

Revista on-line
www.scielo.org.ar
www.fvet.uba.ar

ISSN 1514-6634
ISSN (on line) 1668-3498
Volumen 22 N° 1
Junio 2020

InVet

Investigación Veterinaria

Revista Argentina de Investigación en Ciencias Veterinarias



UBA
1821 Universidad
de Buenos Aires

.UBAveterinaria 
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Revista Oficial de la Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Buenos Aires, Argentina
Incorporada en el Núcleo Básico de Publicaciones Periódicas
y Científicas del CONICET

Volumen 22 N° 1
Junio 2020

InVet


Esta revista abarca publicaciones científicas correspondientes a las áreas de conocimiento de las Ciencias Veterinarias:
Ciencias Básicas, Producción Animal, Medicina Preventiva, Salud Pública y Bromatología, Salud Animal y Formación General.

Revista Oficial de la Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Buenos Aires, Argentina
Incorporada en el Núcleo Básico de Publicaciones Periódicas
y Científicas del CONICET



UBA
1821 Universidad
de Buenos Aires

.UBAveterinaria 
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



InVet

(Investigación Veterinaria)

Vol. 22 N° 1, 2020

Buenos Aires, Argentina

ISSN 1514-6634 (impreso)

ISSN 1668-3498 (en línea)

URL: <http://www.fvet.uba.ar/?q=invet-2#invet>

URL: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php>

Revista de publicación semestral propiedad de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

Director Responsable:

Prof. Dr. Alejo Pérez Carrera

Comité Científico Editorial (CCE):

Prof. Dr. Daniel M. Lombardo¹

Prof. Dra. Andrea Calzetta Ressio¹

Prof. Dra. Mariana Córdoba¹

Dra. Graciela Marrube¹

Prof. Dra. Deborah M. Neild¹

Prof. Dra. Adriana Bentancor¹

Prof. Dra. Nélica Gómez¹

Prof. Dra. Viviana Negro¹

Prof. Dra. María Laura Fischman¹

Dra. Mabel Ribicich¹

Dr. Leonardo Minatel¹

Dr. Osvaldo Degregorio¹

Dra. Silvia Mundo¹

Dra. Susana Gil¹

Dr. Gustavo Claudio Barbeito

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP (Argentina).

Dr. Hugo Héctor Ortega

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL (Argentina).

Dr. Hugo Solana

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNICEN (Argentina).

Dra. M.V. Raquel Pérez Clariget

Facultad de Agronomía, Universidad de la República. (Uruguay).

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. (Argentina)

Comité Evaluador:

El arbitraje de los artículos es externo siendo los evaluadores designados por el CCE de InVet en función de la temática de los mismos.

Informes:

Comité Editorial InVet

Av. Chorroarín 280 (C1417CWO)

Buenos Aires, Argentina

Tel: 5287-2000

e-mail: invet@fvet.uba.ar

Editor Ejecutivo:

Prof. Dr. Daniel M. Lombardo

Comité Científico Asesor (CCA):

Dr. Julián Alberto Bartolomé

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. (Argentina).

Dr. Edmundo Juan Larriou

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. (Argentina).

Dr. Héctor Dante Tarabla

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL (Argentina).

Dr. Juan Carlos Stockert

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. (España).

Dr. Luis Fernando Calvino

Estación Experimental Agropecuaria (E.E.A.) Rafaela. (Argentina).

Dr. Guillermo Esteban Meglia

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. (Argentina).

Dra. Pilar Peral García

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP (Argentina).

Dra. Cecilia Mónica Galosi

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP (Argentina).

Dr. Sebastián Picco

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP (Argentina).

Dra. Alejandra Volpedo

Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. (Argentina).

Dra. Alicia Fernández Cirelli

Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. (Argentina).

Dr. Gaud Dervilly-Pinel

École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique | Oniris. (Francia)

Dr. Bruno Le Bizec

École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique | Oniris. (Francia).

Dr. Carlos Alberto Antunes Viegas

Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias (ECAV) da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). (Portugal).

Dr. Alejandro Benech Gulla

Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. (Uruguay).

Dra. Guadalupe Miró Corrales

Comité Científico Asesor (CCA) Cont.:

Universidad Complutense de Madrid. (España).

Dr. Albert Lloret Roca

Hospital Clínic Veterinari, Universidad Autònoma de Barcelona.
(España).

Dr. Ricardo Gelpi

Facultad de Medicina, UBA. (Argentina).

Dr. Eduardo Roldan

Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid. (España).

Dr. Pablo Murcia

Institute of Infection, Immunity & Inflammation. University of
Glasgow. (Escocia).

Dr. Gustavo A. Delhon

School of Veterinary and Biomedical Sciences. University of Nebras-
ka. (Estados Unidos).

Dr. Francisco A. Uzal

California Animal Health and Food Safety Lab School of Veteri-
nary Medicine University of California. (Estados Unidos).

Dr. Prosun Bhattacharya

Department of Sustainable Development, Environmental Science
and Engineering, KTH Royal Institute of Technology. (Suecia).

Armado, diagramación e impresión

BMPress, editora e impresora.

Av. San Martín 4408 (C1417DRS) Bs. As. Argentina

Tel: 4504-6792

Los artículos de la revista no pueden ser reproducidos total o parcialmente sin la autorización expresa del Comité Editorial. La dirección no se responsabiliza por los conceptos vertidos en los artículos publicados, los que tienen sus respectivos autores responsables. Incorporada en el núcleo básico de publicaciones periódicas científicas y tecnológicas del CONICET.

Publicación incluida en Ulrich's, LATINDEX, CAB Abstracts, REVIVEC, e-revist@s, AGRI F. A. O., Redalyc.

Disponible en formato electrónico en la base SciELO, www.scielo.org.ar.

InVet se distribuye por canje y en forma gratuita a instituciones relacionadas, la versión on line es de acceso libre.



InVet

(Investigación Veterinaria)

Vol. 22 N° 1, 2020

Buenos Aires, Argentina

ISSN 1514-6634 (impreso)

ISSN 1668-3498 (en línea)

Índice / Contents

Artículos originales

Prueba *in vitro* de potencia de cefovecin luego de su conservación a distintas temperaturas

In vitro potency test of cefovecin after its conservation at different temperatures

Doxandabarat, XD; Paes Rodríguez, JD; Albarellos, GA. 5

Casuística de brucelosis ovina en establecimientos mixtos de la región norte de la provincia de La Pampa

Casuistry of sheep brucellosis in mixed establishments in the northern region of the province of La Pampa

Gómez, MB; Castillo, M; Cerutti, DA; Meglia, GE..... 11

Perfil farmacocinético de la gentamicina en cabras en lactación

Pharmacokinetic profile of gentamicin in lactating goats

Esmoris, S; Vera, V; Suarez Belzoni, F; Kreil, V; Ambros, L. 19

Utilización de potenciales evocados visuales para el diagnóstico y evolución de *Miastenia gravis* adquirida en caninos

Use of visual evoked potentials for the diagnosis and evolution of acquired

Myasthenia gravis in canines

Suraniti, AP; López, CM; Gilardoni, LR; Berttotti, A; Mundo, SL. 27

Polimorfismos en el extremo 5' del gen WDTC1 y su asociación con el espesor de grasa dorsal en cerdos Landrace

Polymorphisms in the 5' end of WDTC1 gene and its association with backfat thickness in Landrace pigs

Fassa, MB; Schor, A; Lloveras, MR; Marrube, G..... 33

Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino	
Use of a medium with soy lecithin for freezing equine semen	
<i>Caldevilla, M.; Ferrante, A.; Neild, D.</i>	41
Índice de autores	51
Instrucciones para los autores	53

Prueba *in vitro* de potencia de cefovecin luego de su conservación a distintas temperaturas

In vitro potency test of cefovecin after its conservation at different temperatures

DOXANDABARAT, XD¹; PAES RODRÍGUEZ, JD¹; ALBARELLOS, GA¹

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Farmacología

RESUMEN

El cefovecin es un antimicrobiano de espectro extendido de uso veterinario que pertenece a la tercera generación de cefalosporinas. Se expende como un liofilizado y la solución reconstituida tiene un vencimiento de 28 días conservado a 4 °C. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de modificaciones a lo largo del tiempo en la potencia antibacteriana del cefovecin reconstituido y almacenado de tres formas diferentes: 4 °C, -20 °C y -70 °C. Los tres primeros meses se comparó la potencia de cefovecin conservado a 4 °C, -20 °C y -70 °C, y entre los meses cuarto a duodécimo se comparó a -20 °C y -70 °C. La actividad antimicrobiana *in vitro* del antibiótico se evaluó mediante el método microbiológico de difusión en placa. Los parámetros evaluados (R2, pendiente y ordenada al origen) no fueron estadísticamente diferentes ($P > 0,05$) cuando se compararon para las distintas temperaturas de conservación a lo largo de todo el estudio. Se puede concluir que el cefovecin reconstituido no perdió su potencia antibiótica cuando fue sometido a congelación durante un período de 12 meses ni tampoco durante los 3 meses que se evaluó conservado en heladera.

Palabras clave: (betalactámico), (potencia), (conservación), (antibiótico), (cefalosporina).

Recibido: 27-07-19

Aceptado: 03-04-20

Correspondencia e-mail: Ximena D. Doxandabarat xdoxandabarat@fvet.uba.ar

SUMMARY

Cefovecin is a semisynthetic extended-spectrum antimicrobial for veterinary use that belongs to the third generation cephalosporins. It is sold as a lyophilized powder and, once it is reconstituted, the solution has a 28-day expiration conserved at 4 °C. The objective of the present work was to determine the presence of modifications over time in the antibacterial potency of the reconstituted and stored cefovecin in three different ways: 4 °C, -20 °C and -70 °C. The first three months after reconstitution, the potency of cefovecin was compared between the conserved dilutions at 4 °C, -20 °C and -70 °C; and, for the fourth to twelfth months after reconstitution, it was compared between conserved dilutions at -20 °C and -70 °C. The in vitro antimicrobial activity of the antibiotic was evaluated by plaque diffusion microbiological assay. The parameters evaluated (R2, slope and ordered at the origin) were not statistically different ($P > 0.05$) when they were compared for the different conservation temperatures throughout the entire study. It can be concluded that the reconstituted cefovecin did not lose its antibiotic potency when it was subjected to freezing neither during a period of 12 months nor during the 3 months that it was evaluated preserved in the refrigerator.

Key words: (beta-lactams), (potency), (conservation), (antibiotic), (cephalosporins).

