemoperitoneum severe, adhesive fibrinous peritonitis by diapedesis. Multiple hemorrhages in the adrenal cortex. Liver with hemorrhages was fibrosis chronic. Multifocal necrotic areas were present in the other lobes. Renal cortical and papillary necrosis, hematury. Spleen presented severe congestion, hemorrhage. Gastric ulcer syndrome severe. Petechiae epicardial hemorrhage. Oedema, congestion and hemorrhage pulmonary. Plastron mesenteric in abdomen cranial. Histopathology revealed severe fatty degeneration and hepatic necrosis. Hemorrhage in adrenal cortex with coagulation necrosis of zone glomerulosa, zone fasciculata and zone reticularis. Acute tubular necrosis, vacuolar degeneration and glycogen nephrosis, hemoglobinuria, glomerulonephritis membranous severe. Spleen with hemosiderosis severe, germinal center development within the lymphoid follicles should be noted as decreased. Reactive extramedullary hematopoiesis may be seen in conjunction with conditions that target the destruction of lymphocytes. Decreased cellularity of the lymphoid follicles, marginal zone and red pulp region were presented. Chronic gastritis surface, erosion focal and hyperkeratosis infiltrated of lymphocytes in the lamina propria. Peritonitis fibrinous adhesive in external surface of small intestine. Severe disseminate coagulate intravascular, hemolysis acute and bacteraemia, septicaemia.

DISCUSSION

The exact pathogenesis of equine babesiosis is not known completely, but metabolic stress placed on the parasitized erythrocytes may cause hypophosphatemia and weakening of erythrocytic cell membranes causing hemolysis (1, 7). Parasitized red cells lyse intravascularly, producing hemoglobinemia in the acute phases of the disease (1, 7). The intravascular hemolysis causes a marked hyperbilirubinemia and icterus can be pronounced in many cases. Hemoglobinuria seems to occur more frequently and severely with *Babesia equi* infections, but can be seen in horses infected with either species. In addition to regenerative hemolytic anemia, a significant monocytosis and eosinopenia may be observed in horses with babesiosis. In severe disease, the intravascular hemolysis produced by the infection may disturb capillary blood flow enough to cause disseminated intravascular coagulation (DIC) and resulting signs of coagulopathy (7). Along with appropriate clinical signs and pathologic findings of hemolytic anemia, the identification of the parasitized erythrocytes on routinely stained blood smears is diagnostic. In cases of chronic or subacute babesiosis, it may not always be possible to visualize the organisms on blood smear examination. In these situations, PCR, ELISA, serology, or a combination of these tests is used to establish a diagnosis. The most commonly used serologic tests are the complement fixation (CF) and indirect fluorescent antibody (IFA) tests.

Gross necropsy findings of horses with babesiosis include thin watery blood, icterus, effusions of the body cavities and pericardium, hepatomegaly, and splenomegaly (1, 2, 7). Several types of polymerase chain reaction (PCR) tests have been developed and are used for research purposes. What role the PCR test will play in the future for determining a horse's infection status is still being determined (2). The recent babesiosis literature continues to support the contention that the pathophysiology of babesiosis has much in common with malaria, sepsis and other systemic inflammatory states. It is now recognised that sepsis can result in both excessive and inadequate inflammation (6, 7).

A wide variety of factors may precipitate sludging: endothelial fibrin and red blood cell bound fibrinogen; strand-type knob-forming membrane changes in parasitized red blood cells; increased plasma viscosity caused by fibrin, fibrinogen, and their complexes; and erythrocyte lipid changes such as externalization of phosphatidylserine. The cellular immune system, including production of cytotoxic TNF-alpha, plays an important role in many of these clinical changes. Parasite and host derived proteases, plasma kallikrein, thrombin and thrombin-like enzymes, and anoxia cause alveolar edema and

an accumulation of neutrophils and red blood cells in pulmonary capillaries (3). Other complications of babesiosis have included retinal infarct, encephalopathy, hepatic failure, renal failure, hemophagocytic syndrome, and autoimmune hemolytic anemia (3). The reticuloendothelial system plays a vital role in nonspecific resistance (3). Specific resistance depends on both humoral and cell-mediated immunity. *Babesia* infection elevates levels of IgG and IgM in animals and humans (3). In vitro observations suggest that immunity may be influenced by humoral factors; phagocytosis of infected cells by splenic macrophages requires antibody, complement, and conglutin (3). The complex interactions between pro- and anti-inflammatory responses were elegantly illustrated in bovine babesiosis (6). A hypo inflammatory immune response might be as detrimental as excessive inflammation, and improved outcome might be achieved if individual immune statuses were known and treatment tailored accordingly (1, 2, 6, 7). This area of investigation is highly relevant to canine babesiosis. In addition to altered immune status, there can be little doubt that babesiosis is characterised by abnormal perfusion and tissue hypoxia, which has major implications for the function of every organ and system in the body. It could be convincingly argued that all critical illness can ultimately result in abnormal tissue perfusion, but it is not difficult to allow that virulent babesiosis and malaria are special cases, in that they involve large intravascular organisms that remain in the vasculature and sequester there.

Profound intravascular, vascular and perivascular pathology has been described (1). There are many potential contributing factors to tissue hypoxia in babesiosis, including microvascular sequestration, severe anemia, altered erythrocyte deformability and hemoglobin function, auto-agglutination, endothelial activation and damage, increased endothelial permeability, disseminated intravascular coagulation, hypotension, pulmonary edema and myocardial dysfunction (7).

In conclusion were reported of case of severed hemoparasitosis complicated in a Thoroughbred horse from Venezuela.

REFERENCES

1. Shuja A, Chihiro S, Misao O. Equine piroplasmosis. *Journal of equine Science*. 7: (4): 67-77, 1996.
2. Traub-Dargatz, J, Short M, Pelzel A, Norman T. Equine Piroplasmosis. *AAEP Proceedings*. Vol. 56:1, 2010.
3. George D. Imes; Ronald C. Neafie; Francis M. Chiricosta; Babesiosis (Piroplasmosis). *Topics on the Pathology of Protozoan and Invasive Arthropod Diseases*. June 1, 2011 Armed Forces Inst Of Pathology Washington Dc.

D. Villoria y col.

4. Aluja A., Constantino C. Technical of Necropsy in domestic animals. 2,ed. Mexico: Manual Moderno. 2002.
5. Banks W. Veterinary Applied Histology. 2, ed. México. Manual Moderno, 1996.
6. Jacobson LS. The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994-2004. Vet Parasitol 31; 138 (1-2):126-39, 2006. Epub 2006 Feb 24.
7. Russell Z. Edwards, Holly Moore, Bruce E. LeRoy, and Kenneth S. Latimer. Class of 2005 (Edwards) and Department of Pathology (Moore, LeRoy, Latimer) College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA 30602-7388.

INTERÉS DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS EN CARDIOLOGÍA VETERINARIA

Meder AR¹, Adagio LM¹, Desmaras EA², Arauz MS³

1 Cátedra de Clínica de Pequeños Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa. 2 Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata 3 Servicio Central de Laboratorio del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: Los péptidos natriuréticos son una familia de hormonas que juegan un papel primario en la regulación de la homeostasis cardiovascular y renal. Tres han sido identificados, el péptido natriurético atrial (ANP), péptido natriurético tipo B (BNP) y péptido natriurético tipo C (CNP). ANP y BNP se sintetizan en el tejido cardíaco atrial y ventricular, respectivamente. En humanos, su concentración se relaciona con enfermedades cardíacas, renales, hipertensión, edad y sexo. Del mismo modo, en caninos y felinos, sus niveles se asocian con distintas patologías cardíacas, renales, hipertensión, obesidad. Actualmente, en animales de compañía, se consideran una herramienta complementaria en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las cardiopatías. El presente trabajo tiene como objetivo llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre los péptidos natriuréticos con la finalidad de poner en discusión sus perspectivas y aplicaciones en el campo de la cardiología veterinaria.

Palabras Clave: Peptidos Natriureticos en cardiologia caninos

INTEREST OF THE NATRIURETIC PEPTIDES IN VETERINARY CARDIOLOGY

ABSTRACT: The natriuretic peptides are a family of hormones that play a primary role in the regulation of the cardiovascular and renal homeostasis. Three have been identified: the atrial natriuretic peptide (ANP), B type natriuretic peptide (BNP) and C type natriuretic peptide (CNP). The ANP and BNP are synthesized in the atrial and the ventricular cardiac tissue, respectively. In humans, they were related with cardiac and renal disease, hypertension, age and sex. In the same way, in canines and felines were also related with different cardiac pathologies, renal disease, hypertension, obesity. At present, they are considered a complementary tool in the diagnosis, treatment and prognosis in companion animal's patients with cardiac disease. The objective of the present work was to carried out a bibliographic review among the actual natriuretic peptides available in the field of veterinary cardiology.

Key word: Natriuretic Peptides in dog cardiology

Fecha de recepción: 04/08/11

Fecha de aprobación: 30/07/12

Dirección para correspondencia: A.R. Meder, Cátedra de Clínica de Pequeños Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa. Argentina.

E-mail: albertomeder@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

En la clínica veterinaria de animales de compañía, el diagnóstico y la evaluación de la función cardíaca se realizan, tradicionalmente, a partir del examen clínico junto a una serie de estudios complementarios diagnósticos que comprenden la electrocardiografía, radiología torácica y ecocardiografía. Dentro de éstos, la ecocardiografía, el método diagnóstico más apropiado para la evaluación cardíaca, tanto convencional como Doppler, puede no estar disponible para todos los pacientes por su costo, el tiempo que requiere su realización y la experiencia que demanda por parte del operador.

En los últimos años, principalmente en medicina humana, los biomarcadores cardíacos han cobrado una importancia fundamental y ocupan un primer plano en el diagnóstico y seguimiento de las cardiopatías. De manera similar, en la actualidad, los péptidos natriuréticos proporcionan nuevas y prometedoras perspectivas en cuanto a su utilidad en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de las patologías cardíacas en caninos y felinos. Este artículo pretende realizar una revisión bibliográfica sobre los péptidos natriuréticos con la finalidad de poner en discusión las perspectivas y las posibles aplicaciones que ofrecen los mismos a la cardiología veterinaria.

ORIGEN

Los péptidos natriuréticos (NP) son una familia de hormonas (1) que juegan un importante rol en la regulación de la homeostasis cardiovascular y renal (2), a partir de su actividad vasodilatadora, natriurética, antagonista del sistema renina angiotensina aldosterona (3, 4, 5), lusinotrópica (6) e inhibitoria de la fibrosis cardíaca (7). El primero en ser descubierto (8) y secuenciado (9) fue el Péptido Natriurético Atrial (ANP). Los restantes miembros, Péptido Natriurético Tipo B (BNP) y Péptido Natriurético Tipo C (CNP), fueron caracterizados en 1989 (10) y en 1990 (11). El ANP se presenta en mayor concentración en el tejido cardíaco atrial (8, 9) y es almacenado en forma de gránulos de rápida liberación (12, 13). El BNP, originalmente descubierto en tejido cerebral porcino (14), es sintetizado y liberado, tanto por miocitos atriales como ventriculares, sin un proceso de almacenamiento extenso (15, 16, 17). El CNP, el miembro más recientemente descubierto, es sintetizado en las células endoteliales vasculares (18) y presenta una alta concentración en el sistema nervioso central en comparación con los bajos niveles que se observan tanto en tejido cardíaco como sanguíneo (11).

ESTRUCTURA MOLECULAR

El análisis estructural muestra que los NP presentan un anillo central en común, constituido por 17 aminoácidos, y dos cadenas peptídicas,

adheridas a éste, en las cuales se expresan las principales diferencias genéticas (9, 11). El ANP es sintetizado como un polipéptido precursor de 126 aminoácidos (proANP-126), el cual, luego de su liberación a sangre, es escindido en dos fragmentos menores, la fracción carboxilo terminal biológicamente activa de 28 aminoácidos (C-ANP 99-126) y la fracción amino terminal de 98 aminoácidos residual (Nt-proANP 1-98) (19). EL BNP, de forma similar al ANP, es sintetizado y liberado a la circulación como una prohormona glicosilada (20) de 108 aminoácidos denominada proBNP (4, 21, 22). Una vez en el torrente sanguíneo esta es proteolíticamente dividida en dos fragmentos por una proteasa sérica (23) ubicada en la membrana de los miocitos cardíacos (24), la fracción carboxilo terminal no glicosilada (20) de 32 aminoácidos, biológicamente activa, denominada C-BNP o BNP 1-32 (25, 26) y un fragmento amino terminal glicosilado, (20) de 76 aminoácidos residual inactivo, denominado Nt-proBNP (27, 28, 29, 30). El BNP 1-32, luego de cumplir su actividad biológica, es clivado por una dipeptidil aminopeptidasa IV (DPP4) a BNP 3-32 (31). Ya que este último presenta acciones significativamente inferiores al BNP activo esta molécula sea, probablemente, el primer paso en el proceso de degradación de este péptido (5).

MECANISMO DE ACCIÓN

Los péptidos natriuréticos ejercen su actividad biológica al unirse a receptores celulares específicos presentes en el endotelio y células musculares lisas de los vasos sanguíneos (32), riñones, pulmones y miocitos cardíacos (33). Tres tipos de receptores han sido caracterizados (34,35). Dos de estos, el receptor de péptidos natriuréticos tipo A (NPR-A) y el receptor de péptidos natriuréticos tipo B (NPR-B), presentan actividad Guanil Ciclasa (CG) y median su acción a partir de la producción del segundo mensajero Guanosil Monofosfato Cíclico (GMPc) (36). Por su parte, el tercero, denominado receptor de péptidos natriuréticos tipo C (NPR-C), tiene como función remover de la sangre las formas biológicamente activas de los péptidos natriuréticos (37, 38). Esta última función, es también compartida con endopeptidasas neutras presentes en la circulación sanguínea, aunque a diferencia de NPR-C, éstas degradan ANP fundamentalmente y en menor proporción BNP (39, 40).

ANP y BNP estimulan la producción de GMPc a partir de la activación del receptor NPR-A (41, 42,43). CNP, en cambio, estimula la producción de GMPc a partir de su acción específica sobre el receptor NPR-B (44). El GMPc generado, a partir de la activación de la CG, es degradado, luego de cumplir con su actividad biológica, por enzimas con actividad fosfodiesterasa, como la PDE₅ (42), la cual se encuentra en riñones, co-

razón y vasos sanguíneos (45). Los fragmentos inactivos Nt-proANP y Nt-proBNP, por su parte, son excretados sin modificaciones vía renal, en contraste con la eliminación vía receptores específicos y/o enzimas de degradación que sufren los fragmentos activos (46). Presentan, además, una menor variabilidad biológica (47,48) y una mayor vida media que las fracciones activas (49).

FISIOPATOLOGÍA

ANP y BNP son liberados por el tejido cardíaco en respuesta a incrementos en el estrés parietal de atrios y ventrículos (50). La síntesis, regulación y liberación de éstos péptidos presentan diferencias puntuales entre sí (51).

El estímulo primario para la liberación de ANP es la sobrecarga de volumen y/o presión que soportan los atrios cardíacos, independientemente de cuál sea la etiología de la patología cardiovascular. En respuesta a la misma, los niveles sanguíneos de ANP aumentan rápidamente como consecuencia, en primer lugar, de la rápida descarga a partir de los gránulos de reserva ubicados en los miocitos atriales y, en segundo lugar, por el incremento de su síntesis (52). A pesar de ésta pronta respuesta y de la elevación temprana de los niveles sanguíneos, frente a patologías cardíacas crónicas los niveles de ANP no se elevan en la misma proporción que en los primeros estadios (51).