INTRODUCCIÓN

El cefovecin es un antimicrobiano beta-lactámico de uso veterinario que pertenece a la tercera generación de cefalosporinas. Es un antibiótico semisintético con un espectro extendido.

Como otros β -lactámicos, interfiere con la síntesis de pared celular bacteriana uniéndose covalentemente a las proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), como la transpeptidasa y la carboxipeptidasa^{7, 8}. Tiene un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-positivas (estafilococos coagulasa positiva y negativa y estreptococos) y Gram-negativas (*Pasteurella multocida* y enterobacterias, incluyendo *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae*)¹².

En caninos se lo indica para el tratamiento de infecciones de la piel causadas por *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus* spp. o *E. coli*; para infecciones del tracto urinario causadas por cepas susceptibles de *E. coli* y *Proteus mirabilis*; y como terapia adyuvante al tratamiento quirúrgico para infecciones gingivales y de tejidos periodontales causadas por *Porphyromonas* spp. y *Prevotella* spp.^{7, 8}.

En gatos, cefovecin se indica para el tratamiento de infecciones de la piel causadas por cepas susceptibles de *P. multocida*, *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp.,

Peptostreptococcus spp., y *Clostridium* spp.; y para infecciones de tracto urinario asociadas a *E. coli*^{7, 8}.

Cefovecin está formulado para la administración subcutánea como dosis única o bien, repetido con un intervalo de 14 días (cuando son necesarias antibioticoterapias más prolongadas, como por ejemplo, pioderma canina). Tiene una prolongada vida media (de 5,5 días en perros y de 6,9 días en gatos)^{10, 11} y difiere de otras cefalosporinas en que presenta una alta unión a proteínas plasmáticas (>99% en gatos y >98% en perros) lo que determinaría su bajo volumen de distribución, larga vida media y prolongada duración de acción⁷.

Cefovecin se expende como un liofilizado (800 mg de cefovecin en un vial de 10 ml) que una vez reconstituido (concentración de 80 mg/ml) debe almacenarse refrigerado (entre 2-8 °C) y protegido de la luz. La solución reconstituida tiene un vencimiento de 28 días, según indica el prospecto inserto en el envase del producto o de hasta 56 días⁶.

Cualquier método que permita una conservación por más tiempo del antibiótico reconstituido tendría consecuencias prácticas positivas al permitir una utilización fraccionada y prolongada del mismo. Por esto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de

modificaciones a lo largo del tiempo en la potencia antibacteriana del cefovecin luego de reconstituido y almacenado de tres formas diferentes: en heladera (4 °C) y congelado a -20 °C y a -70 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

La actividad antimicrobiana *in vitro* del antibiótico, sometido a distintas condiciones de almacenamiento, se evaluó mediante el método microbiológico de difusión en placa² con modificaciones^{3,4}. Este método de determinación se basa en comparar la inhibición del crecimiento bacteriano, a través del diámetro de los halos de inhibición, que es producida por concentraciones conocidas del antibiótico que se está evaluando.

Se diluyó el liofilizado del antibiótico en agua destilada obteniendo una concentración final de 80 mg/ml y se lo fraccionó en alícuotas de 0,4 ml que se almacenaron en tubos cónicos Eppendorf de tres formas distintas (tratamientos):

-Tratamiento A: a 4-8 °C (durante 3 meses) como control de la actividad del antibiótico por el lapso de tiempo máximo y en las condiciones de conservación que indica el laboratorio productor (2 primeros meses); y, por un mes adicional.

-Tratamiento B: a -20 °C (durante 12 meses). Es la forma de conservación del antibiótico del que se deseaba evaluar la potencia *in vitro*.

-Tratamiento C: a -70 °C (durante 12 meses). Como control de la actividad del antibiótico en las condiciones recomendadas para la mayoría de las cefalosporinas^{1,5}.

Luego de reconstituido el preparado, se contrastaron los tres tratamientos mensualmente. Los tres primeros meses se compararon A, B y C, y entre los meses cuarto a duodécimo se compararon B y C.

Método microbiológico de determinación del antibiótico^{2,4}

Este método se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano y permite construir una curva de calibración relacionando el diámetro del halo de inhibición con la concentración del antibiótico.

Para decidir el microorganismo más adecuado para determinar la actividad antimicrobiana de cefovecin *in vitro* se probaron 2 bacterias estándares, *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 10031. Siendo seleccionada, según criterios de linealidad, exactitud y precisión, *E. coli* ATCC 25922⁹ (resultados no mostrados en el este trabajo).

Se realizó una prueba mensual donde a partir de una alícuota sometida a cada tratamiento se construyeron curvas estándares con las siguientes diluciones del antibiótico: 200, 100, 50, 10 y 5 µg/ml.

Las diluciones se sembraron por triplicado en placas de Petri de 15 cm de diámetro, estériles, con agar Müller-Hinton (28 ml/placa) inoculado con el microorganismo patrón (5 x 10⁵ ufc/ml). Luego de 18 horas de incubación a 34-35 °C se leyeron los halos de inhibición mediante un calibre digital.

Con los halos de inhibición de cada tratamiento se construyeron las correspondientes curvas del log concentración de cefovecin (ug/ml) / diámetro del halo de inhibición (mm).

Validación y análisis estadístico⁹

Para cada curva (de cada tratamiento y de cada ensayo mensual) se determinó la validez de la determinación según los siguientes criterios de validación: linealidad (R^2), precisión (CV<15% para todas las diluciones y <20% para el límite de cuantificación o LLOQ) y exactitud (80-120% para todas las diluciones).

Para la comparación de la actividad antimicrobiana (potencia del antibiótico) entre los tres tratamientos para cada uno de los meses que duró el ensayo se contrastaron estadísticamente la pendiente, ordenada al origen cuando $x=0$ y valor de R^2 . Se utilizó un test de ANOVA para las comparaciones de los tratamientos del primer, segundo y tercer mes (entre los tratamientos A, B y C) y un test de t para las comparaciones correspondientes del tercero al duodécimo mes (entre los tratamientos B y C). Se consideraron diferencias significativas si $P<0,05$.

Para cada ensayo (cada mes) se compararon estadísticamente (test de F, $P<0,05$) las curvas

obtenidas con cada tratamiento para establecer su equivalencia en cuanto a pendientes y ordenadas al origen.

RESULTADOS

Los resultados de los distintos criterios de validación (media $\pm$ DE) de los tratamientos probados (4 °C, -20 °C y -70 °C) en los doce meses de estudio se muestran en la Tabla 1.

En la Figura 1 y 2 se muestran las curvas de los diámetros de halos en función del logaritmo de la concentración de cefovecin para cada tratamiento (A, B y C) al mes y al año de reconstituido, respectivamente.

Los parámetros evaluados (R^2 , pendiente y ordenada al origen) no fueron estadísticamente diferentes ($P>0,05$) cuando se compararon para las distintas temperaturas de conservación a lo largo de todo el estudio (12 meses).

En cada tiempo, las curvas de los diámetros de halos en función de la concentración fueron validadas, siendo la precisión (CV%) <3,90% en todos los casos y la exactitud entre el 80% y 120% (de 91,15% para el límite mínimo y de 114,68% para el máximo). En todos los ensa-

yos el LLOQ fue de 5 ug/ml. Las curvas, según sus pendientes y ordenadas al origen resultaron estadísticamente equivalentes ($P>0,05$).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las potencias calculadas fueron equivalentes tanto para la conservación en heladera hasta los 90 días (4 °C) como para el producto congelado hasta los 12 meses (a -20 °C o a -70 °C). Por esto, se puede concluir que el cefovecin reconstituido según las condiciones que indica el laboratorio productor no perdió su potencia antibiótica cuando fue sometido a congelación durante un período de 12 meses.

En cuanto a la conservación en heladera, durante los 3 meses que se evaluó, cefovecin tampoco modificó su potencia, sin embargo, su coloración cambió hacia un color pardo oscuro. Si bien se reporta que, la solución reconstituida conservada en heladera por 28 días puede cambiar su color a amarillento sin modificar su potencia (prospecto cefovecin).

En cuanto a la conservación congelado, la estabilidad de la potencia de cefovecin puede ser una gran ventaja en relación a su uso clínico,

Tabla 1: Promedio y desvío estándar de los R^2 , pendientes y ordenadas al origen de las curvas de los diámetros de halo en función de la concentración de cefovecin en las distintas temperaturas de conservación (4 °C, -20 °C y -70 °C) a lo largo del tiempo (12 meses).

Mes	R^2			Pendiente (media $\pm$ DE)			Ordenada al origen (media $\pm$ DE)		
	4°C	-20°C	-70°C	4°C	-20°C	-70°C	4°C	-20°C	-70°C
1	0,987	0,995	0,987	7,24 $\pm$ 0,23	6,84 $\pm$ 0,13	6,98 $\pm$ 0,22	6,67 $\pm$ 0,34	7,59 $\pm$ 0,19	7,21 $\pm$ 0,32
2	0,992	0,995	0,995	6,79 $\pm$ 0,17	6,86 $\pm$ 0,14	7,26 $\pm$ 0,14	7,71 $\pm$ 0,29	7,71 $\pm$ 0,23	6,98 $\pm$ 0,24
3	0,996	0,993	0,968	7,92 $\pm$ 0,14	7,48 $\pm$ 0,17	8,03 $\pm$ 0,40	8,69 $\pm$ 0,24	9,14 $\pm$ 0,28	8,47 $\pm$ 0,67
4		0,984	0,972		9,13 $\pm$ 0,32	8,49 $\pm$ 0,40		5,16 $\pm$ 0,53	5,88 $\pm$ 0,66
5		0,992	0,997		7,14 $\pm$ 0,17	7,03 $\pm$ 0,13		9,12 $\pm$ 0,29	9,08 $\pm$ 0,21
6		0,992	0,991		7,56 $\pm$ 0,19	7,66 $\pm$ 0,20		7,94 $\pm$ 0,32	7,95 $\pm$ 0,34
8		0,958	0,969		6,82 $\pm$ 0,41	7,96 $\pm$ 0,45		9,17 $\pm$ 0,70	6,19 $\pm$ 0,78
10		0,989	0,939		7,36 $\pm$ 0,21	8,17 $\pm$ 0,58		6,99 $\pm$ 0,35	4,25 $\pm$ 0,95
12		0,978	0,988		7,46 $\pm$ 0,31	7,10 $\pm$ 0,31		6,43 $\pm$ 0,51	7,30 $\pm$ 0,35

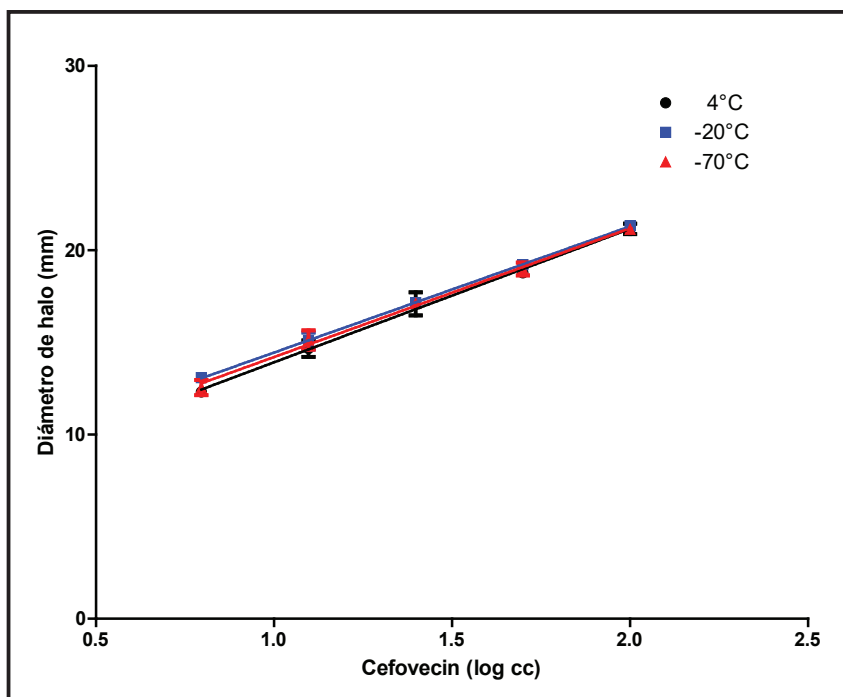


Figura 1. Curvas de los diámetros de halos en función del logaritmo de concentración de cefovecín para cada tratamiento (A= 4 °C, B= -20 °C y C= -70 °C) al mes de reconstituido.

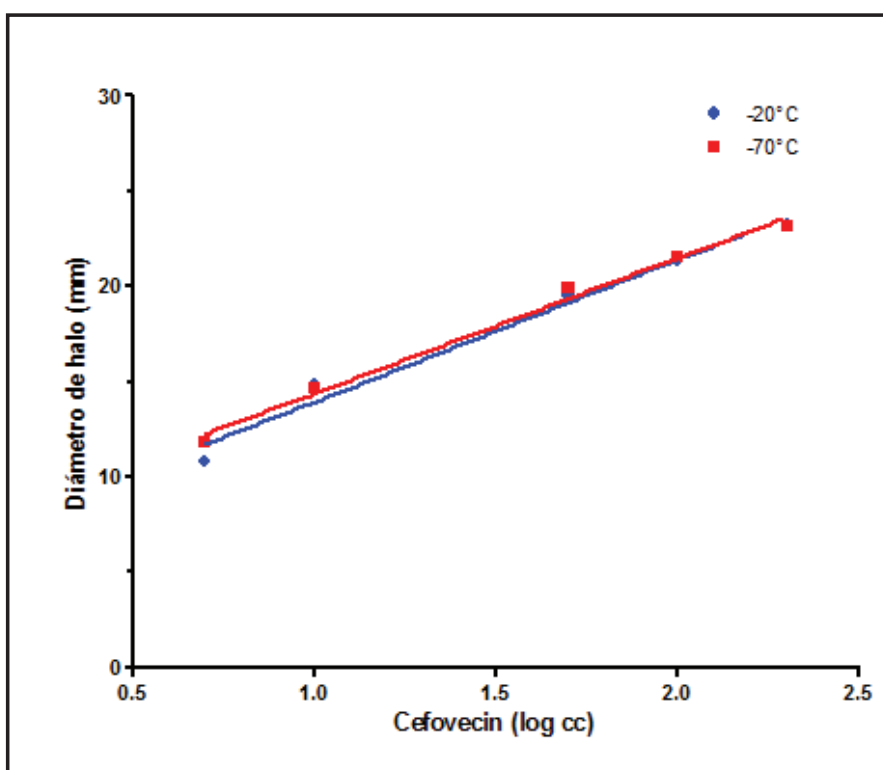


Figura 2. Curvas de los diámetros de halos en función del logaritmo de concentración de cefovecín para cada tratamiento (B= -20 °C y C= -70 °C) a los 12 meses de reconstituido.

porque permitiría su fraccionamiento en forma estéril en alícuotas de poco volumen (por ejemplo, en monodosis para utilizar en gatos o en perros pequeños), pudiendo conservarse de esta manera por hasta un año en un freezer doméstico. Sin embargo, hay que destacar que este estudio fue realizado *in vitro* y no incluyó la evaluación de la eficacia clínica del cefovecin luego de los distintos tratamientos. Esto se constituye en una limitación para la extensión de los resultados obtenidos, por lo que para recomendar la conservación de este antibiótico reconstituido y congelado (-20 °C), deben hacerse pruebas de eficacia clínica en animales con infecciones susceptibles.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado por el proyecto UBACYT 2018-2020, 20020170100574BA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrews, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48 (Suppl. S1):5-16.
2. ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). Valoración microbiológica de antibióticos. En Farmacopea Argentina, 7° Edición, Buenos Aires, Argentina, 2003:333-350.
3. Arret, B.; Johnson, D.P.; Kirshbaum, A. Outline of details for microbiological assays of antibiotics: second revision. *J Pharm Sci.* 1971; 60:1689-1694.
4. Bennet, J.V.; Brodie, J.L.; Benner, E.J.; Kirby, W.M.M. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Environ Microbiol.* 1966; 14(2):170-177.
5. Okerman, L.; Van Hende, J.; De Zutter, L.. Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. *Anal Chim Acta.* 2007; 586:284-288.
6. Papich, M.G. Saunders Handbook of Veterinary Drugs. Small and large animal. 4th Edition. Elsevier. St. Louis, USA, 2016.
7. Papich, M.G. β -Lactam antibiotics: Penicillins, cephalosporins, and related drugs. En Riviere, J.E.; Papich, M.G. Veterinary Pharmacology & Therapeutics. 10th Edition. Wiley Blackwell. NJ, USA. 2018: 826-857.
8. Prescott, J.F. Beta-lactam antibiotics: Cephalosporins. En Giguère, S.; Prescott, J.F.; Dowling, P.M. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 5th Edition. Wiley Blackwell, Ames, USA. 2013:153-173.
9. Shah, V.P.; Midha, K.K.; Dighe, S. *Et al.* Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. *J Pharmaceut Sc.* 1992; 81:309-312.
10. Stegemann, M.R.; Sherington, J.; Blanchflower, S. (2006a) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cefovecin in dogs. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 2006; 29:501-511.
11. Stegemann, M.R.; Sherington, J.; Coati, N.; Brown, S.A.; Blanchflower, S. (2006b). Pharmacokinetics of cefovecin in cats. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 2006; 29:513-524.
12. Stegemann, M.R.; Passmore, C.A.; Sherington, J. Antimicrobial activity and spectrum of cefovecin, a new extended spectrum cephalosporin, against pathogens collected from dogs and cats in Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(7):2286-2292.

Casuística de brucelosis ovina en establecimientos mixtos de la región norte de la provincia de La Pampa

Casuistry of sheep brucellosis in mixed establishments in the northern region of the province of La Pampa

GÓMEZ, MB^{1,2}; CASTILLO, M^{1,2}; CERUTTI, DA^{1,3}; MEGLIA, GE^{1,4}

¹UNLPam, Facultad de Ciencias Veterinarias. ²Cátedra de Biología General. ³Cátedra de Reproducción Animal. ⁴Cátedra de Inmunología Especial.

RESUMEN

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial que afecta a especies animales y al hombre; cuyos agentes etiológicos son las bacterias del género *Brucella*. Dentro de las enfermedades reproductivas infecciosas más relevantes que afectan al ovino, la epididimitis infecciosa por *Brucella ovis* es la más relevante. En la provincia de La Pampa, los únicos y últimos antecedentes sobre esta enfermedad en ovinos fueron realizados en el 2008 y todos los animales fueron negativos. El objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de Brucelosis ovina en establecimientos mixtos de la provincia de La Pampa, bajo las exigencias y normativas del SENASA Res. 545/2015, para análisis de Brucelosis ovina. El trabajo se llevó a cabo en 9 establecimientos. Se examinaron y tomaron muestras de sangre a 270 ovinos, 78 hembras y 192 machos. En el laboratorio se realizó, Inmunodifusión en Gel de Agar, y la prueba de Antígeno Bufferado en Placa. Los resultados arrojaron sobre un total de 270 muestras, 268 animales negativos y solo 2 reactivos a *Brucella ovis*. Estos resultados indican que trabajando adecuadamente es posible generar áreas libres de la misma y de esta manera apoyar el desarrollo de la actividad ovina, que actúa como un mecanismo de defensa para los pequeños y medianos productores.

Palabras clave: (*Brucella*), (ovinos), (epididimitis), (norte de La Pampa)

Recibido: 20-11-19

Aceptado: 30-05-20

Correspondencia e-mail: María Bettina Gómez mgomez@vet.unlpam.edu.ar

ABSTRACT

Brucellosis is a contagious worldwide disease that affects domestic animals, and humans; whose etiological agents are bacteria of the genus *Brucella*. Among the most important infectious reproductive diseases that affect sheep, *Brucella ovis* is the most significant. In the province of La Pampa, the only and last antecedents on this disease in sheep were done in 2008, and all the animals were negative. The aim of this study was to analyze the cases of ovine brucellosis in mix farms of La Pampa province, under the requirements and regulations of SENASA Res. 545/2015, for analysis of ovine Brucellosis. The trial was carried out in nine settlements of the north of the province. They were examined and took blood samples from 270 sheep, 78 females and 192 males. Agar gel immunodiffusion, and Buffer Plate Antigen (BPA) were performed in the laboratory. The results from a total of 270 samples were 268 negative animals, and only 2 reactive to *Brucella ovis*. These results indicate that working properly it is possible to generate free areas of ovine brucellosis and in this way support the development of sheep activity, which acts as a defense mechanism for small and medium producers.

Keywords: (*Brucella*), (sheep), (epididymitis), (north of La Pampa)

INTRODUCCIÓN

La Brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial que afecta a especies animales domésticas, de vida silvestre y al hombre; cuyos agentes etiológicos son las bacterias del género *Brucella*². La importancia de la Brucelosis radica en que es una enfermedad endémica en muchos países. Afecta la sanidad y la producción y además tiene una importante repercusión económica en el comercio internacional de animales y productos.