En animales sanos, la mayor parte del BNP circulante se origina, en forma primaria y de manera similar a ANP, a partir de la síntesis y liberación de los miocitos atriales y, en forma secundaria, de miocitos ventriculares (52). Una diferencia significativa entre BNP y ANP radica en que, el primero, no presenta un proceso de almacenamiento extenso en las células cardíacas que le permitan una rápida liberación frente a condiciones patológicas (53). De esta forma, el estiramiento de la pared atrial y, principalmente, el estrés parietal ventricular desencadenan la síntesis y liberación gradual de BNP con el consecuente aumento de su concentración plasmática (29). Aumentos marcados, como los que se observan en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, son provocados, a su vez, por el incremento de la síntesis proteica a partir de una mayor regulación génica en ventrículos cardíacos primariamente (4,54). Así, y a diferencia de ANP, los niveles de BNP incrementan de una manera más lenta, pero más persistente, como consecuencia de cambios hemodinámicos crónicos (55, 53). La síntesis y secreción de BNP se incrementa, de esta forma, en respuesta a fuerzas hemodinámicas como las que se generan a partir de la sobrecarga de volumen y/o presión que soportan las cámaras ventriculares principalmente (56). En síntesis, los niveles circulantes de BNP se correlacionan positivamente con la severidad

de la insuficiencia cardíaca (57) y proporcionan un sensible biomarcador para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la insuficiencia cardíaca (58,59).

DETERMINACIÓN

La determinación de las concentraciones circulantes de los péptidos natriuréticos se considera parte de los análisis que se realizan para diagnosticar enfermedades cardíacas en el hombre (60). El requisito fundamental para utilizar un péptido como biomarcador es que exista una prueba confiable, tanto en su sensibilidad como en su especificidad (61).

Los polipéptidos precursores, así como los fragmentos activos e inactivos presentan diferencias significativas, tanto en ANP como en BNP, que van más allá de su actividad biológica y que son determinantes a la hora de cuantificar las concentraciones séricas o plasmáticas de los mismos. Estas diferencias muestran que los fragmentos inactivos, Nt-proANP y Nt-proBNP, son utilizados como test diagnóstico en pacientes humanos, en lugar de los fragmentos activos C-ANP y C-BNP, ya que son más estables a temperatura ambiente (62) y presentan una vida media más larga que los fragmentos activos (63). Así, a modo de ejemplo, la vida media de C-BNP en caninos es de 1.5 min, considerablemente inferior que la del fragmento inactivo, (63) y la de GMPc, generado a partir de su acción biológica, es de unos 30 min (64). Las determinaciones de los NP en suero y plasma muestran resultados discrepantes a partir de distintos estudios. Kellihan y otros, observaron concentraciones más altas en muestras séricas en comparación con las plasmáticas, obtenidas de forma pareada a partir de pacientes caninos sanos (65), en contraposición con otros resultados, también en caninos sanos, donde no se observaron diferencias significativas (66).

La secuencia molecular de ANP y BNP, por otra parte, a pesar de estar altamente conservada entre las especies mamíferas, presentan diferencias significativas. Así, por ejemplo, el ANP canino muestra un 87% de homología con el ANP humano (67), mientras que BNP muestra sólo un 43% de homología entre estas especies (68, 17). Esto generó dificultades, en un principio, para determinar los niveles circulantes de los NP, en caninos y felinos, cuando se empleaban test humano específicos. Por esta razón se han desarrollado test caninos y felinos (69) específicos, tanto para los fragmentos activos como residuales de los péptidos ANP (66) y BNP (61) y se encuentran disponibles comercialmente, en la actualidad, por diferentes laboratorios. A pesar de estos recientes ensayos, y de la alta especificidad y sensibilidad que poseen, los mismos son incapaces de distinguir entre las formas circulantes de C-ANP versus proANP, C-BNP versus

proBNP, Nt-proANP versus proANP y Nt-proBNP versus proBNP (22). La razón para esto es que el fragmento activo y el inactivo comparten, cada uno por separado con el polipéptido precursor, los extremos carboxilo terminal y amino terminal, respectivamente. Lo expresado aquí determina que, cuando se cuantifica el fragmento activo por ejemplo, los valores hallados son el resultado de la suma de la fracción activa y del precursor polipeptídico que da origen a la misma (22).

DIAGNÓSTICO DE CARDIOPATÍAS

En los últimos años los NP ocupan un lugar destacado dentro del diagnóstico de las cardiopatías humanas. Su determinación es recomendada como uno de los primeros pasos del examen clínico cardiológico (70, 71, 72, 73) y es utilizada, a su vez, como guía para evaluar el tratamiento y el pronóstico en esos pacientes (74, 75, 76, 77, 78, 79). Las investigaciones recientes en medicina veterinaria, por su parte, proporcionan nuevas perspectivas en la evaluación de la función cardíaca del perro y el gato. A continuación exponemos los principales hallazgos y utilidad clínica en estas especies.

CARDIOPATÍAS EN CANINOS

En pacientes caninos los NP permiten realizar el diagnóstico, evaluación y monitorear el tratamiento de la enfermedad cardíaca (60), con ciertas limitaciones puntuales. Los niveles sanguíneos de C-ANP (80, 81), Nt-proANP (66), C-BNP (82) y Nt-proBNP (83) permiten diferenciar caninos con enfermedad cardíaca, \geq Clase II de la International Small Animal Cardiac Health Council Heart Failure Classification (ISACHC), de caninos sanos correlacionándose, dicha concentración, con el grado de murmullo cardíaco, los hallazgos en el examen físico, radiológico y ecocardiográfico. Permiten distinguir, a su vez, entre caninos con insuficiencia cardíaca congestiva, Clase II ó III (ISACHC), de pacientes con enfermedad cardíaca sin signos de congestión (84, 85, 17, 82, 60). La concentración de los NP, de igual forma, se encuentra más elevada en pacientes Clase II con enfermedad cardíaca activa que en pacientes Clase II con enfermedad cardíaca compensada, sugiriendo que la concentración de los NP (Nt-proBNP) disminuye en respuesta al tratamiento (60) y aumenta significativamente a medida que se hace más severa la enfermedad cardíaca (86, 60, 66). En estos pacientes, por otra parte, las concentraciones de C-BNP (87), Nt-proANP (87) y Nt-proBNP (88) permiten distinguir si las causa de tos y disnea, obedecen a un origen cardíaco o no cardíaco (pulmonar). En pacientes Clase Ia (ISACHC), por otro lado, la concentración de los NP (Nt-proBNP) es comparativamente inferior

que en pacientes caninos Clase Ib (pacientes con enfermedad cardíaca subclínica con exámenes complementarios que evidencian la presencia de enfermedad cardíaca). Es, en la sensibilidad de los NP en estos últimos pacientes, donde se presentan la zona más gris de la utilidad de este biomarcador. Los valores de corte establecidos por los distintos laboratorios son claramente eficaces en distinguir caninos sanos de los Clase II y III, pero en los Clase I, tanto a como b, se encuentra una proporción importante de falsos positivos y negativos, que no hacen posible, hasta el momento, su uso como único medio para realizar el diagnóstico de enfermedad cardíaca con certeza. Esta variabilidad puede obedecer a causas raciales (60) ó a factores que deben ser más profundamente estudiados como la edad, el sexo, etc. (89).

Dentro de las principales patologías cardíacas, que afectan a los caninos domésticos, los NP también presentan hallazgos significativos. En pacientes con enfermedad valvular crónica (CVD) las concentraciones de los NP (Nt-proANP/Nt-proBNP) permiten diferenciar entre caninos con severa regurgitación mitral y aquellos con leve a moderada regurgitación mitral (66, 90). Cuando los pacientes con CVD presentan, a su vez, insuficiencia cardíaca congestiva se manifiesta una positiva correlación entre la concentración de los NP circulantes y la severidad de la patología valvular, el grado de mortalidad y el tamaño del jet de regurgitación (81, 82, 90). Las concentraciones de los NP (Nt-proBNP), por ejemplo, para los estadios clase Ia, Ib, II y IIIa (ISACHC) fueron de 302,8 +/- 257,1, 634,2 +/- 642,5, 1277,9 +/- 756,2 y 1908,9 +/- 538,8 pmol/l, respectivamente. Esto pone en evidencia que la concentración en pacientes grado Ib, o más grave, fue significativamente más alta que en los controles sanos y que en pacientes asintomáticos con exámenes complementarios normales. La misma aumenta progresivamente, a su vez, con la severidad de la insuficiencia cardíaca y se asocia con la clasificación del estado de la función cardíaca realizada por la ISACHC (89). En pacientes con soplos cardíacos de grado 1/6 a 2/6, por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la concentración de los NP (Nt-proBNP) comparada con los controles sanos. En caninos con soplos 3/6 o mayores, en cambio, la concentración de NP fue significativamente más elevada que en los controles sanos y se correlacionó positivamente con la intensidad del soplo cardíaco (89). La concentración circulante (Nt-proBNP) se correlacionó positivamente con la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria, el tamaño cardíaco vertebral (VHS), la relación Ao/AI (89), la relación Ao/DVID, la relación Ao/DVIS, la uremia, la creatinemia y negativamente con la cloremia en estos pacientes (60, 90). De esta manera, los

hallazgos en el diagnóstico por imágenes y los niveles de los NP (Nt-proBNP) se asocian positivamente con la severidad de la CVD (89). En este tipo de patología, por último, la concentración de los NP (Nt-proBNP) fue significativamente mayor en pacientes con hipertensión pulmonar asociada a insuficiencia valvular mitral comparada con caninos sanos y disminuyó significativamente a partir de la terapia con pimobendan en la primeras etapas de tratamiento. Información reciente sugiere que, además, caninos con hipertensión pulmonar asociada a patología cardíaca o no, presentan concentraciones de NP (Nt-proBNP) significativamente más elevadas en comparación con pacientes caninos afectados de enfermedades respiratorias primarias (88, 60, 90). Esta hipótesis se refuerza al observar que en caninos con insuficiencia cardíaca el inhibidor específico de la PDE₅, Sildenafil, mejoró los efectos hemodinámicos de los NP exógenos (C-BNP) en la circulación pulmonar. Estos hallazgos soportan la idea del rol de la PDE₅ como desensibilizante de la acción de los NP sobre su actividad en la vasculatura sistémica (91). Esta última actividad sumada a la disminución concomitante de la síntesis de GMPc, en pacientes con insuficiencia cardíaca, genera efectos adversos como la disminución de la actividad de los receptores NPR-A, una mayor acción de los receptores NPR-C y un incremento en el catabolismo de GMPc por una mayor producción de PDE₅ (92).

Dentro de las restantes causas de enfermedad cardíaca, presentes en caninos domésticos, se evidencian los mismos hallazgos que para la CVD, pero se presentan particularidades que merecen su consideración. Las concentraciones de C-BNP y Nt-proBNP (60) permiten diferenciar, significativamente, entre las distintas causas de enfermedad cardíaca y muestran que los pacientes con cardiomiopatía dilatada presentan niveles de NP mucho más elevados que aquellos afectados por otras causas de enfermedad cardíaca independientemente de la severidad que presente la patología. En caninos de la raza Bóxer con cardiomiopatía arritmogénica de ventrículo derecho, una variante de cardiomiopatía dilatada, la concentración de NP (C-BNP) se halla sensiblemente más baja cuando se la compara con los niveles circulantes de NP presentes en otras razas caninas con cardiomiopatía dilatada y en similares estadios de la enfermedad (93). En caninos Doberman Pinschers, con cardiomiopatía dilatada idiopática, en cambio, la concentraciones de los NP (C-ANP/Nt-proBNP) se hallan significativamente más elevadas en comparación con caninos de otras razas gigantes con esta misma afección (94, 95). Otros estudios realizados en una colonia de Golden retriever con miocardiopatía distrófica oculta mostraron, además, un incremento en los niveles circulantes de

C-BNP cuando se comparaba a estos pacientes con controles sanos (96). En modelos caninos experimentales de estenosis aórtica, que originan cambios a nivel miocárdico, se observó que las concentraciones de C-ANP se incrementa en forma temprana ante sobrecargas de volumen y/o presión sobre las cámaras cardíacas, en cambio, C-BNP se eleva más lentamente pero de forma constante y sus niveles se correlacionan significativamente con las alteraciones halladas a partir del examen ecocardiográfico (97). Estas observaciones concuerdan con las halladas en pacientes humanos, con enfermedad cardíaca, en donde una de las mayores causas de incremento de C-BNP es el aumento del estrés parietal que sufre la pared ventricular izquierda al final de la diástole (98). Así, en estos modelos caninos, la presión diastólica final del ventrículo izquierdo y el espesor del septum interventricular en diástole son predictores de la concentración de los NP (Nt-proBNP) (97). El taponamiento cardíaco, por último, no presenta niveles significativos de C-BNP que permitan diferenciarlo de un paciente sano y/o de pacientes con enfermedad cardíaca asintomática leve a moderada. Iguales hallazgos se han obtenido en pacientes humanos (99).

CARDIOPATÍAS EN FELINOS

La asociación entre las cardiopatías felinas y los NP presentan una relación similar a la observada en los caninos pero con ciertas particularidades propias de la especie. Los niveles de los NP (Nt-proANP y Nt-proBNP) han demostrado su utilidad para diferenciar entre pacientes felinos con enfermedad cardíaca de pacientes felinos sanos (100, 101, 97). En un ensayo apareado, entre los dos péptidos mencionados anteriormente y que hace hipotetizar que las formas activas se comportan de manera similar, se observó que ambos resultan útiles para diferenciar pacientes felinos con enfermedad cardíaca sintomática de felinos sanos con una diferencia significativa ($P = 0.011$) a favor de Nt-proBNP. En este estudio, las concentraciones halladas de Nt-proANP no presentaron la misma sensibilidad que los niveles de Nt-proBNP para distinguir entre felinos con enfermedad cardíaca sin signos de insuficiencia cardíaca congestiva de felinos sanos, arrojando un número no menor de falsos negativos. Las razones probables, para esta última desventaja, se pueden fundamentar en el grado variable de distensión o estrés parietal que soportan los atrios cardíacos en la enfermedad cardíaca asintomática en comparación con las significativas alteraciones que sufren los mismos en la insuficiencia cardíaca congestiva (102, 100). En pacientes felinos con insuficiencia cardíaca congestiva se presenta siempre un estímulo importante, sobre la pared atrial, que induce una síntesis significativa de Nt-proANP, mejorando

la sensibilidad del mismo frente a felinos asintomáticos y sanos (101). Es decir, Nt-proBNP es significativamente superior a Nt-proANP para diferenciar entre felinos con enfermedad cardíaca asintomática y felinos sanos (101). La concentración de este último, en pacientes felinos con cardiomiopatía hipertrófica, se ha encontrado estar aumentada unas 10 veces en comparación con felinos sanos. Este importante aumento, es generado como resultado del incremento en la expresión miocárdica de proBNP, pero no de Nt-proANP, tanto en atrios como en ventrículos cardíacos (102, 103). Hallazgos similares se han encontrado en pacientes felinos con insuficiencia cardíaca congestiva, independientemente de la causa de la misma (104). La remodelación crónica del ventrículo izquierdo, en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica, es el estímulo para el aumento progresivo en la síntesis de proBNP (101). El valor de corte observado en felinos, por ejemplo para Nt-proBNP, que permite distinguir entre felinos sanos de felinos con enfermedad cardíaca presenta una concentración de 49 fmol/ml (Feline Cardioscreen Nt-proBNP Guilday Ltd, Biomedica Guildford, Surrey, UK) con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 83,3% (101). Aumentos en la concentración de los péptidos natriuréticos han sido identificados en pacientes humanos con cardiomiopatía hipertrófica (105), estando, en estos casos, la concentración de Nt-proBNP correlacionada positivamente con el grado de severidad del proceso hipertrófico (9), asociado al aumento espesor de la pared libre del ventrículo izquierdo (100).