Los microorganismos del género *Brucella* son cocobacilos Gram negativos, no esporulados, acapsulados, carentes de pilis o flagelos⁵. Clasificados por sus diferencias antigénicas en “lisas” (smooth, S) o “rugosas” (rough, R) de acuerdo al aspecto de las colonias en medio sólido, que reside en el tipo de LPS expresado en mayor proporción en superficie: LPS-S y LPS-R, respectivamente^{6, 15}. El homopolímero lineal de perosamina, se encuentra ausente en el LPS-R de las especies rugosas (*B. ovis* y *B. canis*)¹³. Los antígenos de la membrana externa de *Brucella* han sido objeto de investigación desde el punto de vista del diagnóstico y de la inmunoprofilaxis; este interés es resaltado considerando que representa el punto de contacto inicial entre el patógeno y el hospedador¹⁵.

La Brucelosis en ovinos es causada por dos tipos de *Brucella* que tienen manifestaciones di-

ferentes, *Brucella ovis*, (cepa rugosa), y *Brucella melitensis*, (cepa lisa), también halladas, en esta especie animal en otras partes del mundo^{7, 12}. Por esto los signos de los animales, la problemática que causan, el diagnóstico, la vacunación y el control son diferentes en cada caso.

Dentro de las enfermedades reproductivas más relevantes que afectan al carnero, está la epididimitis infecciosa por *Brucella ovis*. Es una enfermedad de alta prevalencia en Argentina (4 al 20% en majada). En estudios epidemiológicos se detectó en la provincia Formosa una prevalencia global del 2% e intrapredial de entre 1 y 40%¹⁹. En trabajos procedentes de Patagonia y de provincia de Buenos Aires se documenta la existencia de *Brucella ovis* como agente causal de infertilidad en machos y abortos en hembras^{16, 8}. Dicha *Brucella* está diseminada en toda la Patagonia alcanzando prevalencias altísimas en esta región a nivel de establecimiento, con una media del 12%¹⁷.

Si bien *Brucella ovis* ha sido identificada en casi todas las regiones del país donde se crían ovinos (Patagonia, Mesopotamia y Pampa Húmeda), es necesario contar con datos más precisos y actualizados de prevalencia inter e intrapredios⁹.

La *Brucella melitensis*, tiene al caprino y ovino como sus huéspedes naturales, pero al ser la *Brucella sp.* más inespecífica del género, puede

infectar una gran cantidad de otras especies animales, entre ellos al ser humano, quien adquiere la infección por el consumo de leche no pasteurizada y sus derivados, o por el contacto con material infeccioso, siendo la causante de la Fiebre de Malta¹⁴.

En Argentina, la Brucelosis posee una elevada prevalencia en bovinos, del 4-5%²⁰. Si bien la resolución 545/2015 amparada en la ley N° 24.696 que declara de interés nacional el control y erradicación de la Brucelosis en las especies ovina, suina, no existe un programa consensuado a nivel nacional de Brucelosis ovina y caprina.

La provincia de La Pampa cuenta con 305.714 ovinos, distribuidos en 4.641 unidades productivas²³, de los cuales el 26,24% se encuentran en los departamentos de su región norte. Los únicos y últimos antecedentes sobre esta enfermedad en ovinos en esta región se registraron en un relevamiento llevado a cabo en el 2008, donde todos los animales fueron negativos a las pruebas para *B. ovis* y *B. melitensis*¹⁰.

Pequeños y medianos productores de la región noreste de la provincia de La Pampa han apostado a la producción ovina en el marco de la Ley 25.422 para la recuperación de la ganadería ovina; son comunes los sistemas mixtos agrícola-ganaderos, con el ovino manejado en majadas de consumo para el autoabastecimiento del establecimiento, y generando excedentes de carne para el mercado¹. En dicha región se han conformado dos cooperativas ovinas, que nuclean a los productores, cuya finalidad es fortalecer sus sistemas productivos y de comercialización. Para ello durante los años 2009 a 2015, se introdujeron reproductores machos y hembras provenientes principalmente de las provincias de Mendoza y Buenos Aires, con el objetivo de aumentar el número de madres e introducir una genética más carnífera. Sumado a esto, luego de la erupción del volcán chileno Puyehue en el 2011, que afectó a San Carlos de Bariloche, y Villa La Angostura, decretadas como zona de desastre, en emergencia económica y social, se introdujeron también hembras procedentes de Patagonia (información anecdótica).

En cualquier sistema de producción ganadero, donde el objetivo sea producir lana, carne o leche, es necesario que la majada tenga un buen estado de salud para poder expresar su potencial productivo eficientemente. Para ello es necesario proponer una alternativa de seguimiento o control y sobre la base de los resultados obtenidos apoyar el desarrollo de la actividad ovina, que actúa como un mecanismo de defensa para pequeños y medianos productores. El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de Brucelosis ovina en establecimientos mixtos de la provincia de La Pampa, bajo las exigencias y normativas del SENASA Res. 545/2015, para análisis de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el norte de la provincia de La Pampa, donde se analizó la casuística de Brucelosis ovina en establecimientos mixtos, durante el periodo 2014-2016. Los establecimientos seleccionados poseen entre 100 y 300 hectáreas, mixtos, pertenecientes a pequeños y medianos productores cuyas majadas ovinas son de entre 50 a 600 animales y se encuentran nucleados en dos Cooperativas ovinas, CROYA (Cooperativa regional ovina y productos alternativos) y ASOPROMA (Asociación cooperativa ganadera regional productores de Mauricio Mayer).

El muestreo se realizó sobre unidades productivas, mediante la Técnica de Bola de Nieve^{4, 21}. Se utilizaron 9 unidades productivas que alcanzaron en conjunto 270 ovinos para la práctica de la prueba diagnóstica de Brucelosis.

Se utilizaron para el testeo la totalidad de machos de cada unidad productiva, considerando en edad reproductiva a los mayores a seis meses de edad según Res. 545/2015 SENASA²², y en forma aleatoria, algunas hembras por majada, realizando un encierre de la majada y seleccionando las mismas al azar.

Se muestrearon ambos sexos debido a las vías de eliminación de la *Brucella ovis* y en referencia a lo citado en la Res. SENASA 545/2015²², donde se considera necesario realizar un diagnóstico de la situación sanitaria

inicial. Se testearon un total de 270 ovinos, 78 hembras y 192 machos. Se distribuyen según sexo, por unidad productiva de la siguiente manera: UP1: 15 hembras y 17 machos; UP2: 0 hembras y 17 machos; UP3: 3 hembras y 34 machos; UP4: 13 hembras y 27 machos; UP5: 0 hembras y 26 machos; UP6: 12 hembras y 2 machos; UP7: 8 hembras y 13 machos; UP8: 11 hembras y 20 machos; UP9: 16 hembras y 36 machos. La identificación de los animales fue realizada mediante caravanas y numerados a través de planillas de campo, bajo las estrictas reglas de confección de una carpeta sanitaria, según lo estipulado en la Res. 545 SENASA, donde consten datos del productor, del establecimiento y del stock ganadero.

A cada ovino relevado se le realizó el examen clínico general, para identificar síntomas compatibles con la patología a diagnosticar. El examen consistió en una inspección en general, donde se evaluó el estado general: conformación, constitución y estado de nutrición y una evaluación de la psiquis: conducta, facies, actitudes y locomoción; y una inspección en particular, donde se evaluaron signos vitales (tipo de respiración, temperatura a la palpación, exploración de las mucosas, sistema linfático y estado de hidratación). Finalmente, por su objetivo de producción, se realizó el examen en particular del aparato reproductor tanto femenino como masculino, siempre respetando las normas de bienestar animal.

La revisión de cada animal se realizó con el animal sentado sobre sus cuartos posteriores, erguido y con la cabeza levemente levantada para tener un fácil acceso a la zona del cuello y vena yugular¹⁸. Se realizó un boqueo para ver el estado de la dentadura y en base a la misma definir la edad del individuo. Seguidamente se revisaron nódulos linfáticos de la cabeza, cuello, miembros anteriores, miembros posteriores y genitales tanto del macho como de la hembra. Comenzando de arriba hacia abajo, se palparon los sub-maxilares y parotídeos, pre-escapulares, precrurales o prefemorales, inguinales y poplíteos, para observar presencia de alteraciones que pudieran consistir en aumento de tamaño, aumento de consistencia, aumento de tempe-

ratura¹⁸; seguidamente en los machos se tomó con ambas manos la bolsa escrotal y con un suave movimiento de tracción hacia afuera, se intentó hacer descender los testículos desde la zona inguinal, hasta tenerlos totalmente dentro de la bolsa escrotal, mientras que en las hembras se realizó la palpación de la glándula mamaria (estado y consistencia).

A cada animal se realizó la extracción de una muestra de sangre según la disposición del SENASA, que indica como adecuados los métodos y pruebas de diagnóstico de laboratorio para detección de *Brucella ovis*²². Las mismas se colectaron, en tubos de vidrio sin el agregado de aditivos para favorecer la coagulación. Para sangrar los animales, se utilizaron agujas 50 x 20, descartables, tomando la muestra de la vena yugular y se remitieron con el protocolo adecuado a la Facultad de Ciencias Veterinarias de General Pico, La Pampa para su posterior procesamiento, donde se cuenta con un laboratorio de red autorizado, Registro de SENASA L 12. En el laboratorio se extrajo el suero para ser congelado lo antes posible a -20 °C. La extracción del suero se realizó dentro de las 24 horas de obtenida la muestra por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Todos los sueros fueron testados para determinar la presencia de anticuerpos contra las cepas lisas de *Brucella spp.* a través de la prueba de Antígeno Bufferado en Placa (BPA), para detectar potenciales positivos a *Brucella melitensis* y *Brucella abortus*^{3, 2}. A su vez, todos los sueros se analizaron a través del Test de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) para determinar la presencia de anticuerpos anti *Brucella ovis*, utilizando antígeno provisto por SENASA, además este método fue seleccionado acorde con su Res. 545/15 que dispone como adecuados métodos y pruebas de diagnóstico de laboratorio para la detección de *Brucella ovis* a la prueba de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) o Elisa Indirecto (I-ELISA) y Fijación de complemento, todos reconocidos por la OIE y que cuentan con reconocimiento oficial²².

A los animales positivos a *Brucella ovis*, se les repitió dos veces la extracción de sangre y el análisis correspondiente. En una primera

instancia se indicó su aparte del resto del rebaño y luego del segundo análisis positivo se volvieron a testear con un intervalo de 30 días.