Los niveles de los NP (Nt-proBNP) permiten diferenciar entre causas de disnea de origen cardíaco de aquellas de origen no cardíaco o respiratorio (106). La concentración del mismo se encuentra significativamente más elevada, de esta forma, en felinos con enfermedad cardíaca que en felinos con enfermedad respiratoria primaria (107). La concentración de los NP, por otra parte, no tuvo diferencias significativas entre machos y hembras con insuficiencia cardíaca o entre las distintas causas de insuficiencia cardíaca, pero se correlaciona negativamente con la edad en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva y positivamente con el aumento de espesor del septum interventricular y de la pared libre al final de la diástole (107). Por último, la concentración de Nt-proBNP, se correlaciona con el peso corporal, el diámetro ventricular sistólico y diastólico, la fracción de acortamiento, el tamaño cardíaco vertebral, la concentración sérica de tiroxina, creatinina, urea y Troponina I (107).

ACTIVIDAD EN ÓRGANOS NO MIOCÁRDICOS

Los NP, como se mencionó en los primeros párrafos, juegan un importante rol en la regu-

lación de la homeostasis cardiovascular y renal (28). Modificaciones en la función de órganos no miocárdicos o variables sistémicas, como el riñón (108) y la presión arterial (109) respectivamente, alteran los niveles circulantes de los NP, de manera independiente de la función cardíaca. En caninos la concentración de los NP se correlaciona con la función renal (108). En estos pacientes, con insuficiencia renal crónica, los niveles de NP (Nt-proBNP) se hallaron 2 veces más elevados comparados con caninos sanos (80), en concordancia con estudios realizados en humanos con C-BNP (110). En estos últimos se observó una fuerte correlación negativa con el grado de filtración glomerular (111, 112, 113) y que, además, las mismas están afectadas por el índice de masa corporal y la edad del paciente (114). En recientes estudios realizados en caninos y felinos, se demostró que la concentración de los NP se correlaciona positivamente con los niveles séricos de urea y creatinina, tanto, en pacientes caninos sanos como en los que presentan enfermedad renal, enfermedad cardíaca (66) o cuando se presentan ambas disfunciones juntas. La función renal, por lo tanto, puede influenciar los valores de corte para el diagnóstico de enfermedades cardíacas puras y/o mixtas. La concentración de los NP (Nt-proBNP) se correlaciona, a su vez, significativa y positivamente con la edad y la severidad de la enfermedad renal en felinos (109), de manera similar a lo que se presenta en pacientes humanos gerontes o con insuficiencia renal (80).

La presión sistémica es otra variable orgánica que incide sobre la concentración circulante de los NP. Los niveles séricos de NP (Nt-proANP y Nt-proBNP) se correlacionan positivamente con la presión arterial sistólica en felinos domésticos (109) y sus determinaciones permiten diferenciar entre pacientes normotensos con enfermedad renal crónica, de hipertensos con enfermedad renal crónica y de pacientes felinos sanos. En lo que respecta a las distintas determinaciones utilizadas, sólo Nt-proBNP fue estadísticamente significativo para diferenciar felinos normotensos de hipertensos, ambos con enfermedad renal crónica, estando más elevada en los últimos. De esta manera, tanto la hipertensión arterial como las patologías renales producen aumentos en la concentración de los NP (109).

DISCUSIÓN: RELACIÓN CON VARIABLES CONSTITUTIVAS

Los niveles circulantes de NP, publicados en los distintos ensayos hasta el momento, se han asociado con resultados diferentes a las variables constitutivas y raciales. En lo que respecta a las primeras, edad, sexo, estado reproductivo, peso y tamaño corporal, varios ensayos no hallaron

correlación entre estas y la concentración sérica o plasmática de los NP (Nt-proBNP) tanto en pacientes con enfermedad cardíaca como en pacientes sanos (115, 66,60, 90, 65). Si, en cambio, observaron diferencias entre caninos de raza pura y mestizos, estando, la concentración de los NP (Nt-proBNP), más elevada en los primeros en la población general sanos-enfermos (60). Por su parte, sobre un estudio en 330 caninos (sanos + enfermos cardíacos + enfermos no cardíacos), De Francesco et al, hallaron diferencias en relación a la edad y el sexo de los pacientes de manera similar a otros ensayos (89). En este, se observó que los machos presentaban niveles $\frac{1}{4}$ más elevados que las hembras en igual forma que los mayores de 8 años con respecto a los menores de 8 años de edad. En pacientes humanos, por su parte, se presentan correlaciones significativas con la edad, el sexo, la raza, la condición corporal y la función renal. Se observan mayores niveles en mujeres que en hombres y en adultos que en jóvenes (116, 117, 118). Es importante mencionar que estos últimos estudios son multicéntricos y con un muestreo muy amplio.

La obesidad en estos pacientes, se correlaciona negativamente, a su vez, con la concentración de los NP a causa, probablemente, de una disminución en la síntesis o secreción de los NP (Nt-proBNP) (119). En caninos de la raza Cavalier King Charles Spaniels con regurgitación mitral adquirida se observa una relación inversa entre el peso corporal y las concentraciones de los NP (Nt-proANP - Nt-proBNP). La razón para estos hallazgos es probablemente la pérdida ponderal que sufren estos pacientes a causa de la enfermedad cardíaca (90).

Por último, se observa una amplia variabilidad individual y semanal, en las concentraciones de los NP (Nt-proBNP) en caninos sanos (65). Estos hallazgos concuerdan con resultados obtenidos en pacientes humanos (120), en los cuales las variaciones diarias en los niveles de los NP (Nt-proBNP) son hasta del 50%, en pacientes con enfermedad cardíaca compensada pudiendo claramente influir en la interpretación de los resultados (121). Estas mismas variaciones en caninos quedan aún por ser estudiadas al igual que la relación con variables constitutivas y raciales.

PERSPECTIVAS

En los Estados Unidos, se ha aprobado, recientemente, el uso comercial de una forma recombinante de BNP en medicina humana (nesitide, Scios Inc. Fremont, CA) para el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. Varias investigaciones han demostrado que la administración EV (122) o SC (123), de esta droga, incrementa la concentración plasmática de BNP, disminuye la presión arterial pulmonar

y sistémica, aumenta la filtración glomerular, reduce las presiones camerales ventriculares e incrementa los índices cardíacos sin producir una activación neurohumoral y/o generar tolerancia a la administración a la droga (124). La combinación de BNP comercial y un inhibidor específico de la PDE₅ (Sildenafil) en estos mismos pacientes, a su vez, ha presentado mejorías clínicas prometedoras (124). Estos hallazgos, realizados a partir de modelos animales caninos, resultan clínicamente relevantes para su inclusión en protocolos terapéuticos en las distintas afecciones cardíacas de los animales de compañía, ya que la administración exógena de C-BNP, en caninos con insuficiencia cardíaca, ha logrado aumentar los niveles de NP circulantes (125). Nuevos trabajos de investigación en caninos y felinos son precisos para determinar si los efectos beneficiosos observados en pacientes humanos se presentan en los animales de compañía con enfermedad cardíaca.

CONCLUSIONES

Utilizados en conjunción con otros estudios diagnósticos complementarios, la determinación de los niveles circulantes de los NP, proveen sólidas evidencias para refutar o confirmar un diagnóstico de insuficiencia cardíaca en pacientes caninos y felinos. Y, al incrementar con el grado o severidad de la insuficiencia cardíaca, presentan una potencial utilidad para realizar el monitoreo terapéutico y el pronóstico en estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wilkins MR, Redondo J, Brown LA. The natriuretic-peptide family. *Lancet*. 1997;349:1307-1310
2. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med*. 1998;339:312-328
3. Turk JR. Physiologic and pathophysiologic effects of natriuretic peptides and their implications in cardiopulmonary disease. *J Am Vet Med Assoc*. 2000;216:1970-1976
4. Sisson DD. Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2004;34:1105-1026
5. Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Harty GJ, et al. Des-serine-proline brain natriuretic peptide 3-32 in cardiorenal regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:R897-R901.
6. Boerrigter G, Burnett JC Jr. Recent advances in natriuretic peptides in congestive heart failure. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004;13:643-652.
7. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, et al. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:4239-4244.
8. De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg A. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*. 1981;28:89-94.

9. Oikawa S, Imai M, Ueno A, et al. Cloning and sequence analysis of polypeptide. *Nature*. 1984;309:724-726
10. Saito Y, Nakao K, Itoh H, et al. Brain natriuretic peptide is a novel cardiac hormone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;158:360-368.
11. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;168:863-870.
12. De Bold AJ. Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules. *Can J Physiol Pharm*. 1982;60:324-330
13. Canaff L, Brechler V, Reudelhuber TL, et al. Secretory granule targeting of atrial natriuretic peptide correlates with its calcium-mediated aggregation. *Proc Nat Acad Sci Unit Sta Am*. 1996;93:9483-9487
14. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988;332:78-81
15. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans: evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest*. 1991;87:1402-1412.
16. Magga J, Vuolteenabo O, Tokola H, et al. Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms in cardiac overload-induced increase of B-type natriuretic peptide gene expression. *Circ Res*. 1997;81:694-702.
17. Asano K, Murakami M, Endo D, et al. Complementary DNA cloning, tissue distribution, and synthesis of canine brain natriuretic peptide. *Am J Vet Res*. 1999;60:860-864.
18. Clavell A, Stingo A, Wei CM, et al. C-type natriuretic peptide: a selective cardiovascular peptide. *Am J Physiol Reg Integrative Comp Physiol*. 1993;264:R290-R295.
19. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, et al. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*. 1994;90:195-203.
20. Schellenberger U, O'Rear J, Guzzetta A, et al. The precursor to B-type natriuretic peptide is an O-linked glycoprotein. *Arch Biochem Biophys*. 2006;451:160-166.
21. Giuliani I, Rieunier F, Larue C, et al. Assay for measurement of intact B-type natriuretic peptide pro-hormona in blood. *Clin Chem*. 2006;52:1054-1061.
22. Liang F, O'Rear J, Schellenberger U, et al. Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1071-1078.
23. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:8525-8529.
24. Hooper JD, Scarman AL, Clarke BE, et al. Localization of the mosaic transmembrane serine protease corin to heart myocytes. *Eur J Biochem*. 2000;267:6931-6937.
25. Seilhamer JJ, Arfsten A, Miller JA, et al. Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;165:650-658.
26. Goetze JP. Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: the endocrine heart revisited. *Clin Chem*. 2004;50:1503-1510.
27. Shimizu H, Masuta K, Aono K, et al. Molecular forms of human brain natriuretic peptide in plasma. *Clin Chim Acta*. 2002;316:129-135.
28. Goetze JP, Rehfeld JF, Videbeck R, et al. B-type natriuretic peptide and its precursor in cardiac venous blood from failing hearts. *Eur Heart Fail*. 2005;7:69-74.
29. Maack T. The broad homeostatic role of natriuretic peptides. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2006;50:198-207.
30. Hogenhuis J, Voors AA, Jaarsma T, et al. Anemia and renal dysfunction are independently associated with BNP and Nt-proBNP levels in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2007;9:787-794.
31. Brandt I, Lambeir AM, Ketelslegers JM, et al. Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-serine form. *Clin Chem*. 2006;52:82-87.
32. Sabrane K, Kruse MN, Fabritz I, et al. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J Clin Invest*. 2005;115:1666-1674.
33. Cataliotti A, Schirger JA, Martin FL, et al. Oral human brain natriuretic peptide activates cyclic guanosine 3'5'-monophosphate and decreases mean arterial pressure. *Circulation*. 2005;112:836-840.
34. Koller K, Goeddel D. Molecular biology of the natriuretic peptide and their receptors. *Circulation*. 1992;86:1081-1088.
35. Richards AM. The rennin-angiotensin-aldosterone system and the cardiac natriuretic peptides. *Heart*. 1996;76:36-44.
36. Holtwick R, Gotthardt M, Skrybin B, et al. Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:7142-7147.
37. Maack T, Suzuki M, Almeida FA, et al. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Sci*. 1987;238:675-678.
38. Almeida FA, Suzuki M, Scarborough RM, et al. Clearance function of type C receptors of atrial natriuretic peptide factor in rats. *Am J Physiol*. 1989;256:469-475.
39. Kenny AJ, Bourne A, Ingram J. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopetidase-24-11. *Biochem*. 1993;291:83-88.
40. Ozaki J, Shimizu H, Hashimoto Y, et al. En-

- zymatic inactivation of major circulating forms of atrial and brain natriuretic peptides. *Eur J Pharmacol.* 1999;370:307-312.
41. Zhou HL, Fiscus RR. Brain natriuretic peptide (BNP) causes endothelium-independent relaxation and elevation of cyclic GMP in rat thoracic aorta. *Neuropeptides.* 1989; 14:161-169.
42. Kuhn M. Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A. *Circ Res.* 2003;93:700-709.
43. Kuhn M. Molecular physiology of natriuretic peptide signaling. *Basic Res Cardiol.* 2004;99:76-82.
44. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GI, et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science.* 1991;252:120-123.
45. Takimoto E, Champion HC, Li M, et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med.* 2005;11:214-222.
46. Luchner A, Hengstenberg C, Lowel H, et al. Effect of compensated renal dysfunction on approved heart failure markers: direct comparison of brain natriuretic peptide (BNP) and N-terminal pro-BNP. *Hypertension.* 2005;46:118-123.
47. McDowell G, Patterson C, Maguire S, et al. Variability of Nt-proANP and C-ANP. *Eur J Clin Invest.* 2002;32:545-548.
48. Fontana M, Zyw L, Poletti R, et al. Improved early diagnosis of heart failure with B-type natriuretic peptides: comparison between BNP and Nt-proBNP diagnostic accuracy. *Eur J Heart Fail.* 2007;6,14.
49. Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, et al. Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload. *Hypertension.* 2000;36:355-359.
50. Roncon-Albuquerque R, Vasconcelos M, Lourenco AP, et al. Acute changes of biventricular gene expression in volume and right ventricular pressure overload. *Life Sci.* 2006;78:2633-2642.
51. Luchner A, Muders F, Dietl O, et al. Differential expression of cardiac ANP and BNP in a rabbit model of progressive left ventricular dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2001;51:601-607.
52. Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, et al. Insufficient secretion of atrial natriuretic peptide at acute phase of myocardial infarction. *J Appl Physiol.* 2000;89:458-464.
53. Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, et al. Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. *Am J Physiol.* 1998;247:H1684-H1689.
54. Moro C, Berlan M. Cardiovascular and metabolic effects of natriuretic peptides. *Fundam Clin Pharmacol.* 2006;20:41-49.
55. Moe GW, Grima EA, Wong NL, et al. Plasma and cardiac tissue atrial and brain natriuretic peptides in experimental heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:720-727.
56. Ma KK, Banas K, de Bolt AJ. Determinants of inducible brain natriuretic peptide promoter activity. *Regul Pept.* 2005;128:169-176.
57. Rodeheffer RJ. Measuring plasma B-type natriuretic peptide in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:740-749.
58. Berger R, Huelsman M, Strecker K, et al. B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 2002;105:2392-2397.
59. Goetze JP, Kastrup J, Rehfeld JF. The paradox of increased natriuretic hormones in congestive heart failure patients: does the endocrine heart also fail in heart failure. *Eur Heart J.* 2003;24:1471-1472.
60. Oyama MA, Fox PR, Rush JE, et al. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. *J Am Vet Med Assoc.* 2008;232:1496-1503.
61. Schellenberg S, Grenacher B, Kaufmann K, et al. Analytical validation of commercial immunoassays for the measurement of cardiovascular peptides in the dogs. *Vet J.* 2008;178:85-90.
62. Buckley MG, Marcus NJ, Yacoub MH. Cardiac peptide stability, aprotinin and room temperature: Importance for assessing cardiac function in clinical practice. *Clin Sci (London).* 1999;97:689-695.
63. Thomas CJ, Woods RL. Haemodynamic action of B-type natriuretic peptide substantially outlasts its plasma half-life in conscious dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:369-372.
64. Blonde L, Wehmann RE, Steiner AL. Plasma clearance rates and renal clearance of ³H-labeled cyclic AMP and ³H-labeled cyclic GMP in the dog. *J Clin Invest.* 1974;53:163-172.
65. Kellihan HB, Oyama MA, Reynolds CA, et al. Weekly variability of plasma and serum Nt-proBNP measurements in normal dogs. *J Vet Cardiol.* 2009;11:593-597.
66. Boswood A, Dukes-McEwan J, Loureiro J, et al. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptide in the investigation of canine cardiac disease. *J Small Anim Pract.* 2008;49:26-32.
67. Liu ZL, Wiedmeyer CE, Sisson DD, Solter PF. Cloning and characterization of feline brain natriuretic peptide. *Gene.* 2002;292:183-190.
68. Oikawa S, Imai M, Inuzuka C, et al. Structure of dog and rabbit precursors of atrial natriuretic polypeptides deduced from nucleotide sequence of cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;132:892-899.
69. Biondo AW, Liu ZL, Wiedmeyer CE, et al. Genomic sequence and cardiac expression of atrial natriuretic peptide in cats. *Am J Vet Res.* 2002;63:236-240.
70. Doust JA, Glasziou PP, Pietrzak E, et al. A systematic review of the diagnostic accuracy of natriuretic peptides for heart failure. *Arch Intern Med.* 2004;164:1978-1984.
71. Swedberg K, Cleland J, Dargie H, et al. Guidelines

for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2005;26:1115-1140.

72. Takase H, Toriyama T, Sugiura, et al. Brain natriuretic peptide detects cardiac abnormalities in mass screening. *Eur J Clin Invest*. 2007;37:257-262.

73. Issac DL. Biomarkers in heart failure management. *Curr Opin Cardiol*. 2008;23:127-133.

74. Silver MA, Maisel A, Yancy CW, et al. Consensus Panel 2004: a clinical approach for the diagnostic, prognostic, screening, treatment monitoring, and therapeutic roles of natriuretic peptide in cardiovascular disease. *Congest Heart Fail*. 2004;10(3):1-30.

75. Doust JA, Pietrzak E, Dobson A, et al. How well does B-type natriuretic peptide predict death and cardiac events in patients with heart failure. *Systematic Review*. *BMJ*. 2005;330:625-633.

76. Jourdain P, Jondeau G, Funck F, et al. Plasma brain natriuretic peptide-guide therapy to improve outcome in heart failure: the STARS BNP Multicenter Study. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1733-1739.

77. Mueller C, Breidthardr T, Laule-Kilian K, et al. The integration of BNP and Nt-proBNP into clinical medicine. *Swiss Med Whly*. 2007;134:4-12.

78. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med*. 2008;358:2148-2159.

79. Hinderliter AL, Blumenthal JA, O'Conner C, et al. Independent prognostic value of echocardiography and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with heart failure. *Am Heart J*. 2008;156:1191-1195.

80. Vollmar AM, Reusch C, Kraft W, et al. Atrial natriuretic peptide concentration in dogs with congestive heart failure, chronic renal failure, and hyperadrenocorticism. *Am J Vet Res*. 1991;52:1831-1834.

81. Greco DS, Biller B, Van Liew CH, et al. Measurement of plasma atrial natriuretic peptide as an indicator of prognosis in dogs with cardiac disease. *Can Vet J*. 2003;44:293-297.

82. MacDonald KA, Kittleson MD, Munro C, et al. Brain natriuretic peptide concentration in dogs with heart disease and congestive heart failure. *J Vet Intern Med*. 2003;17:172-177.

83. Oyama MA, Sisson DD, Solter PF. Prospective screening for occult canine dilated cardiomyopathy using B-type and atrial natriuretic peptide and cardiac troponin-I assay. *J Vet Intern Med*. 2005;19:195-196.

84. Haggstrom J, Hansson K, Karlberg BE, et al. Plasma concentration of atrial natriuretic peptide in relation to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles Spaniels. *Am J Vet Res*. 1994;55:698-703.

85. Haggstrom J, Hansson K, Kvarn C, et al. Effects of naturally acquired decompensated mitral valve regurgitation on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic peptide concentration in dogs. *Am J Vet Res*. 1997;58:77-82.

86. Haggstrom J, Hansson K, Kvarn C, et al. Relationship between different natriuretic peptide and severity of naturally acquired mitral regurgitation in dogs with chronic myxomatous mitral valve disease. *J Vet Cardiol*. 2000;2:7-16.

87. Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, et al. Distinguishing cardiac and non-cardiac dyspnea in 48 dogs via plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endotelina, and cardiac troponin-I. *J Vet Intern Med*. 2007;21:238-242.

88. Fine DM, Declue AE, Reinero CR. Evaluation of circulating amino terminal-pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease. *J Am Vet Med Assoc*. 2008;232:1674-1679.

89. Takemura N, Toda N, Miyagawa Y, et al. Evaluation of Plasma N-Terminal Pro-Brain natriuretic Peptide (Nt-proBNP) Concentrations in Dogs with Mitral Valve Insufficiency. *J Vet Med Sci*. 2009;71(7):925-929.

90. Tarnow I, Olsen LH, Kvarn C, et al. Predictive value of natriuretic peptides in dogs with mitral valve disease. *Vet J*. 2009;180:195-201.

91. Forfia PR, Lee M, Tunin RS, et al. Acute phosphodiesterase 5 inhibition mimics hemodynamic effects of B-type natriuretic peptide and potentiates B-type natriuretic peptide effects in failing but not normal canine heart. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1079-1088.

92. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptide, their receptors and cGMP-dependent signaling functions. *Endocr Rev*. 2006;27:47-72.

93. Baumwart RD, Meurs KM. Assessment of plasma brain natriuretic peptide concentration in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Vet Res*. 2005;66:2086-2089.

94. O'Sullivan ML, O'Grady MR, Minors SL. Plasma big endothelin-1, atrial natriuretic peptide, aldosterone, and norepinephrine concentrations in normal Doberman Pinschers and Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy. *J Vet Intern Med*. 2007;21:92-99.

95. Oyama MA, Sisson DD, Solter PF. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. *Am J Vet Res*. 2007;68:42-47

96. Chetboul V, Tessier-Vetzel D, Escriou C, et al. Diagnostic potential of natriuretic peptides in the occult phase of Golden retriever muscular dystrophy cardiomyopathy. *J Vet Intern Med*. 2004;18:845-850.

97. Hori Y, Tsubaki M, Katou A, et al. Evaluation of Nt-proBNP and CT-ANP as Markers of concentric hypertrophy in dogs with a model of compensated aortic stenosis. *J Vet Intern Med*. 2008;22:1118-1123.

98. Iwanaga Y, Nishi I, Furuichi S, et al. B-type natriuretic peptide strongly reflects diastolic wall stress in patients with chronic heart failure: comparison between systolic and diastolic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:742-748.

99. Leya FS, Arab D, Joyal D, et al. The efficacy of brain natriuretic peptide levels in differentiating constrictive pericarditis from restrictive cardiomyopathy. *J Am Coll*

- Cardiol. 2005;45:1900-1902.
100. Connolly DJ, Soares Magalhaes RJ, Luis Fuentes V, et al. Circulating natriuretic peptide concentrations in cats with respiratory distress [abstract]. *J Vet Intern Med.* 2008;22:719-720.
 101. Connolly DJ, Soares Magalhaes RJ, Syme HM, et al. Circulating Natriuretic Peptides in Cats with Heart Disease. *J Vet Intern Med.* 2008;22:96-105.
 102. Biondo AW, Ehrhart EJ, Sisson DD, et al. Immunohistochemistry of atrial and brain natriuretic peptides in control cats and cats with hypertrophy cardiomyopathy. *Vet Pathol.* 2003;40:501-506.
 103. McGrath MF, de Bold ML, de Bold AJ. The endocrine function of the heart. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16:469-477.
 104. Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Plasma levels of ANP, BNP, epinephrine, norepinephrine, serum aldosterone, and plasma rennin activity in healthy cats and cats with myocardial disease. *J Vet intern Med.* 2003;17:483-486.
 105. Poutanen T, Tikanoja T, Jaaskelainen P, et al. Diastolic dysfunction without left ventricular hypertrophy is an early finding in children with hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations in the beta-myosin heavy chain, alpha-tropomyosin, and myosin binding protein C genes. *Am Heart J.* 2006;151:725-729.
 106. Fox PR, Oyama MA, MacDonald K, et al. Comparison of Nt-proBNP concentration in cats with acute dyspnea from cardiac or respiratory disease [abstract]. *J Vet Intern Med.* 2008;22:719.
 107. Fox PR, Oyama MA, Reynolds C, et al. Utility of plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) to distinguish between congestive heart failure and non-cardiac causes of acute dyspnea in cats. *J Vet Cardiol.* 2009;11:S51-S61.
 108. Nishida Y, Morita H, Minamino N, et al. Effects of brain natriuretic peptide on hemodynamic and renal function in dogs. *Japan J Physiol.* 1990;40:531-540.
 109. Lalor SM, Connolly DJ, Elliott J, et al. Plasma concentrations of natriuretic peptides in normal cats and normotensive and hypertensive cats with chronic kidney disease. *J Vet Cardiol.* 2009;11:71-79.
 110. Mueller C, Laule-Kilian K, Scholer A, et al. B-type natriuretic peptide for acute dyspnea in patients with kidney disease: Insights from a randomized comparison. *Kidney Int.* 2005;67:278-284.
 111. Mark PB, Stewart GA, Gansevoort RT, et al. Diagnostic potential of circulating natriuretic peptides in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:402-410.
 112. Anwaruddin S, Lloyd-Jones DM, Baggish A, et al. Renal function, congestive heart failure, and amino-terminal pro-brain natriuretic peptide measurement. Results from the ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) Study. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(1):91-97.
 113. De Filippi C, Can Kimmenade RR, Pinto YM. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide testing in renal disease. *Am J Cardiol.* 2008;101(Suppl.):82A-88A.
 114. Sudoh M, Gustafsson F, Kistorp CN, et al. Effects of body mass index and age on N-terminal pro-brain natriuretic peptide are associated with glomerular filtration rate in chronic heart failure patients. *Clin Chem.* 2007;53:1928-1935.
 115. Eriksson AS, Jarvinen AK, Eklund KK, et al. Effect of age and body weight on neurohumoral variables in healthy Cavalier King Charles Spaniels. *Am J Vet Res.* 2001;62:1818-1824.
 116. Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ, et al. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:976-982.
 117. Raymond I, Groenning BA, Hildebrandt, et al. The influence of age, sex and other variables on the plasma level of N-terminal pro brain natriuretic peptide in a large sample of the general population. *Heart.* 2003;89:745-751.
 118. Koch AM, Rauh M, Zinc S, et al. Decreasing ratio of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide according to age. *Acta Paediatr.* 2006;95:805-809.
 119. Bayes-Genis A, De Filippi C, Januzzi Jr JL. Understanding amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in obesity. *Am J Cardiol.* 2008;101:89-94.
 120. Mlezid'Eril G, Tagnochetti T, Nauti A, et al. Biological variation of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in healthy individuals. *Clin Chem.* 2003;49:1554-1555.
 121. O'Hanlon R, O'Shea P, Ledwidge M, et al. The biologic variability of B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in stable heart failure patients. *J Cardiol Fall.* 2007;13:50-55.
 122. Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, et al. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2000;343:246-253.
 123. Chen HH, Grantham JA, Chirger JA, et al. Subcutaneous administration of brain natriuretic peptide in experimental heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:1706-1712.
 124. Chen HH, Huntley BK, Schirger JA, et al. Maximizing the renal cyclic 3'5'-guanosine monophosphate system with type V phosphodiesterase inhibition and exogenous natriuretic peptide: A novel strategy to improve renal function in experimental overt heart failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(10):2742-2747.
 125. Lainchbury JG, Burnnett JC Jr, Meyer D, et al. Effects of natriuretic peptides on load and myocardial function in normal and heart failure dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H33-40.

BIOFILMS BACTERIANOS

Meneses ML¹, Landoni MF²

¹ Becaria CONICET; ² Investigadora Principal CONICET.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN: Las poblaciones bacterianas tienen la habilidad de adaptarse rápida y óptimamente a los cambios en los ambientes en los que existen. De esta manera, en ambientes propicios, con ausencia o baja incidencia de factores estresantes, se las puede encontrar de forma individual, también llamada planctónica. Sin embargo, los cambios bruscos en el ambiente que las rodea, conducen a un cambio importante en el comportamiento de la bacteria individual, la cual tiende a contactar y “comunicarse” con las bacterias aledañas para conformar una patina bacteriana, llamada biofilm. Los biofilm son responsables de las infecciones bacterianas crónicas y/o recidivantes en humanos y animales. La característica fundamental de los biofilm bacterianos es su amplia resistencia frente a una variedad de antimicrobianos, la cual es consecuencia de mecanismos distintos a los reportados para la bacteria en estado planctónico. La formación de biofilms comienza a ser reconocida como un proceso de desarrollo multicelular. Esta es la llave de las nuevas estrategias terapéuticas: el cambio del blanco a tratar, dejar de pensar en la bacteria para empezar a pensar en ese organismo multicelular conformado por bacterias al que se denomina biofilm.

Palabras clave: biofilm, bacteria planctónica; resistencia antimicrobiana; infecciones bacterianas; infecciones bacterianas crónicas.

BACTERIAL BIOFILMS

ABSTRACT: Bacterial populations have the ability to adapt quickly and optimally to changes in its environment. Thus, in favourable environments, with no or low incidence of stressors, they can be found in individual form also called planktonic. However, sudden changes in the surrounding environment leads to a significant change in the behaviour of the individual bacteria, which tends to contact and “communicate” with neighbour bacteria to form a conglomerate called biofilm. Biofilms are responsible for chronic/recalcitrant infections in humans and animals. The most important feature of bacterial biofilms is their high resistance to a wide range of antimicrobials, by mechanism other than those reported for planktonic bacteria. Biofilms development is beginning to be recognized as a process of multicellular development. This is the key to a new therapeutic strategy: changing the therapeutic target from the planktonic bacteria to this multicellular organism called biofilm.

Key words: biofilm, planktonic bacteria; antimicrobial resistance; bacterial infection; chronic bacterial infection.

Fecha de recepción: 03/11/11

Fecha de aprobación: 30/07/12

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

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

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones bacterianas tienen la habilidad de adaptarse rápida y óptimamente a los cambios en los ambientes en los que existen (1). De esta manera, en ambientes propicios con ausencia o baja incidencia de factores estresantes se las puede encontrar de forma individual, también llamada planctónica. Sin embargo, los cambios bruscos en el ambiente que las rodea, entre ellos, baja presión de oxígeno, o presencia de antimicrobianos, conducen a un cambio importante en el comportamiento de la bacteria individual, la cual tiende a contactar y “comunicarse” con las bacterias aledañas para conformar una patina bacteriana, llamada biofilm (2).