RESULTADOS

De un total de 270 ovinos analizados a los que se les realizó el Test de Inmunodifusión en Gel de Agar (IDGA) para determinar la presencia de anticuerpos anti *Brucella ovis*, resultaron, 153 carneros, 46 ovejas, 37 borregos y 32 borregas, negativos; y 2 carneros positivos a dicha prueba diagnóstica, la cual se le repitió a estos 2 últimos para su verificación, arrojando los mismos resultados.

De los dos carneros positivos a la IDGA, solo uno mostró sintomatología clínica, compatible con epididimitis del testículo derecho (Figura 1) y adenitis de los nódulos linfáticos precrurales. Cabe destacar que ambos animales

provenían del mismo establecimiento, y habrían sido adquiridos en la provincia vecina de Mendoza e ingresados como reproductores al establecimiento.

La revisión clínica arrojó en algunos casos lesiones testiculares, epididimitis (Figura 2), úlceras prepuciales, hipoplasias testiculares, hiperplasia testicular, pero ninguno de estos casos resultó positivo a IDGA.

Todos los sueros fueron testados para determinar la presencia de anticuerpos contra las cepas lisas de *Brucella spp.* a través de la prueba de Antígeno Bufferado en Placa (BPA), dando negativo en todos los casos.

No se hallaron signos clínicos compatibles con Brucelosis en las hembras en estudio, ni se registró información anecdótica de parte de los responsables de majada sobre hallazgo de abortos.



Figura 1. Testículo derecho. Carnero de 6 dientes, Positivo a IDGA.



Figura 2. Epididimitis testículo derecho. Carnero de 8 dientes. Negativo a IDGA.

DISCUSIÓN

A diferencia de los resultados obtenidos en otro estudio¹¹, donde se analizaron 1800 sueros, en la región norte de La Pampa, de los cuales 270 provenían de carneros y 1530 de ovejas, resultando la totalidad de las muestras analizadas negativas a la presencia de anticuerpos contra cepas tanto lisas como rugosas del género *Brucella* (*abortus*, *melitensis*, *ovis*), en este estudio realizado en la misma región sobre 155 carneros y 37 borregos, se hallaron 2 carneros positivos a *Brucella ovis*, con lo cual ya no se puede afirmar como nula a dicha zona.

El número de ovinos de las majadas de la zona norte de la provincia de La Pampa se ha incrementado durante los últimos diez años. Los productores, en su afán por aumentar la productividad de sus majadas, aprovechando los beneficios gubernamentales que les otorgó la Ley 25.422, adquirieron animales sin considerar el aspecto sanitario de los mismos. Sin embargo, el 99,25% de los animales analizados

fue negativo a *Brucella ovis*, y los dos animales positivos según la información obtenida ingresaron desde la provincia de Mendoza.

Otros investigadores⁹, indican que los datos obtenidos durante los últimos 8 años en el INTA Balcarce a partir de muestras remitidas en la provincia de Buenos Aires, mostraron amplia distribución de la Epididimitis en el centro y sudeste de la misma; y presencia de reactores en un alto porcentaje de los establecimientos que remitieron muestras (75%); los resultados encontrados en la región norte de La Pampa para *Brucella ovis* muestran una baja a nula proporción de reactores a la misma, teniendo en cuenta la cercanía de esta región con el sudeste de Buenos Aires.

En coincidencia con otro trabajo⁹, en el cual se halló mayor porcentaje de reactores en majadas generales comparado con cabañas, aquí los reactores positivos pertenecen a majada general y no a los 74 carneros analizados provenientes de las 3 cabañas muestreadas. Por último, teniendo en cuenta que la Brucelosis

se encuentra diseminada en toda la Patagonia alcanzando prevalencias altísimas en esta región a nivel de establecimiento¹⁷, con una media del 12% se debería diferenciar a la provincia de La Pampa, que también pertenece a la región Patagónica.

CONCLUSIÓN

El bajo porcentaje de casos ovinos de Brucelosis y su detección permitiría poner a la región norte de La Pampa en un planteamiento de trabajo para determinar zonas libres de la enfermedad en nuestro país, que posibilitaría además un elemento diferencial de la producción ovina regional. El buen funcionamiento sanitario y su seguimiento en las majadas son indispensables para evitar la diseminación de esta afección entre los animales.

BIBLIOGRAFÍA

- Agüero, D.; Freire, V.; Peralta, M.; Vigliocco, M. y Sandoval G. Diagnóstico de la cadena ovina en la provincia de Córdoba, Argentina. *Revista Mexicana de Agro negocios* 2010; 14(26): 161-177.
- Alton, G. G. *Brucella melitensis*. En: *Animal Brucellosis 1990*; Ed. por Nielsen y Duncan. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA; 17: 383-409
- Angus, R. D.; Burton, C. E. The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis. Developments in Biological Standardization. *3rd International Symposium on Brucellosis* 1984; 56: 349-356.
- Cochran, W.G. *Técnicas de muestreo*. Compañía Editorial Continental, México D.F 1974; 507p
- Corbel, M. J.; Brinley-Morgan, W. J. Genus *Brucella*: En: *Section 4. Gram Negative aerobic rods and cocci. Bergeys Manual*. 1984; pp. 377-387.
- Estein, S. M. Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* * 2006; ISSN 1695-7504, Vol. VII, nº 05.
- Garin-Brastuji, B.; Blasco, J. M.; Gayon, M.; Verger, J. M. *Brucella melitensis* in sheep: present and future. *Veterinary Research* 1998; 29: 255-274.
- López, G.; Ayala, S. M.; Escobar, G. I.; Lucero, N. E. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. *Veterinary microbiology* 2005; 105: 181-187.
- Manazza, J.; Spath, E.; Paolicchi, F. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Prov. de Bs.As.* 2006; 11(35): 42-44.
- Meglia, G. E.; Gastaldo, M. F.; Álvarez Rubianes, N.; Gómez, M. B.; Dubarry, J.; Oriani, D. S. Sheep antibodies survey of smooth and rough strains of *Brucella* in the North Patagonic area of La Pampa. *Ciencia Veterinaria* 2008; 10 (1):9-12.
- Meglia, G. E.; Gastaldo, M. F.; Álvarez Rubianes, N.; Gómez, M. B.; Dubarry, J.; Oriani, D. S. Determinación de la seroprevalencia de las cepas lisas y rugosas de *Brucella* en ovinos. En: <http://www.produccion-animal.com.ar> 2009.
- Minas, A.; Minas, M.; Stournara, A.; Tselepidis, S. The "effects" of Rev-1 vaccination of sheep and goats on human brucellosis in Greece. *Preventive Veterinary Medicine* 2004; 64: 41-47.
- Moreno, E.; Jones, L.M.; Verman, D.T. Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1984; 43: 779-782.
- Olsen, S.; Stoffregen, W.S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert vaccines* 2005; 4: 915-928.
- Robinson A.; Melling, J. Envelope structure and the development of new vaccines. *J. Appl. Bacteriol* 1993; 74: 43S-51S.
- Robles, C. A.; Uzal, F. A.; Olacchia, F. V.; Low, C. Epidemiological observations in corriedale flock affected by *Brucella ovis*. *Veterinary Research Communication* 1998; 22: 435-443.
- Robles, C. A. Salud Reproductiva del carnero. 1ra. Edición. Editorial INTA EEA Bariloche. En: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-salud_reproductiva_del_carnero.pdf 2004.
- Robles, C. A. Revisación clínica de los carneros. Editorial INTA EEA Bariloche. En: https://inta.gob.ar/sites/default/files/curso_ovinos_2015_-_libro6con_tapa.pdf 2014.
- Russo, A. M.; Mancebo, O. A.; Monzón, C. M.; Gait, J. J.; Casco, R. D.; Torioni de Echaide, S. M. Epidemiología de la brucelosis caprina y ovina en la provincia de Formosa, Argentina. *Revista argentina de microbiología* 2016; 48(2): 147-153.
- Samartino, L. E. Brucellosis in Argentina. *Veterinary Microbiology* 2002; 90: 71-80
- Sandoval Casilimas, C. A. Investigación Cualitativa. En *Briones, G.* 2002 (Ed.) especialización en Teoría, Métodos y Técnicas de investigación social. ICFES; 89-124.

22. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Resolución N° 545. Marco normativo para el control de la brucelosis-ovina. *Boletín oficial*. En: <http://www.senasa.gov.ar/senasa-comunica/noticias/nueva-resolucion-que-establece-el-marco-normativo-para-el-control-de-la-brucelosis-ovina> 2015.
23. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria., informes y estadísticas. En: <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/ovinos/informacion/informes-y-estadisticas> 2017.

Perfil farmacocinético de la gentamicina en cabras en lactación

Pharmacokinetic profile of gentamicin in lactating goats

ESMORIS, S¹; VERA, V₁; SUAREZ BELZONI, F₁; KREIL, V₁; AMBROS, L^{1,2}

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Farmacología. Buenos Aires, Argentina. ²CONICET-Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA). Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue describir el perfil farmacocinético y la llegada a leche de la gentamicina administrada por vía endovenosa, intramuscular y subcutánea en cabras en lactación. Seis cabras adultas sanas, en su segunda lactación y a partir de los 40 días post parto recibieron una dosis de 6,6 mg/kg de gentamicina por las tres vías estudiadas. Se siguió un diseño cruzado 2x2x2 y el período de lavado entre cada administración fue de 10 días. Se tomaron muestras de sangre y de leche a tiempos predeterminados y las concentraciones del antimicrobiano fueron determinadas por el método microbiológico. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos en plasma mediante un análisis compartimental. El perfil farmacocinético fue muy semejante independientemente de la vía de administración, no encontrándose diferencias estadísticas en ninguno de los parámetros farmacocinéticos. No se pudieron detectar concentraciones de la droga en la leche. Nuestros resultados sugieren que el comportamiento farmacocinético de la gentamicina administrada a una dosis de 6,6 mg/kg a cabras en lactación es similar, independientemente de la vía de administración empleada, y podría indicarse con éxito para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias sensibles con CIM igual o menor a 3,8 y 2,6 µg/ml luego de su administración sc o im, respectivamente.