Los biofilms son estructuras complejas conformadas por poblaciones bacterianas, las cuales se comportan como organismos multicelulares. Los biofilms no deben considerarse una mera aglomeración de bacterias, por el contrario deben ser contemplados como una población que reacciona y actúa como un organismo único, de ahí la calificación de organismo multicelular (1).

Los biofilms se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza ya que representan la forma habitual de crecimiento de las bacterias.

En la clínica se los considera responsables de la mayoría de las infecciones recidivantes o en aquellas asociadas a implantes. Los primeros

reportes de la importancia de los biofilms en procesos infecciosos en humanos datan de inicios de la década de 1980 en hospitales de la Ciudad de Memphis y en la Universidad de Tennessee, donde se observó que muchos pacientes padecían sepsis asociada a catéteres intravasculares (*Staphylococcus coagulasa negativo*) (3). Pero no fue hasta la década de los 90 que se los comenzó a investigar en relación a su rol como responsables de infecciones crónicas (4).

Actualmente es ampliamente aceptado que los biofilms son causantes de muchas enfermedades infecciosas bacterianas, todas ellas caracterizadas por su difícil erradicación y carácter recidivante (2, 5).

Existen numerosas infecciones con estas características, para las cuales se ha demostrado un biofilm bacteriano como agente etiológico; entre ellas: las prostatitis bacterianas (*Escherichia coli*), endocarditis (*Streptococcus*), neumonías (*Pseudomonas*, *Streptococcus*), otitis recidivantes (*Haemophilus influenzae*) y, como se mencionara, las infecciones asociadas a dispositivos médicos de implantes (implantes ortopédicos, catéteres urinarios, marcapasos) (6, 7). En Medicina Veterinaria, aunque menos estudiados, se está empezando a reconocer que enfermedades como neumonías (*Pasteurella multocida*), meningitis (*Streptococcus suis*), abscesos hepáticos (*Fusobacterium necrophorum*), mastitis infecciosas (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*), piodermias (*Staphylococcus epidermidis*) y otitis externas (*Pseudomonas aeruginosa*) son causadas por bacterias en estado de biofilm (8, 9, 10).

La formación de biofilms es un proceso temporal que involucra la transición a través de distintas etapas de organización multicelular, identificadas como: (i) fase planctónica, (ii) fase de adhesión, (iii) fase de formación de microcolonias, (iv) fase de formación de macrocolonias y (v) fase de dispersión (11)

La fase de adhesión se ha dividido posteriormente en una etapa reversible y una irreversible en reconocimiento a que la adhesión a la superficie inicialmente es débil. En esta etapa se produce la activación de mecanismos específicos que permiten la transición celular a una asociación con la superficie de muy alta estabilidad. La formación de agrupaciones celulares discretas se conoce como formación de microcolonias, lo que puede suceder ya sea por crecimiento clonal de las células adheridas o por translocación activa a través de la superficie. Las microcolonias crecen en tamaño y coalescen para formar las macrocolonias. La macrocolonia típica consiste de torres semejantes a hongos separadas por espacios llenos de líquido. Sin embargo, también son posibles estructuras alternativas como por ejemplo, estructuras planas. Las células, dentro de la



Figura 1. Ejemplos de biofilms. (A) en ríos; (B) en drenajes; (C) en catéteres; (D) en dientes; (E) en herida de piel; (F) en un caso de otitis externa.

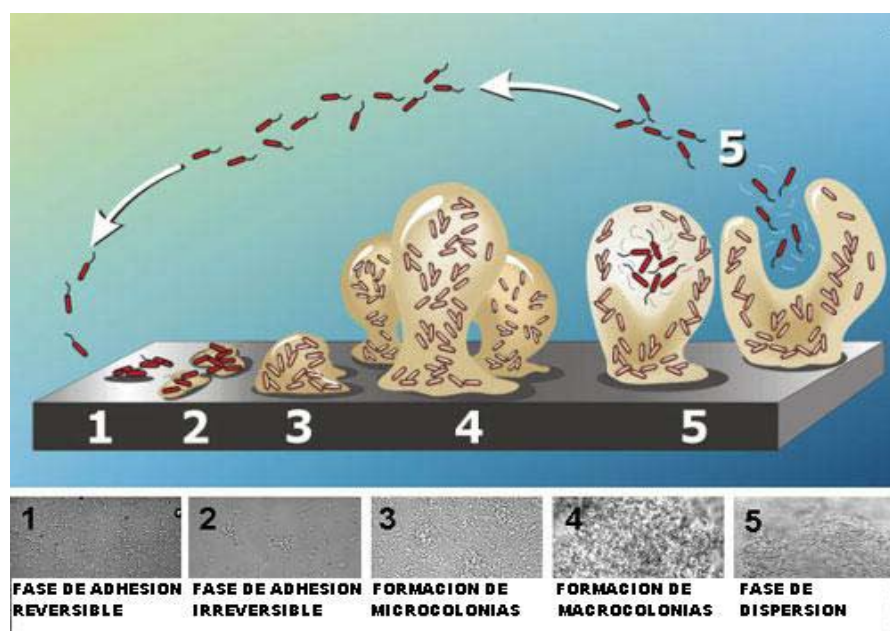


Figura 2. Esquema de las fases de desarrollo de biofilms (Modificado de (11))

macrocolonia, están contenidas en una matriz de exopolisacáridos que también contiene restos de células muertas y ADN extracelular. Por último, las macrocolonias pueden disolverse liberando las células desde el biofilm. El retorno de las células a la fase planctónica completa la imagen idealista del ciclo de desarrollo. En conjunto, estas cinco transiciones en la forma visualmente demarcada constituyen los puntos de control intuitivos del ciclo de desarrollo del biofilm.

La consideración de los biofilms como organismos multicelulares se basa en su capacidad de crecer, alimentarse, reproducirse, etc. de manera organizada y orquestada a través de sistemas de comunicación célula – célula (12). Las bacterias como parte de una comunidad se comunican a través de señales químicas. Estas señales pueden depender de la densidad celular o población o ser producidas en diferentes etapas del ciclo celular (13, 14).

El sistema de comunicación entre las bacterias que conforman el biofilm se ha definido como quórum sensing (12).

El quórum sensing es un sistema que consiste en una molécula señal llamada *autoinductor* que puede difundir hacia fuera o dentro de la célula, como en el caso de bacterias Gram negativas, o ser sintetizada como péptidos precursores, modificada y exportada de la célula a través de una maquinaria de transporte de proteínas (15, 16, 17, 18).

Los sistemas de quórum sensing difieren entre los distintos géneros bacterianos y una misma bacteria puede poseer más de un tipo de sistema, por ejemplo en *Pseudomonas aeruginosa* se han descrito dos sistemas diferentes (Las I/ Las R y Rhl I/ Rhl R) los cuales pueden estar

interconectados (13, 2).

Los mecanismos de señalización son los responsables de determinar, en respuesta a señales del medio ambiente, la morfología de los biofilms (desde pilares cilíndricos a estructuras filamentosas semejantes a hongos) y la organización de las complejas redes de canales acuosos específicamente diseñados para permitir la circulación de nutrientes y eliminación de desechos. Asimismo, tienen la capacidad de remodelar, en forma rápida, el biofilm en caso de modificaciones abruptas en el medio ambiente (19). Como se puede observar, este comportamiento define un organismo multicelular altamente evolucionado.

Es importante remarcar que las bacterias además de comunicarse entre ellas, pueden comunicarse con el hospedador. Este tipo de comunicación, denominada inter-reino, se lleva a cabo a través de los mismos receptores bacterianos que reconocen a los autoinductores, dada su capacidad de reconocer moléculas de tipo hormonal producidas por los huéspedes (20).

Desde hace mucho tiempo era reconocida por los médicos de terapia intensiva la baja incidencia de infecciones por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (O157:H7) en pacientes bajo tratamiento con beta-bloqueantes (21). Fueron los trabajos de Sperandio y su grupo los que reportaron las causas de esta baja incidencia (22, 23, 24, 25, 26, 27). Estos autores demostraron que las bacterias (en este caso *E. coli*) en intestino eran capaces de detectar los aumentos de epi y norepinefrina (incrementados en este tipo de pacientes debido al stress y dolor). El aumento de las concentraciones circulantes de estas catecolaminas conduce a un trasvasamiento al lumen

intestinal que es reconocido por las bacterias allí presentes, las cuales responden con un aumento del crecimiento, activación de los factores de virulencia y formación de biofilm.

Bansal y col (28), presentan una interesante hipótesis sobre los mecanismos de colonización de *E. coli* O157:H7; según esta hipótesis los gradientes de epi y norepinefrina influyen en la migración quimiotáctica de *E. coli* O157:H7 hacia la superficie de las células epiteliales del intestino. Cuando las concentraciones son bajas, las células bacterianas tienden a moverse de manera paralela a la superficie. Sin embargo, el aumento de los niveles de catecolaminas conduce a una migración bacteriana hacia la superficie de las células epiteliales intestinales lo que facilita su adherencia. Un detalle importante, que refleja la organización de las poblaciones bacterianas, es la interacción de las cepas de *E. coli* O157:H7 con las cepas de *E. coli* productoras de indol y las bacterias comensales no coli (13). Se ha reportado que el indol actuaría como repelente de *E. coli* O157:H7, de manera que la colonización y formación de biofilm se daría exclusivamente en las zonas ocupadas por bacterias comensales no coli.

Como se menciona previamente, la hipótesis de que los biofilms bacterianos son los responsables de las infecciones bacterianas crónicas y/o recidivantes es cada vez más aceptada (1, 4, 29, 30). Esto es de fundamental importancia; una terapéutica antibacteriana dirigida a la bacteria en estado planctónico conducirá inexorablemente al fracaso terapéutico. Por lo tanto, nuevos esquemas terapéuticos dirigidos a los biofilms son imprescindibles si se pretende alcanzar una cura bacteriana de estos procesos infecciosos.

La característica fundamental de los biofilm bacterianos es su amplia resistencia frente a una variedad de antimicrobianos (31). Es importante remarcar que el concepto clásico de resistencia antimicrobiana se refiere a la resistencia adquirida de las bacterias en estado planctónico. Estos mecanismos, todos ellos irreversibles, están mediados a través de mutaciones o adquisición de genes por medio de intercambios genéticos e incluyen (a) inactivación enzimática del antimicrobiano (betalactamasas), (b) modificación de el sitio diana del antimicrobiano en la bacteria (estreptomocina) o (c) expresión de bombas de eflujo (fluoroquinolonas) (32).

Los mecanismos a través de los cuales los biofilms resisten a los antimicrobianos son diferentes y reflejan las características estructurales y fisiológicas de "organismo multicelular bacteriano".

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que las bacterias en estado de biofilm poseen una resistencia 10 a 1000 veces mayor que la observada con las mismas cepas bacterianas en

estado planctónico (8, 33, 34, 35).

La resistencia antimicrobiana de los biofilms no se debe a la presencia de genes de resistencia ni a la selección de mutantes resistentes, lo que, como se mencionara, es una característica de la resistencia antibacteriana de las bacterias en estado planctónico. Las bacterias en estado de biofilm solo expresan genes considerados estructurales.

A la fecha, aun cuando este es un tema en crecimiento dinámico, se han propuesto los siguientes mecanismos para explicar la alta resistencia de los biofilms frente a los antimicrobianos (6, 31):

1.- Penetración alterada de los antimicrobianos a través de la matriz del biofilm (reducida tasa, lenta velocidad) (36). Esta hipótesis plantea la posibilidad de una muy lenta o incompleta penetración de los antimicrobianos al interior del biofilm. Esto sería consecuencia de un efecto de dilución en la matriz así como, de la presencia de enzimas capaces de metabolizar a los antibióticos (37). También se reporta un efecto carga, especialmente para los aminoglucósidos, que son cationes (por la presencia del grupo azúcar) e interactúan con las cargas negativas de los polímeros que conforman la matriz extracelular (38, 39).

2.- La 2da hipótesis, se asienta en las características químicas del microambiente del biofilm (6). Se ha demostrado que dentro del biofilm se generan microgradientes de nutrientes, entre ellos de oxígeno; estos estudios demuestran que todo el oxígeno es consumido en las capas más superficiales del biofilm, creándose en el interior nichos de anaerobiosis (40). Por otro lado, también se observan gradientes en microescala de productos de desecho, lo que conduce a diferencias de pH en las distintas profundidades del biofilm. La anaerobiosis, así como, los pHs extremos ejercen un profundo efecto sobre la actividad de los antimicrobianos (41, 42). Los aminoglucósidos son menos efectivos en anaerobiosis y los macrólidos en pHs ácidos. Asimismo, este gradiente de nutrientes se asocia con cambios en el ciclo bacteriano de las bacterias que conforman el biofilm; se pueden encontrar dentro de la misma población, bacterias en crecimiento logarítmico (blanco para antimicrobianos que actúan en pared) y otras en estado estacionario (que serían refractarias a estos antimicrobianos) (36). Otra consecuencia de los microgradientes es la inducción en la bacteria de repuestas osmóticas al stress, lo que induce cambios en la distribución de porinas de la pared bacteriana reflejado con una disminución de la permeabilidad de los antimicrobianos (42).

3.- La 3ra hipótesis postula que en el interior del biofilm se observan sub-poblaciones fenotípicamente diferentes, de tipo persistente

también llamadas bacterias viables no cultivables (43).

Como se ha mencionado, este terreno de estudio es amplio y, al menos en veterinaria, muy poco investigado.

En la actualidad existen escasos estudios sobre la capacidad de formar biofilms de las bacterias responsables de las infecciones recidivantes en animales domésticos. Asimismo, se continúa aplicando la terapia clásica diseñada para bacterias en estado planctónico, las cuales poseen un perfil patogénico y de resistencia antimicrobiana totalmente diferente a los biofilms.

La formación de biofilms comienza a ser reconocida como un proceso de desarrollo multicelular. Esta es la llave de las nuevas estrategias terapéuticas: el cambio del blanco a tratar, dejar de pensar en la bacteria para empezar a pensar en ese organismo multicelular conformado por bacterias al que se denomina biofilm.

BIBLIOGRAFÍA

1. Monds R. & O'Toole G. (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiol.* 17: 73-87.
2. Pace J., Rupp M. & Finch R.G (2006). *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy.* 1st Ed. Taylor & Francis. USA.
3. Christensen G., Simpson A., Younger J., Baddour L., Barret F., Melton F. & Beachey E. (1985). Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22: 996-1006
4. Costerton J., Stewart P. & Greenberg E. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
5. Fey P. (2010) Modality of bacterial growth presents unique targets: How do we treat biofilm-mediated infections?. *Curr Opin Microbiol.* 13: 610-615.
6. Costerton W., Veeh M., Shirtliff M., Pasmore C., Post C. & Ehrlich G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 112:1466-1477
7. Bryers J. (2008). *Medical Biofilms.* Biotech. Bioengineering. 100: 1-18.
8. Olson M., Ceri H., Morck D., Buret A. & Read R. (2002). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet Res.* 66:86-92.
9. Clutterbuck A., Woods E., Knottenbelt D., Clegg P., Cochrane C. & Percival S. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 121: 1-17.
10. Grenier D., Grignon L. & Gottschalk M. (2009). Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Vet. J.* 179 : 292-295.
11. Coogan N. & Keener J. (2004) The role of biofilm matrix in structural development. *Math. Med. Biol.*

21:147-166.

12. Waters C. & Bassler B. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:319-346

13. Jayaraman A. & Wood T. (2008). Bacterial Quorum Sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual Rev. Biomed. Engineering* 10:145-167.

14. Lee J., Jayaraman A. & Wood T. (2007). Indole is an interspecies biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol.* 7:42-48.

15. Parsek M., Val D., Hanzelka B., Cronan J. & Greenberg E. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4360-4365

16. Marketon M., Gronquist M., Eberhard A. & Gonzales J. (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel N-acyl homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 184:5686-5695

17. Manefield M. & Turner S. (2002). Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. *Microbiol.* 148:3762-3764

18. Taga M. & Bassler B. (2003). Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:14549-14554

19. Madhu Sharma A. & Yadav S. (2008) Biofilms: microbes and disease. *Br. J. Infect. Dis.* 12:526-530

20. Williams P. (2007) Quorum sensing, communication and cross kingdom signalling in bacterial world. *Microbiol.* 153:3923-3938.

21. Novotny N., Lahm T., Markel T., Crisostomo P., Wang M., Wang Y., Ray R., Tan J., Al-Azzani D. & Meldrum D. (2009) Beta blockers in sepsis: Re-examining the evidence. *Shock* 31: 113-119.

22. Sperandio V., Torres A., Jarvis B., Nataro J. & Kaper J. (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:8951-6.

23. Clarke M. & Sperandio V. 2005. Events at the host-microbial interface of the gastrointestinal tract. III. Cell-to-cell signalling among microbial flora, host, and pathogens: there is a whole lot of talking going on. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288:G1105-9

24. Waldor M.K. & Sperandio V. (2007) Adrenergic regulation of bacterial virulence. *J Infect Dis.* 195:1248-9.

25. Reading N., Rasko D.A., Torres A.G. & Sperandio V. (2009) The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:5889-94.

26. Pacheco A.R. & Sperandio V. (2009) Inter-kingdom signalling: chemical language between bacteria and host. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:192-8.

27. Hughes D. & Sperandio V. (2008) Inter-Kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:111-120

28. Bansal T., Englert D., Lee J., Hegde M., Wood T. & Jayarama A. (2007) Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression. *Infect.Immun.* 75: 4597-4607
29. Darouiche R. (2004). Treatment of infections associated with surgical implants. *N. Engl. J. Med.* 350:1422-1429.
30. Fergie N., Bayston R., Pearson J. & Birchall J. (2004). Is otitis media with effusion a biofilm infection? *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 29:38-46.
31. Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Rolin S. & Ciofu O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilm. *Int.J.Antimicrob.Agents* 35 :322-332.
32. Tenover F. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria *Am.J.Infect.Control.* 34:3-10
33. Stewart P. & Costerton W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.
34. Conley J., Olson M., Cook L., Ceri H., Phan V. & Davies H. (2003) Biofilm formation by group A streptococci: is there a relationship with treatment failure? *J.Clin.l Microbiol.* 41: 4043-4048.
35. Mah T. & O'Toole G. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9: 34-39.
36. Gilbert P., Collier P.J. & Brown M.R (1990) Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1865-1868.
37. Hoyle B.D., Jass J. & Costerton J.W. (1990) The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J. Antimicrob. Chemother.* 26: 1-5.
38. Gordon C.A., Hodges N.A. & Marriott C. (1988) Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 667-674.
39. Nichols W. (1988) Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:518-523.
40. Lewis K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob.Agents Chemother.* 45: 999-1007
41. Ishida H. (1998) In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1641-1645.
42. Anderson G. & O'Toole G. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr.T. Microbiol.* 322:85-105.
43. Lewis K. (2010) Persister cells. *Annu.Rev.Microbiol.* 64: 357-372.

INTERRUPCIÓN DE LA GESTACIÓN EN LA GATA DOMÉSTICA: ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA

García Mitacek MC^{1,2}, Stornelli MC¹, Tittarelli CM¹, Nuñez Favre R^{1,3},
Williams SI¹, de la Sota RL^{1,3}, Stornelli MA¹

¹ Cátedra de Reproducción, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

² CIC, calle 526 e/10 y11. La Plata (1900). ³CONICET. B1900AVW. La Plata. Argentina.

RESUMEN: *Las gestaciones no deseadas ocurren frecuentemente en hembras felinas y las crías nacidas de estas gatas muchas veces se convierten en animales callejeros dando origen a la formación de poblaciones urbanas de gatos abandonados. Es así que la interrupción de la gestación suele ser un motivo de consulta frecuente en la clínica reproductiva. Los métodos comunicados para la interrupción de la gestación en la gata incluyen: 1) agonistas dopaminérgicos (cabergolina), 2) prostaglandinas (natural y sintética), 3) combinación de agonistas dopaminérgicos – prostaglandinas, 4) antiprogéstágenos (aglepristone). El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de los estudios desarrollados sobre la administración de distintas drogas utilizadas para la interrupción de la gestación temprana, media o tardía en la gata doméstica.*

Palabras clave: gata, aborto, gestación

PREGNANCY TERMINATION IN THE QUEEN: UPDATE

ABSTRACT: *Unwanted pregnancies occur frequently in feline females and kittens of these cats often become in urban populations of stray cats. Pregnancy termination is one of the most common reproductive requests from cat owners. Reported methods for interruption of pregnancy in queens include: 1) dopamine agonists (cabergoline), 2) prostaglandins (natural and synthetic), 3) Combined protocols of dopamine agonists and prostaglandin, 4) antiprogestins (aglepristone). The aim of this review will summarize published reports on early, middle and late pregnancy termination in the domestic cat.*

Keywords: queen, abortion, pregnancy

Fecha de recepción: 21/11/11

Fecha de aprobación: 31/07/12

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

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

INTRODUCCIÓN

El control de la reproducción en la gata doméstica se presenta como un constante desafío en la clínica reproductiva de pequeños animales. Las gestaciones no deseadas son frecuentes en la gata doméstica durante la estación reproductiva. Muchas veces los propietarios de gatas mascotas concurren al veterinario con la sospecha de que su gata está preñada, en otras ocasiones no advierten los celos o no observan la cópula, por tal motivo muchas veces el veterinario descubre la preñez cuando se realiza un examen de rutina. Es así que la interrupción de la gestación constituye un motivo de consulta cotidiano en la clínica reproductiva diaria.

El nacimiento de gatitos no deseados determina la ocurrencia de poblaciones de gatos callejeros, lo cual constituye un problema de alto impacto económico-social en las zonas urbanizadas. La existencia de estas poblaciones aumenta las probabilidades de accidentes ocurridos con personas que toman contacto con animales callejeros sin controles sanitarios. El control de la reproducción de estos animales es imprescindible ya que las poblaciones de gatos callejeros crecen en forma exponencial con los consecuentes problemas que esto acarrea. La ocurrencia de enfermedades zoonóticas (toxoplasmosis, endo y exoparasitosis, clamidiasis, rabia, etc) y accidentes (mordeduras y arañazos) ocurridos con animales callejeros, deteriora la calidad de vida de toda la población y en especial la de los pobladores de zonas marginales. Estos últimos son los que más problemas sanitarios padecen a consecuencia de la gran cantidad de animales callejeros sin controles sanitarios que habitan en dichas áreas. Así mismo, estos animales sufren por falta de alimento, inclemencias del tiempo o enfermedades no tratadas.

Todos estos hechos hacen que la interrupción de la gestación en gatas sea un tópico de gran interés en medicina veterinaria. La implementación del protocolo utilizado para interrumpir la gestación dependerá del estadio de la preñez en que se encuentre la gata, de los efectos colaterales de las drogas utilizadas así como la disponibilidad de las mismas. Es así que un conocimiento acabado de la fisiología reproductiva de la gata (concepción y gestación) así como de las características farmacológicas de las drogas utilizadas (mecanismo de acción, efectos colaterales) permitirá implementar el protocolo adecuado para interrumpir la gestación en cada caso particular. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de los estudios desarrollados sobre la administración de distintas drogas utilizadas para la interrupción de la gestación temprana, media o tardía en la gata doméstica.

PARTICULARIDADES FISIOLÓGICAS DE LA GESTACIÓN FELINA

Los felinos presentan ovulación inducida, donde la estimulación vaginal producida por el pene del macho es seguida en forma inmediata por un incremento en la actividad neural dentro de las áreas hipotalámicas (1). La mencionada estimulación causa liberación de GnRH, con la consecuente onda de LH que sigue a la estimulación vaginal. Las ondas de LH se presentan a los 15 minutos de la copulación. Los niveles máximos de LH requieren entre 8 a 12 copulaciones y se alcanzan luego de 4 h del primer coito. La ovulación ocurre aproximadamente a las 24 h después de la rápida liberación de LH (2). Los óvulos pueden permanecer en los oviductos durante 5 a 6 días, aquí ocurre la fertilización, dando a lugar a la formación del cigoto. A las 64 h de la cópula se observan embriones de 2 a 4 células. A las 124 h estos embriones alcanzaron la etapa de mórula, estando todavía ubicados en el oviducto. Entre las 124 y las 148 h este embrión evoluciona a mórula compacta, al tiempo que atraviesa la unión útero-tubárica para ubicarse dentro de los cuernos uterinos (3-4). Los embriones se mueven en el útero en busca de un lugar adecuado para la implantación. Se considera que la implantación ocurre entre los 12 a 13 días posteriores a la ovulación (5). El pasaje de embrión a feto ocurre alrededor de los 28 días (6). La duración de la gestación oscila entre 52 y 74 días después del servicio con un promedio de 66 (7-10).

Uno a dos días pos ovulación la concentración de progesterona (P_4) plasmática aumenta por encima de la concentración basal (< 1 ng/ml) siendo de 2 ng/ml. La P_4 continúa aumentando siendo la concentración de 15 a 30 ng/ml entre los 25 y 30 días de gestación (5). La elevada progesteronemia durante este período es un reflejo de la función lútea continua así como de la P_4 sintetizada y secretada por la placenta. El cuerpo lúteo produce P_4 durante un mínimo de 40 a 50 días, pero las cantidades elaboradas después del día 49 son escasas. A partir del día 50 la P_4 placentaria sería capaz de mantener la gestación (2).

La concentración plasmática de estrógenos (E_2) en el momento de la cópula se encuentra en valores basales (8 a 12 pg/ml) pero luego los niveles comienzan a incrementarse llegando a niveles de 20 a 30 pg/ml después del día 58 a 62 de la preñez, para comenzar a descender justo antes del parto (5). Las altas concentraciones de E_2 y P_4 , en general, inhiben la producción de gonadotropinas hipofisarias, por lo que los niveles de FSH y LH son muy bajos durante la gestación (11).

La relaxina es una hormona peptídica producida por la unidad fetoplacentaria. La misma es detectada a partir del día 25 de gestación, y

comienza a declinar 10 a 15 días antes al parto. La concentración de relaxina no es detectada en el suero durante el estro, pseudopreñez y dos días post parto, por lo cual permitiría realizar el diagnóstico de gestación en la gata (5). Esta hormona actúa en sinergismo con la P_4 para el mantenimiento de la gestación, previniendo las contracciones espontáneas del útero (11).

La prolactina es luteotrófica y ayuda al mantenimiento del cuerpo lúteo después del día 15 de gestación. El incremento de los niveles de prolactina en suero se observan a partir del día 35 de preñez (12).

El diagnóstico clínico de la gestación en la gata se puede realizar por ultrasonografía, palpación abdominal o radiografía. La ultrasonografía transabdominal permite la detección temprana de la gestación, siendo posible realizarlo alrededor del día 18. A su vez se puede realizar un monitoreo de la preñez, detectando la viabilidad fetal, lo cual no puede ser determinado por palpación o radiografía. La palpación de la vesículas puede realizarse entre el día 21 a 25 de gestación. Después del día 35 la dilatación del útero hace dificultoso el diagnóstico por esta técnica. Mientras que la radiografía permite la identificación de la calcificación de los huesos del feto, y este evento ocurre entre el día 38 a 40 de preñez, por tal motivo el diagnóstico por este método debe realizarse luego del día 45 de gestación. (5).

INTERRUPCIÓN DE LA GESTACIÓN

Los estudios realizados han mostrado que la interrupción de la gestación en la gata doméstica puede realizarse mediante cuatro estrategias terapéuticas. La primera incluye la administración de agonistas dopaminérgicos, los cuales inhiben la secreción de prolactina al unirse a receptores dopaminérgicos a nivel de la hipófisis. La prolactina es el principal factor luteotrófico, por tal motivo el cuerpo lúteo se vuelve incapaz de mantener la preñez luego del día 21 sin el soporte de esta hormona, al producirse un descenso de la P_4 sérica (5, 13). La segunda opción incluye el uso de prostaglandina (PG), la cual induce la lisis del cuerpo lúteo, estimula las contracciones uterinas y genera la dilatación cervical (5, 13). Por tal motivo la administración seriada de PG natural o sintética en la segunda mitad de la gestación produce un descenso de la concentración de P_4 plasmática por lo que provoca el aborto con expulsión de los fetos (2). La tercera opción se basa en la combinación de agonistas dopaminérgicos y PG cuya finalidad es reducir la dosis y por lo tanto disminuir los efectos colaterales de ésta última (14). La cuarta opción incluye los antiprogéstágenos esteroides sintéticos que se unen a receptores de P_4 presentes en el útero, por lo cual interfieren con las acciones de la P_4 endógena, generando la interrupción de la gestación (13).

AGONITAS DOPAMINÉRGICOS

La totalidad de los estudios realizados en los que utilizan agonistas dopaminérgicos para interrumpir la gestación en la gata se basan en la administración de cabergolina.

Verstegen logró interrumpir la gestación en el 80 % de las gatas tratadas (4/5) cuando administró cabergolina (1,65 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$), por vía subcutánea durante 5 días a partir del día 30 de gestación. El aborto se inició cuando los niveles séricos de P_4 descendieron a menos de 1 ng/ml. Esta disminución ocurrió entre el día 3 y 4 de tratamiento (15). En concordancia Erünal logró interrumpir la gestación en el 100 % de los animales (8/8) entre el día 34 y 42 al administrarles cabergolina oral (15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) durante 5,6 \pm 1,5 días. En contraposición los dos animales de este estudio tratados entre el día 45 y 47 de preñez no interrumpieron la gestación manteniendo altos niveles de P_4 (16,9 y 9,8 nmol/l). Sin embargo las gatas parieron cachorros prematuros. Como efecto colateral se observaron vómitos en el 5,5% de las gatas tratadas. Solamente en cuatro de las gatas incluidas en este estudio no se vio afectada la fertilidad (16).

PROSTAGLANDINAS

Se ha utilizado PG $F_{2\alpha}$ natural en una única dosis de 2 mg totales por vía intramuscular al día 33 de gestación, generando el aborto con la expulsión de fetos en la totalidad de las gatas tratadas (4/4). Se observó un descenso de la concentración de P_4 plasmática a las 24 h de iniciado el tratamiento. Dentro de los efectos colaterales pudo observarse la ocurrencia de náuseas, vómitos, diarrea y postración 10 minutos posteriores a la administración (15). En concordancia la administración de PG $F_{2\alpha}$ en una dosis de 500 a 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durante 2 días consecutivos produjo aborto 48 h después de iniciado el tratamiento en gatas que presentaban más de 40 días de gestación. Por el contrario en aquellas gatas que presentaban menos de 40 días de gestación no ocurrió aborto (0/9) (17-18).