Palabras clave: (farmacocinética), (gentamicina), (cabras), (lactación)

Recibido: 10-12-19

Aceptado: 09-06-20

Correspondencia *e-mail*: Luis Ambros ambros@fvet.uba.ar

SUMMARY

The objective of the present study was to describe the pharmacokinetic profile and milk concentrations of gentamicin administered by intravenous, intramuscular and subcutaneous routes in lactating goats. Six healthy lactating goats in their second lactation (40 days post-partum) received a single intravenous, intramuscular and subcutaneous administration of gentamicin at a dosage of 6.6 mg/kg. A 2x2x2 cross over design was employed, the wash out period was 10 days. Blood and milk samples were collected at predetermined time and drug concentrations were determined by microbiological assay. Plasma pharmacokinetic parameters were calculated using compartmental analysis. The pharmacokinetic profile was similar regardless of the route of administration. No differences were detected in the pharmacokinetic parameters. Gentamicin concentrations were not detected in milk. Our results suggest that the pharmacokinetic behavior of gentamicin administered at dose of 6.6 mg/kg to lactating goats would be similar regardless of the route of administration and could be successfully used for the treatment of infections caused by sensitive microorganisms with MIC equal or less than 3.8 or 2.6 µg/mL after sc or im administration, respectively.

Key words: (pharmacokinetics), (gentamicin), (lactating), (goats)

INTRODUCCIÓN

En Argentina, al igual que en el resto del mundo, la producción caprina es de fundamental importancia como sustento económico para pequeños productores y, en general, es llevada a cabo en explotaciones extensivas en relación a áreas agroecológicas marginales². Sin embargo, en los últimos años se ha observado una evolución de la producción lechera en regiones más favorables como la pampeana. Las enfermedades infecciosas son una de las causas más importantes de pérdidas económicas en el ganado caprino. Muchas veces la escasez de estudios hace que, para su tratamiento, se instauren esquemas antimicrobianos extrapolados desde otros rumiantes como ser bovinos y ovinos, sin contemplar que entre las diferentes especies pueden existir diferencias en la farmacocinética de las drogas que invalidan esta práctica^{12,13}. A su vez, dentro de la misma especie distintos factores como la edad²⁶, la gestación o la lactación^{18,23,4} así como la vía de administración¹⁰ pueden modificar el perfil farmacocinético de una droga. Por lo tanto, con la finalidad de emplear en forma racional un antimicrobiano, es imprescindible realizar estudios farmacocinéticos en cada estado fisiológico en particular.

Por sus características farmacocinéticas y

farmacodinámicas, los antibióticos aminoglucósidos son considerados como una importante herramienta para el tratamiento de enfermedades infecciosas de frecuente aparición, principalmente causadas por bacterias Gram negativas aerobias. La gentamicina, como miembro de este grupo, se caracteriza por ser un antimicrobiano concentración dependiente, siendo la relación entre la concentración plasmática máxima y la concentración inhibitoria mínima del microorganismo (C_{max}/CIM) el parámetro que mejor caracteriza su efecto bactericida^{8,11}. La farmacocinética de la gentamicina ha sido descrita en diferentes especies, incluso en cabras^{17,15,13,3,1,5}. Sin embargo, no hay trabajos realizados en cabras en lactación. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el perfil farmacocinético de la gentamicina en plasma administrada por vía endovenosa, subcutánea e intramuscular a cabras en lactación y determinar el pasaje de la droga a la leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: se utilizaron 6 (seis) cabras adultas en su segunda lactación, clínicamente sanas y con un adecuado estado sanitario y de la glándula mamaria. Ningún animal recibió tratamiento con drogas antimicrobianas al menos

un mes antes de comenzar con el experimento. Los animales fueron mantenidos sobre pasturas naturales con acceso al agua *ad libitum*. La producción diaria de leche fue de 520 ± 56 ml. El peso de los animales fue de 39 ± 4 kg. El ensayo farmacocinético se inició a los 40 días postparto. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

Diseño experimental: previo al ordeño manual completo, cada animal recibió una dosis única de 6,6 mg/kg de gentamicina (Gentamicina Interbiol®, solución al 4%, Laboratorio Interbiol, Buenos Aires, Argentina) por vía endovenosa (ev) en la vena yugular derecha, intramuscular (im) entre los músculos semimembranoso y semitendinoso y subcutánea (sc) en la tabla del cuello. Se empleó un diseño cruzado 2/2/2 con un período de lavado de 10 días entre las distintas administraciones. Se tomaron muestras de sangre (2ml a cada tiempo) de la vena yugular (en el caso de la administración ev se tomaron de la vena opuesta a la de la administración) a las 0, 0,08; 0,16; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12 y 24 h post-administración, se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y el plasma obtenido fue conservado a -20°C hasta su procesamiento. Las muestras de leche fueron obtenidas a las 0, 12 y 24 h post-administración. A cada tiempo los animales fueron ordeñados completamente (en forma manual), la leche obtenida de ambas glándulas mamarias fue homogeneizada y una alícuota de 2 ml fue conservada en idénticas condiciones a las del plasma.

Determinación de las concentraciones de gentamicina en leche y plasma: se empleó el método microbiológico de difusión en agar⁷. Se utilizó como microorganismo test *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) y agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Las muestras se sembraron por triplicado y los halos de inhibición fueron leídos luego de 18-20 horas de incubación a 36°C . Las curvas patrón en ambas matrices biológicas se realizaron el mismo día de cada experiencia,

utilizándose plasma o leche de cabra libre de antibiótico, siendo conservadas en idénticas condiciones que las muestras problema. El rango de concentraciones para el cual mostró linealidad fue entre 0,39 y 39,4 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.99$). El límite de cuantificación fue de 0,39 $\mu\text{g/ml}$.

Análisis farmacocinético: se realizó a partir de las curvas de disposición de cada animal utilizando el programa informático PCNONLIN 4.0 software (SCI Software, Lexington, KY, USA). Para las diferentes vías de administración se realizó un análisis compartimental, utilizando para la elección del modelo el que mejor ajustaba en cada caso los criterios de Akaike²⁷ y de Schwartz²⁴.

Para el caso de la vía ev, el modelo bicompartimental abierto fue el que logró el mejor ajuste, mientras que las vías extravasculares se ajustaron a un modelo monocompartimental. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante las ecuaciones clásicas asociadas a estos modelos¹⁶.

Análisis estadístico: los parámetros farmacocinéticos se compararon mediante el test no paramétrico de Wilcoxon (comparación entre vía im y sc) o mediante un test de ANOVA (Friedman) (comparación entre vía ev, im y sc).

RESULTADOS

No se observaron efectos colaterales tras la administración de la droga en ninguno de los animales. La Figura 1 muestra las curvas de disposición media (concentración plasmática en función del tiempo) para las tres vías estudiadas.

En la Tabla 1 se resumen los valores obtenidos de los parámetros farmacocinéticos luego de la administración ev, mientras que la Tabla 2 muestra el valor de los parámetros para las vías sc e im. Tras el análisis estadístico de los parámetros no se encontraron diferencias significativas en ninguno de ellos entre ambos tratamientos.

Las concentraciones de gentamicina en leche estuvieron siempre por debajo del límite de cuantificación del método.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos (media $\pm$ DE) de la gentamicina tras la administración de 6,6 mg/kg por vía endovenosa a cabras en lactación (n=6)

Parámetro farmacocinético	Vía endovenosa
C_1 ($\mu\text{g/ml}$)	$43,08 \pm 7,59$
C_2 ($\mu\text{g/ml}$)	$23,87 \pm 17,24$
K_d (h^{-1})	$1,49 \pm 1,16$
K_{el} (h^{-1})	$0,34 \pm 0,06$
$\text{AUC}_{(0-\infty)}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)	$105,44 \pm 25,48$
$T_{1/2(d)}$ (h)	$0,65 \pm 0,33$
$T_{1/2(el)}$ (h)	$2,07 \pm 0,33$
K_{10} (h^{-1})	$0,64 \pm 0,10$
K_{12} (h^{-1})	$0,38 \pm 0,50$
K_{21} (h^{-1})	$0,82 \pm 0,67$
V_c (l/kg)	$0,10 \pm 0,02$
$C_{p(0)}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$66,45 \pm 17,43$
Cl (l/kg·h)	$0,07 \pm 0,02$
MRT (h)	$2,14 \pm 0,24$
$V_{(d(ss))}$ (l/kg)	$0,14 \pm 0,03$

C_1 , C_2 , ordenada al origen de la fase de distribución y eliminación, respectivamente; K_d , constante de la fase de distribución; K_{el} , constante de la fase de eliminación; $\text{AUC}_{(0-\infty)}$, área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo desde el tiempo 0 hasta el infinito; $T_{1/2(d)}$, vida media de distribución; $T_{1/2(el)}$, vida media de eliminación; K_{10} , constante de eliminación desde el compartimiento central; K_{12} , constante de pasaje desde el compartimiento central al periférico; K_{21} , constante de pasaje desde el compartimiento periférico al central; V_c , volumen del compartimiento central; $C_{p(0)}$, concentración plasmática al tiempo 0.; Cl, clearance corporal; MRT, tiempo medio de residencia; $V_{(d(ss))}$, volumen de distribución en el estado estacionario.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

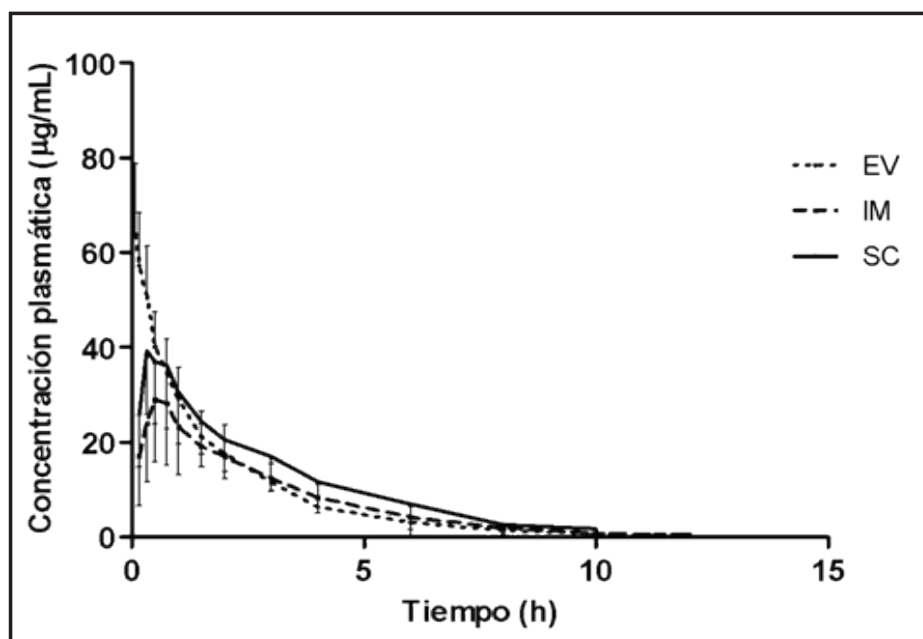
Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la vía de administración no influyó en el perfil farmacocinético de la gentamicina cuando fue administrada a cabras en lactación. Esto concuerda con un trabajo realizado previamente en nuestro laboratorio en el que la droga fue administrada por vía ev, im y sc a cabras preñadas⁵. Tras la administración ev, al igual que lo reportado en trabajos previos^{15,5}, la droga se distribuyó rápidamente, y el valor del volumen de distribución y del clearance evidenciaron la distribución de la droga

principalmente limitada al líquido extracelular y su excreción casi exclusivamente debida a procesos de filtración glomerular características de este grupo de antimicrobianos. A pesar de utilizar un análisis farmacocinético diferente, los valores de estos parámetros fueron similares a los obtenidos en cabras preñadas⁵ e igual a los obtenidos en yeguas preñadas y en lactación²³ y en ovejas preñadas²⁰. Si bien es de esperar que los diferentes cambios fisiológicos producidos durante la preñez puedan influir en la farmacocinética de algunas drogas, al igual que lo reportado en equinos, el estado fisiológico no