Baldwin obtuvo mejores resultados al utilizar PG $F_{2\alpha}$ natural a los 45 días de gestación (3/4) en comparación con los animales tratados al día 30 de gestación (1/4). Todos los animales recibieron la administración subcutánea de PG $F_{2\alpha}$ natural en una dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dos veces en el primer día de tratamiento, seguido de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dos veces por día durante 5 días. Al abortar las gatas presentaron un nivel de P_4 sérico menor a 1,0 ng/mL (18-19).

Nuestro grupo de trabajo utilizó cloprostenol en una dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ subcutáneo durante 3 días consecutivos entre el día 35 y 38 de gestación produciéndose el aborto en todos los animales tratados (4/4) entre los 4 y 10 días de iniciado el tratamiento. Concomitantemente se

observó un descenso significativo de la concentración sérica de P_4 posadministración de la droga. Los animales presentaron vómitos y diarrea como efectos colaterales (20). En contraposición la utilización de la misma dosis entre el día 41 y 43 de gestación logró interrumpir el 50 % de las gestaciones (2/4), dos de las gatas abortaron a los 6 días de iniciado el tratamiento, mientras que las dos gatas restantes llegaron a una gestación a término produciéndose el nacimiento de crías sanas. Esto podría estar relacionado con estudios que sugieren que el cuerpo lúteo produce P_4 durante un mínimo de 40-50 días, pero las cantidades de esta hormona secretadas por el cuerpo lúteo al final de la gestación son escasas, por lo cual la P_4 sintetizada y secretada por la placenta sería capaz de mantener la gestación hasta el final de la misma (21). Los efectos colaterales observados luego de la administración de cloprostenol fueron náuseas, vómitos y diarrea (22). Con el fin de completar los estudios de interrupción de la gestación se administró cloprostenol (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}/\text{sc}$ durante tres días consecutivos) en gatas que presentaban una preñez de 21-22 días. En todas las hembras la preñez llegó a término, produciéndose el nacimiento de crías sanas (4/4). El tamaño de camada fue de $2 \pm 0,4$ crías por parto. Si bien se observó un descenso de la concentración de los niveles de P_4 sérica postadministración de la droga (d0 vs d1, d2 y d3 $31,2 \pm 6,72$ vs $12,4 \pm 1,92$ ng/ml; $p > 0,01$), la concentración de la hormona permaneció suficientemente alta como para mantener la gestación. Estos resultados podrían explicarse por la resistencia del cuerpo lúteo a la luteólisis durante el primer tercio de la gestación (2). Los animales presentaron escasos efectos colaterales dentro de los cuales se observó leve decaimiento y disminución de la ingesta de alimento 1-2 h pos-administración del cloprostenol (23).

PROTOSCOLOS COMBINADOS DE AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS Y PROSTAGLANDINA

Onclin administró una única dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de cabergolina vía oral combinado con 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de cloprostenol (PG sintética) durante 2 días por vía subcutánea en gatas que presentaban 30 días de gestación. La totalidad de las gatas abortaron a los 9 ± 1 día luego de la implementación del tratamiento. La concentración de P_4 plasmática fue decreciendo en forma rápida y constante generando la interrupción de la gestación. No se observaron efectos colaterales, excepto una descarga vulvar hemorrágica. Postratamiento, la fertilidad de las gatas no se vio afectada (24). La asociación de agonistas dopaminérgicos y PG también fue utilizada por Erünal-Maral quien utilizó cabergolina 15 $\mu\text{g}/$

kg/día vía oral con alfaprostol 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ por medio, vía subcutánea. Las gatas fueron divididas en dos grupos. El primer grupo (n=6) fue tratado entre los 25 y 40 días de gestación, mientras que el segundo grupo (n=2) entre 45 y 47 días de gestación. Todas las gatas del primer grupo abortaron entre $6,2 \pm 1,9$ d de iniciado el tratamiento. Mientras que las gatas de segundo grupo parieron crías prematuras las cuales murieron 16 h después del parto. Algunas gatas presentaron vómitos como efecto colateral del tratamiento (16). Si bien en ambos estudios se logra interrumpir la gestación media, no ocurre lo mismo durante la gestación tardía lo cual podría relacionarse con la producción placentaria de P_4 .

ANTIPROGESTÁGENOS

Georgiev logró interrumpir la gestación en el 87 % de las gatas tratadas (20/23) al administrarles aglepristone (10 mg/kg/día), por vía subcutánea durante 2 días consecutivos en gatas que presentaban 25 a 26 días de gestación. La concentración sérica de P_4 fue incrementándose desde el día 25 al 29 de gestación. No se observaron efectos colaterales en los animales tratados, solamente una gata presentó prurito en el sitio de inyección durante las 3 horas posteriores a la administración (25). Estudios posteriores demostraron que la ocurrencia del aborto se relacionaba con la separación útero - placentaria generada por la destrucción de las vénulas, mientras que las arteriolas permanecieron intactas. Este genera una hemorragia intersticial, seguida por la extravasación al lumen uterino que se relaciona con descarga vulvar hemorrágica (26).

En concordancia Fieni obtuvo resultados similares al interrumpir la gestación del 88,5 % de las gatas tratadas entre el día 29 y 37 días de gestación con aglepristone (15 mg/kg/día), por vía subcutánea durante dos días consecutivos. El 59,2 % de las gatas que abortaron presentaron una descarga vulvar hemorrágica. Las concentraciones séricas de P_4 aumentaron 60 h postadministración de la droga, mientras que 30 h postaborto se registró un descenso de la misma. Como efectos colaterales pudo observarse que un pequeño número de gatas presentó inflamación en el sitio de inyección. Mientras que 4 gatas manifestaron períodos de anorexia, depresión, agitación y diarrea en los primeros 7 días de iniciado el tratamiento. Luego del aborto todas las gatas retornaron el estro, y un 77 % quedaron preñadas en el celo posterior al aborto y un 10 % en el segundo celo (27).

Nuestro grupo de trabajo logró interrumpir la gestación en el 100 % de los animales tratados (10/10) a los 35 a 38 días de gestación al administrarles aglepristone (10 mg/kg/día) subcutáneo,

durante dos días, ocurriendo la expulsión de fetos 5 ± 2 días luego de iniciado el tratamiento. Las concentraciones séricas de P_4 se incrementaron 28 h postadministración de la droga. Todas las gatas presentaron descarga vulvar hemorrágica durante una semana postaborto y retornaron al estro $24,6 \pm 6,57$ d más tarde. El único efecto colateral observado fue el aumento de la vocalización en algunos animales (20, 28). Estudios realizados con posterioridad demostraron que las gatas tratadas con el protocolo mencionado anteriormente conservan la fertilidad posaborto produciendo un promedio de 3 ± 1 crías nacidas por gata (29).

Georviev administró aglepristone (10 mg/kg/día/sc) en el día 45 y 46 posterior al servicio. Cuatro de las 6 gatas tratadas abortaron entre 4-7 días de iniciado el tratamiento. Mientras que las 2 gatas restantes parieron crías a término. Se observó un incremento de la concentración sérica de P_4 al momento del aborto, y un posterior descenso alrededor del día 55. Todas las gatas retornaron al estro y quedaron preñadas. No se comunicaron efectos colaterales (30).

Si bien existen pocos trabajos sobre la interrupción de la gestación temprana en la gata doméstica, nuestro grupo de trabajo observó un 100 % (10/10) de eficacia al administrar aglepristone (10 mg/kg/día/sc) en el día 21 - 22 posterior al servicio. Se evidenciaron cambios a nivel de los sacos gestacionales a los $4,3 \pm 0,6$ días de iniciado el tratamiento, registrándose una reducción del volumen y diámetro medio de los sacos gestacionales de las gatas tratadas en comparación con las gatas que desarrollaban una gestación normal. En una gata se observaron tres vesículas gestacionales, dos de ellas comenzaron a mostrar alteraciones ultrasonográficas a los 4 días de iniciado el tratamiento, pero una de ellas continuó con el desarrollo observándose un feto vivo hasta el día 42 de iniciado el tratamiento, momento en el cual se registró la muerte del mismo y posterior expulsión. Todas las hembras presentaron una leve descarga vulvar a los $7,4 \pm 0,9$ d de iniciado el tratamiento. Las gatas ciclaron nuevamente luego del tratamiento siendo el intervalo entre la interrupción de la gestación y el primer estro de $62,8 \pm 9,5$ d. La totalidad de las gatas tratadas quedaron preñadas en el primer servicio postratamiento, presentaron un desarrollo embrionario-fetal normal y parto eutócico. El promedio de crías nacidas por gata fue de 3 ± 1 . No se evidenciaron efectos colaterales en ninguno de los animales tratados (31-33).

Goericke-Pesch administró aglepristone (10 mg/kg/día), por vía subcutánea durante 2 días consecutivos en gatas al día 5 y 6 postservicio. Se realizó un control ultrasonográfico a los 25 días postservicio en el cual se pudo corroborar que ninguna de las hembras tratadas (11/11)

estaba preñada. Al realizar la medición de P_4 se pudo observar un incremento de los niveles postadministración de la droga. Todas las gatas ciclaron y quedaron preñadas entre el primer y cuarto celo postratamiento. El tratamiento resultó efectivo para prevenir la gestación temprana, sin embargo no pudo diagnosticarse la ocurrencia de fecundación y desarrollo embrionario. Se postuló que el uso de aglepristone probablemente prevendría la nidación (34).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Existen diferentes protocolos para la interrupción de la gestación en la gata doméstica. Los mismos se basan en la administración de agonistas dopaminérgicos, prostaglandinas, combinación de agonistas dopaminérgicos y prostaglandinas o antiprogestágenos. Si bien existen varios trabajos sobre la interrupción de la gestación media, no ocurre lo mismo con la gestación temprana y tardía. Los agonistas dopaminérgicos como la cabergolina administrada en gatas que presentan una gestación media ha permitido obtener muy buenos resultados, con la manifestación de mínimos efectos colaterales. Sin embargo no ocurre lo mismo cuando esta droga es administrada durante la gestación tardía, ya que la misma ha producido el nacimiento de crías prematuras, por lo cual su uso no es recomendado luego de los 45 días de gestación. Es una droga de costo moderado y disponible en el mercado nacional, por lo cual podría ser una opción adecuada para aquellas gatas que presentan una gestación entre 30 a 40 días.

La mayoría de los trabajos han documentado la administración de PG F2 α natural, la cual resultó eficaz para interrumpir la gestación media, sin embargo las hembras manifiestan efectos colaterales como náuseas, vómitos, diarrea y postración. Mientras que la administración de PG sintética ha sido utilizada para interrumpir la gestación media con buenos resultados, y mínimos efectos colaterales no ocurre lo mismo cuando es administrada durante la gestación tardía, este efecto podría estar relacionado con la P_4 placentaria cuyo rol en el mantenimiento de la gestación se encuentra aún en discusión. El uso de cloprostenol durante la gestación temprana no ha podido lograr interrumpir la gestación y ha generado el nacimiento de crías a término, probablemente por la autonomía del cuerpo lúteo en esta etapa de la gestación.

Protocolos en los que se ha utilizado la combinación de cabergolina junto con prostaglandinas como alfaprostol o cloprostenol, han logrado interrumpir la gestación media y reducir los efectos colaterales asociados a las prostaglandinas. En contraposición la combinación de cabergolina con alfaprostol ha generado el nacimiento de crías prematuras cuando se ad-

ministra durante la gestación tardía, por lo que no se aconseja su uso.

La administración de antiprogestágenos como el aglepristone utilizado para interrumpir la gestación media en la gata ha permitido obtener muy buenos resultados con la ocurrencia de mínimos efectos colaterales. Lo mismo puede observarse en la gestación temprana. Si bien solo existen dos trabajos en este estadio de la preñez, solo en uno de ellos se pudo diagnosticar la gestación y posterior interrupción de la misma; sin embargo su uso durante los primeros días postservicio sería eficaz para prevenir la gestación al afectar la nidación. Sin embargo la administración de aglepristone durante la gestación tardía generó que algunas gatas parieran crías a término.

La realización de controles ultrasonográficos periódicos es de gran importancia para evaluar los cambios que ocurren a nivel de los embriones-fetos, ya que generalmente no se evidencian cambios externos visibles que permitan determinar la interrupción precoz de la gestación.

Finalmente protocolos farmacológicos que permitan interrumpir la gestación temprana, media o tardía con mínimos efectos colaterales para la hembra permitirán mejorar el control de la reproducción en felinos reduciendo las poblaciones de gatos callejeros.

Agradecimientos: a la empresa Royal Canin por colaborar con la manutención de los animales y a InMed SRL por proveer el equipo ultrasonográfico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Verstegen J. Reproducción felina. In: Ettinger SJ, Feldman EC (Ed.). Tratado de medicina interna veterinaria. 5.ed. Buenos Aires: Inter-Médica, 2002; p. 1764-1780.
2. Felman EC, Nelson RH. Endocrinología y reproducción canina y felina. Reproducción felina. Intermedica, 1991; p. 608-609.
3. Swanson WF, Roth TL, Wildt DE. In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat biology of reproduction, 1994. 51: 452-464.
4. Knospe C. Periods and Stages of the Prenatal Development of the Domestic Cat. Anat. Histol. Embryol, 2002; 31: 37-51.
5. Johnston SD, Root Kustritz M, Olson PNS. Canine and feline theriogenology. 1 Ed. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto: W.B. Saunders Company. 2001.
6. Ilanes J, Orellana C, Fertilio B; Leyton V, Venegas F. Análisis Macroscópico y Microscópico del Desarrollo Embrionario y Fetal en el Gato (*Felis catus*), en Relación con el Desarrollo de la Vesícula Coriónica y de la Placenta. Int. J. Morphol, 2007; 25(3): 467-481.

7. Jemmett JE, Evans JM. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats, 1977; 18: 31-37.
8. Munday HS, Davidson HPB. Normal gestation lengths in the domestic shorthair cat (*Felis domesticus*) J Reprod. Fertil., 1993; 47: 559.
9. Prescott CW. Reproduction, patterns in the domestic cat. Aust. Vet. J., 1973; 49: 126-127.
10. Rott MV, Johnston SD, Olson PN. Estrous length, pregnancy rate gestation and parturition lengths, litter size and juvenile mortality in the domestic cat. J Am Anim Hosp Assoc, 1995; 31: 429-433.
11. García S. Fisiología Veterinaria. Reproducción en perros y gatos domésticos. Medardo V. Hernández Rodríguez. Ed McGraw-Hill, Interamericana. México, 1995; p 981-986.
12. Simpson GM, England GCW, Harvey M. Manual of small animal reproduction and neonatology. Ed British Small Animal Association. England, 1998.
13. Romagnoli S. Control of reproduction in dogs and cats: use and misuse of hormones. IVIS website with the permission of WSAVA, 2006; p.701-706.
14. Wanke MM, Romagnoli S, Verstegen J, Concannon PW. Pharmacological Approaches to Pregnancy Termination in Dogs and Cats Including the Use of Prostaglandins, Dopamine Agonists, and Dexamethasone. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA, 2002.
15. Verstegen J, Onclin K, Silva LDM, et al. Induction of abortion in bitches and cats by cabergoline. Ann Med Vet ,1993; 137: 251-259.
16. Erünal-Maral N, Aslan S, Findik M, Yüksel N, Handler J, Arbeiter K. Induction of abortion in queens by administration of cabergolina (Galastop) soley or in combination with the PGF2alfa analogue Alfaprostol (Gabbrostim). Theriogenology, 2004; 61: 1471-1475.
17. Nachreiner RF, Marple DN. Termination of pregnancy in cats with prostaglandinF2alfa. Prostaglandins, 1974; 7: 303-308.
18. Bruce E. Eilts. Pregnancy Termination in the Bitch and Queen. Clinical Techniques in Small Animal Practice, 2002; 17 (3): 116-123.
19. Baldwin C, Evans LE, Peter AT. Evaluation of natural prostaglandm therapy for pregnancy termination in the domestic cat. Feline Pract, 2000; 28: 16-21.
20. García Mitacek MC, Gimenez F, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, et al. Eficacia de aglepristone y cloprostenol para interrumpir la gestación media en la gata. XXV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán, 2008.
21. Verstegen J, Onclin K, Silva LD, Wouters-Ballman P, Delahaut P, Ectors F. Regulation of progesterone during pregnancy in the cat: studies on the roles of corpora lutea, placenta and prolactin secretion, J Reprod Fertil Suppl., 1993; 7: 165-173.
22. García Mitacek MC, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli C.M, Nuñez Favre R, de la Sota RL, et al. Eficacia de Cloprostenol para interrumpir la gestación media y tardía en la gata doméstica. X Jornadas de divulgación técnico científicas de la Facultad de Cien-

cias Veterinarias UNR., 2009; p 106-107.

23. García Mitacek MC, Mansilla Hermann D, Stornelli MC, Savignone CA, Tittarelli CM, Nuñez Favre R, et al. Interrupción temprana de la gestación en la gata doméstica (*Felis catus*). XI Jornadas de divulgación técnico científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNR, 2010; p 131-132.

24. Onclink K, Verstegen J. Termination of pregnancy in cats using a combination of cabergoline, a new dopamine agonist, and a synthetic PGF2 alpha, cloprostenol, *J Reprod Fertil Suppl.*, 1997; 51: 259-263.

25. Georgiev P; Wehrend A. Mid-gestation pregnancy termination by the progesterone antagonist aglepristone in queens. *Theriogenology*, 2006; 65: 1401-1406.

26. Georgiev P; Wehrend A. Histological changes of the feline cervix, endometrium and placenta after mid-gestacional termination of pregnancy with aglepristone. *Reproduction in domestic animals.*, 2008; 43: 409-414.

27. Fiéni F, Martal J, Marnet PG, Siliart B, Guittot F. Clinical, biological and hormonal study of mid-pregnancy termination in cats with aglepristone. *Theriogenology*, 2006; 66: 1721-1728.

28. Nuñez Favre R, Giménez F, Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, de la Sota RL, et al. Induction of abortion in queens by administration of aglepristone (Alizin®): preliminary results. *Theriogenology*, 2007; 68: 499-500.

29. García Mitacek MC, Stornelli MC, Savignone CA, Nuñez Favre R, Tittarelli MC, Fumagali F, et al. Interrupción de la gestación media en gatas mediante la administración de aglepristone. Fertilidad postratamiento. VII Congreso Nacional SUVEPA, Congreso Nacional AUVE. Uruguay, 2009.

30. Georgiev P, Bostedt H, Goericke-Pesch S, Dimitrov M, Petkov P, Stojanthev K, et al. Induction of abortion with Aglepristone in cats on day 45 and 46 after mating. *Reprod Dom Anim doi:*, 2009.

31. García Mitacek MC, Stornelli MA, Stornelli MC, Savignone CA, Bonaura MC, Nuñez Favre R, et al. Early pregnancy termination by aglepristone in queens. Annual Conference & Symposium, Society for Theriogenology, 2010; p 358.

32. García Mitacek MC, Stornelli MC, Bonaura MC, de la Sota RL, Stornelli MA. Variaciones ultrasonográficas del saco gestacional en gatas tratadas con aglepristone. XIX Jornadas Veterinaria en Pequeños Animales, Jornadas de Intermédica. Buenos Aires, 2010.

33. García Mitacek MC, Stornelli MC, Tittarelli CM, de la Sota RL, Stornelli MA. Evaluación de la fertilidad en gatas previamente tratadas con aglepristone. XII Jornadas de divulgación técnico científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNR. Segunda Reunión Conjunta UNL - UNR. 2011.

34. Goericke-Pesch S, Georgiev P, Wehrend A. Prevention of pregnancy in cats using aglepristone on days 5 and 6 after mating. *Theriogenology*, 2010; 74: 304-310.

STOCHASTIC ESTIMATION FOR SEROPREVALENCE OF INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS IN BROILERS IN URUGUAY

Trenchi G¹, Suzuki K², Corva SG², Rodríguez G¹, Trenchi H¹, Petruccelli M²

¹Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Uruguay.

²Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

ABSTRACT: *The objective of this study was to estimate the true seroprevalence of seropositive individual broilers against infectious laryngotracheitis virus in Uruguay using a Bayesian inference software based on Markov chain Monte Carlo technique. Seventeen farms were kept under investigation between 2008 and 2009. Each study flock was randomly selected at different farms recruited from the capital city Montevideo, Canelones and Lavalleja Departments. The required total sample size was determined by power analysis, and blood samples collected were analysed using a commercial ELISA for the detection of antibody to the pathogen mentioned above. The overall seroprevalence of the virus was estimated at 31.5% [95% Bayesian credible interval (16.8–49.2%); N = 1790]. Because none of the study broilers had been inoculated against the virus prior to sampling, most of these results could be ascribed to natural exposure by field viruses and/or vaccine viruses from neighbouring layers. It should be considered as further risk assessment for clarifying the suitable vaccines to prevent chicken population in Uruguay from the virus.*

KEY WORDS: epidemiology, herpesvirus, poultry

ESTIMACION ESTOCASTICA DE LA SEROPREVALENCIA DEL VIRUS DE LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA EN POLLOS PARRILLEROS DE URUGUAY

RESUMEN: *El objetivo de este estudio fue estimar la real seroprevalencia de pollos parrilleros seropositivos contra el virus de la laringotraqueitis infecciosa en Uruguay, mediante el uso de un "software" de inferencia Bayesiana que aplica la metodología de Monte Carlo basado en Cadenas de Markov (MCMC). En la investigación se incluyeron diecisiete granjas entre los años 2008 y 2009. Cada galpón fue seleccionado al azar en granjas ubicadas en la ciudad capital, Montevideo, y en los Departamentos de Canelones y Lavalleja. El tamaño de muestra necesario fue determinado en base al poder estadístico del análisis, y las muestras de sangre recolectadas fueron analizadas utilizando un ELISA comercial para la detección de anticuerpos contra el patógeno mencionado anteriormente. La seroprevalencia total del virus fue estimada en 31.5% [95% intervalo de credibilidad Bayesiano (16.8–49.2%); N = 1790]. Debido a que ninguno de los individuos bajo estudio habían sido vacunado contra el virus previamente al muestreo, la mayoría de los resultados podrían ser atribuidos a la exposición natural al virus de campo y/o al virus vacunal de aves en galpones vecinos. Esto debería ser tenido en cuenta como un elemento adicional del análisis de riesgo en la adecuada selección de vacunas para prevenir el contagio del virus a la población de pollos en Uruguay.*

PALABRAS CLAVE: epidemiología, herpesvirus, aves de granja

Fecha de recepción: 29/08/05

Fecha de aprobación: 20/01/06

Dirección para correspondencia: Julio A. Copes, Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

INTRODUCTION

Infectious laryngotracheitis is an acute respiratory disease of poultry brought by Gallid herpesvirus 1, a member of the *Herpesviridae* family (1). It is distinguished by conjunctivitis, respiratory distress, increased mortality, and losses of productivity. Since there is no treatment for this disease, policies for the containment of it are normally based on stopping contact between the agent and the host through biosecurity, and/or by vaccination. Meanwhile, prevalence is a scale of animal disease frequency that concentrates on existing status rather than new events. Serological diagnostic tests are regularly used for seroprevalence studies and, preferably, true seroprevalence (TP) should be estimated from apparent seroprevalence or percentage of samples classified as test-positive with adjusting methods such as Bayesian inference (2). The objective of this study was to estimate the TP of seropositive individual broilers against infectious laryngotracheitis virus in Uruguay using a Bayesian inference software based on Markov chain Monte Carlo (MCMC) technique.

MATERIALS AND METHODS

STUDY AREA

Uruguay has a poultry population of 14 million, a poultry meat production of 45,000 tonnes per year and a poultry egg production of 43,600 tonnes per year (3). The south of the country including the capital city Montevideo and Canelones Department has the concentration of chicken population (about 90% of total), because of in-and-around the big market Montevideo (4).

SAMPLE COLLECTION

Seventeen farms of broilers older than 35 days of age were investigated. Each study flock was randomly selected at different farms selected from the capital city Montevideo, Canelones and Lavalleja (east of Canelones) Departments. None of the chickens had been inoculated against infectious laryngotracheitis virus prior to sampling. The required sample size of 1537 in total from a chicken population of 14 million was sufficient to obtain a 95% confidence interval (95% CI) with a desired precision of $\pm 2.5\%$ when the estimated seroprevalence was 50% (5). The sample size in each of the farms was proportionally assigned (1% each of the total number of chickens at study farms) by the attainable financial, human and material means. The field study was implemented from October 2008 to April 2009 inclusive, comprised

data collection through questionnaire interviews for each farm selected, in combination with blood sample collections for each chicken (questionnaire results were not treated with hereinafter).

LABORATORY EXAMINATIONS

Blood samples collected were used for diagnostic investigations. Sera were analysed using a commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of antibody to infectious laryngotracheitis virus in chicken serum (ProFLOK[®] ILT Ab Test Kit, Synbiotics Corporation, San Diego, CA). Positive and negative controls were included for each series of samples analysed. Absorbance was read on an ELISA reader at 405 nm. For estimating TP, the ELISA test sensitivity and specificity were not included into consideration due to unavailability of their publicised information.

DATA ANALYSIS

Data were collected and entered into a database using the Base in the OpenOffice.org software version 3.1.1 (Sun Microsystems, Santa Clara, CA, USA). A random effects hierarchical model described below was fitted using Bayesian methods which facilitate the estimation procedure for fitting complicated hierarchical models (6). The model was fitted at the first level of our model including an individual study-specific parameter. The number of test positive samples r_i for individual farm were modelled as a binary response variable with TP probability p_i :

$$r_i \sim \text{Binomial}(p_i, n_i)$$

At the second level of the hierarchy, the model was to assume that percentages of test positive were alike in some way. This was equal to specifying a random effects model for the TP probability p_i as follows. They were assumed to be drawn from a common Normal population distribution:

$$\text{logit}(p_i) = b_i$$

$$b_i \sim \text{Normal}(\mu, \tau)$$

A standard non-informative prior is then specified for the population mean (logit) or probability of overall seroprevalence, μ , with an alternative non-informative prior considered for the random effects variance (a uniform prior on the standard deviation), because of the absence of strong prior information:

$$\sigma \sim \text{Uniform}(0, 100)$$

$$\tau = 1 / \sigma^2$$

The TP probability and associated 95%

Bayesian credible intervals (95% BCI) were computed via the Gibbs sampler, a MCMC technique, which was implemented using WinBUGS software (7). The exponential of these TP probabilities was taken to obtain overall seroprevalence estimates (Prev) and their 95% BCIs:

$$\text{Prev} = \exp(\mu) / (1 + \exp(\mu))$$

$$\mu \sim \text{Normal}(0.0, 1.0E-6)$$

Results presented here were based on multiple runs of length 100,000 following a burn-in of 10,000 iterations to achieve convergence.

RESULTS

The 1790 broilers studied accounted for about 1.0 % of the study population and 0.01% of the total chicken population in Uruguay then. Blood samples collected from 1790 broilers in the study farms were serologically investigated. The statistical precision was slightly improved from $\pm 2.5\%$ to $\pm 2.3\%$ because of the eventual total number of samples of 1790 (larger than planned) and the overall percentage of test positive of 39% (95% CI: 37-42%, smaller than expected). All the farms had test-positive broilers (flock seroprevalence of 100% with 97.5% lower confidence limit of 80%). Percentages of test positive were highly variable between the study farms (1-90%) on the basis of different sample sizes (30-222). Table 1 shows the estimated TP against infectious laryngotracheitis virus among the study broilers categorised by farms. All the point estimates of TP were greater than 2%, between 2.6% and 88.8%. All the values for the percentage of test-positive were well within the Bayesian credible intervals of the estimated TP.

DISCUSSION

When we think of determining the prevalence of any particular infectious diseases, several factors differ between studies, including study area, study period, sampling method and sample size. These variations between study designs make it difficult to draw generalisable conclusions regarding the prevalence of the diseases. Random effects hierarchical models strengthen the power of individual and relatively small studies by compiling results from independent studies (6). The strengthened power leads to a higher precision of the estimates, by that means decreasing the variance and more accurately pointing out notable results. Adjusted outcomes are required for precise comparison of seroprevalence estimates. One of the aims of the current study was to illustrate how a hierarchical modelling approach permits the dependable estimation of the uncertainty corresponding an individual broiler farm study's effect on outcome. The advantage of the approach taken in the

study was that outcome data from all studies could be incorporated in one coherent inference framework, including relatively small samples. The hierarchical model pooled data across all field investigations to calculate the prevalence and Bayesian credible intervals thus making comparative assessment more robust, and more reliable (7). The overall antibody seroprevalence of infectious laryngotracheitis virus (31.5%) would be comparably high. Given the use of vaccine in the layer chicken population in Uruguay, most of these results could be ascribed to natural exposure by field viruses and/or vaccine viruses from neighbouring layers (8). It should be considered as further risk assessment for clarifying the suitable vaccines to prevent chicken population in Uruguay from the virus.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was conducted as part of the project for the capacity development for improvement of livestock hygiene in the southern part of South America through regional cooperation [in Spanish: Proyecto de desarrollo profesional continuo para los veterinarios del Sur (PROVETSUR)] funded by the Japan International Cooperation Agency (JICA). This project was awarded by JICA's President Dr Sadako Ogata in October 2011, in recognition of its outstanding contribution to the development of human resources, society and the economy in Argentina and its neighbouring countries including Uruguay.

BIBLIOGRAPHY

1. Dufour-Zavala L. Epizootiology of infectious laryngotracheitis and presentation of an industry control program. *Avian Dis.* 2008, 52(1): 1-7.
2. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *Veterinary epidemiologic research*, 2nd ed. AVC Inc., Charlottetown (Canada), 2009, p. 865.
3. FAO. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/default.aspx>, accessed on 30 May 2010.
4. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). División Contralor de Semovientes (DI.CO.SE.). <http://www.mgap.gub.uy/dgsg/DICOSE/dicose.htm>, accessed on 30 May 2010.
5. Hintze J. PASS 2008 software. Kay-ville (USA), 2008.
6. Martin SW, Meek AH, Willeberg P.

Veterinary epidemiology. Iowa State University Press, Ames (USA), 1987, p. 343.

7. Lunn DJ, Thomas A, Best N, Spiegelhalter D. WinBUGS - a Bayesian modelling framework: concepts, structure, and extensibility. Stat. Comput. 2000, 10(4): 325-37.

8. Trenchi H, Petruccelli M, Trenchi G, Rodríguez G, Suzuki K. Evidencia serológica de la presencia del virus de la laringotraqueítis infecciosa en parrilleros en Uruguay. VII Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria. Montevideo (Uruguay), 7-8 November 2011.

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 \$ 100 (o 50 U\$S si el lugar de trabajo del primer principal proviene del exterior) hasta 5 hojas (publicadas) y \$ 50 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>