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos (media $\pm$ DE) de la gentamicina tras la administración de 6,6 mg/kg por vía subcutánea e intramuscular a cabras en lactación (n=6)

	Vía subcutánea	Vía intramuscular
K_a (h^{-1})	$7,11 \pm 4,27$	$3,15 \pm 2,43$
K_{el} (h^{-1})	$0,39 \pm 0,11$	$0,42 \pm 0,11$
$T_{1/2(a)}$ (h)	$0,14 \pm 0,10$	$0,51 \pm 0,37$
$T_{1/2(el)}$ (h)	$1,90 \pm 0,54$	$1,75 \pm 0,44$
T_{max} (h)	$0,54 \pm 0,27$	$0,86 \pm 0,55$
C_{max} ($\mu g/ml$)	$38,10 \pm 10,95$	$26,82 \pm 7,70$
$AUC_{(0-\infty)}$ ($\mu g \cdot h/ml$)	$126,24 \pm 55,92$	$90,74 \pm 22,55$
F (%)	$123,47 \pm 54,25$	$93,49 \pm 40,23$

K_a , constante de absorción; K_{el} , constante de eliminación; $T_{1/2(a)}$, vida media de absorción; $t_{1/2(el)}$, vida media de eliminación; T_{max} , tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima; C_{max} , concentración máxima; $AUC_{(0-\infty)}$, área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo desde el tiempo 0 hasta el infinito; F, biodisponibilidad.

**Figura 1.** Curvas de disposición (media $\pm$ DE) de la gentamicina luego de la administración de 6,6 mg/kg por vía endovenosa (ev), intramuscular (im) y subcutánea (sc) a seis cabras adultas en lactación.

modificaría la farmacocinética de la gentamicina como sucede con otros antimicrobianos como la eritromicina⁴ o la penicilina⁶. A diferencia de estos reportes, Oukessou y Toutain²⁰, encontraron que, en ovejas, el aumento del volumen extracelular observado al final de la gestación produce un aumento en el volumen de distribución de la gentamicina.

Tras la administración extravascular, trabajos realizados en distintas especies animales tampoco encontraron diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos entre las vías sc e im, y, al igual que en nuestro estudio, se reportó una completa absorción con una biodisponibilidad cercana al 100%^{17,5}. Sin embargo, estudios realizados en cabras no preñadas y en pollos demostraron una absorción completa tras la vía sc, pero algo menor para la vía im con una biodisponibilidad cercana al 80%^{15,1}. Si tenemos en cuenta la media y los desvíos estándar tanto de la biodisponibilidad sc como im se puede observar que, en ambos casos, algunos animales arrojaron valores superiores al 100%, si bien es difícil poder determinar la causa de este valor, en general viene determinada por fenómeno de flip-flop en el que la fase de absorción enmascara a la fase de eliminación. Si bien este fenómeno es frecuente tras la administración de preparados de liberación lenta, la irritación en el sitio de administración, también puede modificar la absorción de una droga. Al igual que lo ocurrido en este trabajo, la biodisponibilidad tras la administración subcutánea fue mayor a 100% tanto en cabras preñadas⁵ como en pollos¹.

El valor de la vida media de la gentamicina en cabras se encuentra dentro del rango reportado previamente para cabras y otras especies. Por ejemplo, tras la administración im a cabras Garg *et al.*¹⁵ encontraron un valor mayor que en el presente trabajo. Por el contrario, cuando fue administrada en pollos se observó una mayor vida media tras la administración sc¹.

En general, el pasaje de antimicrobianos a la glándula mamaria se lleva a cabo a través de mecanismos pasivos. Es por ello que la liposolubilidad del fármaco es uno de los principales factores que influyen en el mismo. Si bien el

uso de aminoglucósidos no está indicado en animales en lactación, su espectro de actividad determina que se les dé un uso extra-rótulo en cabras. Teniendo en consideración que los aminoglucósidos son drogas altamente polares, es de esperar que, tal como ocurrió en este trabajo, no se detectaran concentraciones del antimicrobiano en la leche. En un trabajo realizado en vacas, si bien se encontraron concentraciones de la droga, éstas fueron muy bajas siendo cercanas al límite de cuantificación del método empleado en nuestro caso (446 ng/ml)²¹. Teniendo en cuenta que el límite máximo de residuos permitido por la Unión Europea en leche es de 100 µg/l¹⁴, el límite de cuantificación del método de detección empleado en este trabajo, se encuentra por encima de ese nivel, por lo tanto, los resultados obtenidos permiten determinar, que la droga no sería efectiva para el tratamiento de infecciones en la glándula mamaria, siendo necesario realizar otros estudios para el análisis de residuos con la finalidad de poder establecer un adecuado período de retirada. Tras la administración intramamaria en vacas, Tan *et al.*²⁵ sugieren que debe ser mayor a 5 días, mientras que Martins *et al.*¹⁹ encontraron residuos del antimicrobiano sólo por 48 horas después de finalizado el tratamiento.

En la práctica clínica, se indica la administración de estas drogas una vez por día, este régimen posológico maximiza su eficacia permitiendo disminuir la aparición de cepas resistentes⁹ y minimizando la aparición de efectos tóxicos²². Considerando la relación Cmax/CIM, la cual debe ser de 8-10 para garantizar la eficacia de estas drogas, las concentraciones encontradas en este trabajo permitirían concluir que, a la dosis empleada, la administración de gentamicina a cabras en lactación sería eficaz para el tratamiento de bacterias sensibles con CIM menor a 3,8 y 2,6 µg/ml luego de su administración sc o im, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado por el proyecto UBACYT 2018-2020, 20020170100574BA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abu Basha, EA.; Idkaidek, NM.; Al Shunnaq, AF. Comparative pharmacokinetics of gentamicin after intravenous, intramuscular, subcutaneous and oral administration in broiler chickens. *Vet Res Com.* 2007; 31: 765-73.
2. Agraz, A.A. (1986). Cría y explotación de la cabra en América Latina. Editorial Hemisferio sur. Argentina. Primera edición. Capítulo 1.
3. Albarellos, G.; Montoya, L.; Ambros, L.; Kreil, V.; Hallu, R.; Rebuelto, M. Multiple once-daily dose pharmacokinetics and renal safety of gentamicin in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004; 27: 21-5.
4. Ambros, L.; Montoya, L.; Kreil, V.; et al. Pharmacokinetics of erythromycin in non-lactating and lactating goats after intravenous and intramuscular administration. *J Vet Pharmacol Ther.* 2007; 30: 80-5
5. Ambros, L.; Kreil, V.; Prados, A.P.; et al. Cinética comparativa de la gentamicina en cabras preñadas administrada por las vías intravenosa, intramuscular y subcutánea. *Rev Med Vet Bs As.* 2013; 94(2): 37-43.
6. Bengtsson, B.; Jacobsson, SO.; Luthman, J.; Franklin, A. Pharmacokinetics of penicillin-G in ewes and cows in late pregnancy and in early lactation. *J Vet Pharmacol Ther.* 1997; 20: 258-61.
7. Bennet, JV.; Brodie, JL.; Benner, EJ.; Kirby, WM. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Applied Microbiol.* 1966; 14:170-7.
8. Blaser, J.; Stone, BB.; Groner, MC.; Zinner, SH. Comparative study with enoxacin and netilmicin in a pharmacodynamic model to determine importance of ratio of antibiotic peak concentration to MIC for bactericidal activity and emergence of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987; 31: 1054-60.
9. Daikos, GL.; Lolans, VT.; Jackson, GG. First-exposure adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in vivo with meaning for optimal clinical use. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 117-23.
10. Delis, G.; Batzias, G.; Theodosiadou, E.; Kounenis, G.; KoutSoviti-Papadopoulou, M. Influence of the injection site on the pharmacokinetics of amoxicillin after intramuscular administration of a conventional and a long-acting formulation in sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 2009; 32: 269-75.
11. Drusano GL. Antimicrobial pharmacodynamics: critical interactions of "bug and drug". *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2: 289-300.
12. Elsheik, HA.; Ali, BH.; Homeida, AM.; Hapke, H.J. Pharmacokinetics of antipyrine and sulphadimidine in camels, sheep and goats. *J Vet Pharmacol Ther.* 1991; 14: 269-75.
13. Elsheikh, HA.; Osman, IA.; Ali, BH. Comparative pharmacokinetics of ampicillin trihydrate, gentamicin sulphate and oxytetracycline hydrochloride in Nubian goats and Desert sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 1997; 20: 411-4.
14. EMEA (2016). Comitee for Medicinal Products for Veterinary Use. European Public MRL assessment report.
15. Garg, SK.; Verma, P.; Uppal, RP. Pharmacokinetics of gentamicin following single-dose parenteral administration to goats. *Br Vet J.* 1995; 151: 453-8.
16. Gibaldi, M.; Perrier, D. 1982. Farmacocinética. 2 edición, 47-98. Editorial Reverté S.A., Barcelona.
17. Gilman, JM.; Davis, LE.; Neff Davis, CA.; Koritz, GD. Plasma concentration of gentamicin after intramuscular or subcutaneous administration to horses. *J Vet Pharmacol Ther.* 1987; 10: 101-3.
18. Loebstein, R.; Lalkin, A.; Koren, G. Pharmacokinetic changes during pregnancy and their clinical relevance. *Clinical Pharmacokinetics.* 1997; 33: 328-43.
19. Martins, T.; Santos, AFS.; Miranda, MS.; et al. Persistence of gentamicin residues in cow milk after intramammary treatment. *Revue Méd Vét.* 2014; 165 (3-4): 62-7.
20. Oukessou, M.; Toutain, P. Influence of the stage of pregnancy on gentamicin disposition in the ewe. *Ann RechVét.* 1992; 23 (2): 145-50.
21. Pedersoli, WM.; Jackson, J.; Frobish, RA. Depletion of gentamicin in the milk of Holstein cows after single and repeated intramammary and parenteral treatments. *J Vet Pharmacol Ther.* 1995; 18:457-63.
22. Rybak, MJ.; Abate, BJ.; Kang, SL.; Ruffing, MJ.; Lerner, SA.; Drusano, GL. Prospective evaluation of the effect of an aminoglycoside dosing regimen on rates of observed nephrotoxicity and ototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 1549-55.
23. Santschi, EM.; Papich, MG. Pharmacokinetics of gentamicin in mares in late pregnancy and early lactation. *J Vet Pharmacol Ther.* 2000; 23: 359,63.
24. Schwartz, G. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics,* 1978; 6:461-64.
25. Tan, X.; Jiang, Y.; Huang, Y.; Hu, S. Persistence of gentamicin residues in milk after the intramammary treatment of lactating cows for mastitis. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009; 10: 280-4.

26. Waxman, S.; San Andrés, M.D.; Gonzalez, F.; San Andrés, M.I.; De Lucas, J.J.; Rodríguez, C. Age-related changes in the pharmacokinetics of marbofloxacin after intravenous administration in goats. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004; 27: 31-5
27. Yamhoka, K.; Nakagawa, T.; Uno, T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equation. *J Pharmacokinetic Biopharm.* 1978; 6: 165-75.

Utilización de potenciales evocados visuales para el diagnóstico y evolución de *Miastenia gravis* adquirida en caninos

Use of visual evoked potentials for the diagnosis and evolution of acquired *Myasthenia gravis* in canines

SURANITI, AP^{1,2}; LÓPEZ, CM^{1,3}; GILARDONI, LR^{1,4,5}; BERTTOTTI, A⁶; MUNDO, SL^{1,5}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. ²Hospital Escuela de Medicina Veterinaria, Unidad de Neurología. ³Cátedra de Salud Pública. ⁴Cátedra de Semiología. ⁵Cátedra de Inmunología. ⁶Hospital Alemán, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

La miastenia gravis adquirida (MGA) es una enfermedad inmunomediada que afecta a la especie canina, causada por la presencia de anticuerpos contra los colinorreceptores nicotínicos postsinápticos y la consiguiente interferencia en la transmisión neuromuscular de los músculos voluntarios. Seis caninos con alteraciones oculares y signología clínica compatible con MGA provenientes del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires fueron diagnosticados por la presencia de anticuerpos anti receptor de acetilcolina en suero (ACRA). Estos animales mostraron déficits visuales, con ondas P100 de valores de amplitud disminuidas en los potenciales evocados (PEV). Se los trató con Bromuro de piridostigmina 0,5 mg/kg vía oral cada 12 h, durante 30 días y luego de este período, se re-evaluaron. Los PEV obtenidos luego del tratamiento mostraron que el 80% (5/6) de los animales incrementaron la amplitud de la onda P100. Los potenciales evocados visuales ofrecen un método no invasivo que permite identificar los efectos centrales de la MGA y su evolución terapéutica.

Palabras clave: (enfermedad neuromuscular), (diagnóstico), (caninos).

Recibido: 22-11-19

Aceptado: 18-06-20

Correspondencia *e-mail*: Adriana Suraniti asuraniti@fvet.uba.ar

ABSTRACT

Acquired myasthenia gravis (MGA) is an immunomediated disease that affects the canine species, caused by the presence of antibodies against postsynaptic nicotinic cholinergic receptors and the consequent interference in the neuromuscular transmission of voluntary muscles. Six canines with ocular alterations and clinical signology compatible with MGA from the Hospital School of the Faculty of Veterinary Sciences of the University of Buenos Aires were diagnosed by the presence of antibodies against serum acetylcholine receptor (ACRA). These animals showed visual deficits, with P100 waves of diminished amplitude values in evoked potentials (VEP). They were treated with 0.5 mg / kg pyridostigmine bromide orally every 12 h, for 30 days and after this period, they were re-evaluated. The VEP obtained after treatment showed that 80% (5/6) of the animals increased the amplitude of the P100 wave. Visual evoked potentials offer a non-invasive method that identifies the central effects of AMS and its therapeutic evolution.

Keywords: (neuromuscular disease), (diagnosis), (canine).

INTRODUCCIÓN

La MGA es una enfermedad inmunomediada descrita en humanos⁸, en caninos y felinos^{2,7,15,17}. La forma generalizada de MG tiene como signo clínico principal la debilidad episódica que empeora con el ejercicio y mejora con el reposo. La forma focalizada se manifiesta principalmente con debilidad de la musculatura facial, extrínseca ocular, disfagia, megaesófago y cambio de voz¹.

En medicina humana se describe una MG ocular con alteración de la motilidad de los músculos extra-oculares (estrabismo y ptosis palpebral) y alteraciones visuales, diplopía^{19,20}; en medicina veterinaria es escasa la información al respecto.

Los potenciales evocados son una prueba clínica objetiva que permite evaluar las alteraciones visuales en la población humana con MG a través de un estímulo luminoso³ permitiendo evaluar la agudeza visual¹⁶.

La acción anticolinesterásica del Bromuro de piridostigmina permite que la acetilcolina permanezca mayor tiempo en el espacio neuromuscular, mejorando la contracción muscular en forma generalizada, en pacientes humanos^{3,5} y caninos^{3,17} con MG.

El objetivo del presente estudio fue aplicar la técnica de potenciales evocados visuales en caninos con MGA para identificar alteraciones visuales y su evolución post-tratamiento con Bromuro de piridostigmina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron 6 caninos que requirieron atención en el Hospital escuela FCV-UBA con signos oculares compatibles con MG. Los animales se sometieron a un examen objetivo general y particular e identificación de anticuerpos anti receptor de acetilcolina (ACRA). El valor de referencia de ACRA en caninos refiere que valores mayores a 0,6 nmol/L, es confirmatorio de la enfermedad.^{9,10,11,12,13}

Los propietarios/dueños de los animales que manifestaban alteraciones oftalmológicas fueron informados de la investigación (aprobación CICUAL 2015/22) e invitados a participar voluntariamente. Los 6 animales presentaron signos de ojo seco debido al déficit en el cierre palpebral (DCP) durante el sueño y uno de ellos presentó nistagmo espontáneo. La reseña, los signos visuales los valores de ACRA de los animales se muestran en la Tabla 1.

La evaluación de los potenciales evocados visuales (PEV) se realizó al iniciar el tratamiento.

El tratamiento se realizó con Bromuro de piridostigmina vía oral a dosis de 0,5 mg por kg cada 12 h durante 30 días. A los 30 días se evaluó la evolución de los pacientes a través de los signos clínicos y de los PEV. Se consideró como respuesta favorable la mejora de los signos clínicos (cierre completo de los párpados durante el sueño) y si los valores de PEV poseían una amplitud superior a 5,8 μ v/división y la latencia de la onda P era hasta 100 ms.

Tabla 1. Signos visuales y valores de ACRA al momento de la consulta. Hospital Escuela. FCV. UBA 2016-2017.

PACIENTE	EDAD (AÑOS)	RAZA	SEXO	SIGNOS VISUALES	VALORES ACRA (NMOL/L)
3	11	PINCHER	MACHO	DCP-NISTAGMO HORIZONTAL	0,67
7	11	MESTIZO	HEMBRA	DCP	1,22
8	12	POINTER	HEMBRA	DCP	0,79
12	8	LABRADOR RETRIEVER	MACHO	DCP	0,99
16	11	DOBERMAN	MACHO	DCP	0,89
20	8	GRAN DANES	MACHO	DCP	2,20

DCP: déficit cierre palpebral

Determinación de anticuerpo anti receptor de acetilcolina (ACRA): se realizó mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA), realizado por el Laboratorio del CADIMI (Centro de Asistencia, Docencia, Investigación en Miastenia Gravis, Argentina)^{13,14}.

El suero de cada uno de los caninos estudiados fue analizado utilizando Acetylcholine Receptor Autoantibody (AChRab) RIA Kit - RSR Limited United Kingdom, según las instrucciones del fabricante reemplazando el anticuerpo primario por una anti-IgG-canina total (Sigma®).

Medición de los potenciales evocados visuales: se utilizó un equipo ATI Nautilus de la Unidad de Neurología del Hospital Escuela de Medicina Veterinaria. La técnica de registro PEV se realizó insertando tres electrodos: uno en la línea media de la cabeza; el electrodo positivo a nivel de la cresta nuchal; el electrodo negativo en la región central y en la frente el electrodo tierra. Los parámetros utilizados fueron⁶: Tiempo de Análisis (ms): 400; Fuerza del disparo (Hz):2; Promediaciones: 100; Número de canales: 1; Rechazo de artefacto: si; Marcas: P100; Frecuencia inferior: 1; Frecuencia superior: 125. Como estímulo lumínico se utilizó un flash colocado a 15 cm de cada ojo a es-

tímular y el ojo no evaluado se tapó con una torunda de algodón. La medición se repitió 2 veces en cada ojo. La sensibilidad se midió en microvoltios (μV) y el registro se observó sobre un cuadrante cuyas divisiones corresponden a 5,8 μV /división. En condiciones normales el valor de amplitud de las ondas P100 es de 5,8 microvoltios (μV). La latencia de la onda P100 se evaluó en milisegundos, considerando normal hasta 100 ms.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el programa InfoStat (2016). Se empleó la prueba T para muestras apareadas, considerándose diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados de los PEV de los animales pre y post tratamiento se muestran en la Tabla 2.

Las latencias de las ondas P100 (antes y después del tratamiento) se mantuvieron dentro de los valores de referencia (hasta 120 ms). Se detectó una disminución estadísticamente significativa del periodo de latencia de P100 al comparar los datos obtenidos para cada animal antes y después del tratamiento ($p=0,02$).

En la Tabla 3 se muestran los valores de amplitud de cada paciente. En 5 de 6 pacientes los PEV mostraron una disminución significativa de entre el 30 al 40 % de la amplitud de la onda P100 (menor a $5,8\mu\text{V}$) que se normalizó en todos ellos a los 30 días del inicio del tratamiento (Figura 1). Todos respondieron en forma favorable al tratamiento para la MG con cierre palpebral normal.

La amplitud de la onda P100 antes del tratamiento en los pacientes estudiados fue en promedio 4,45. La amplitud de la onda P100 después del tratamiento en los pacientes estudiados fue en promedio 7,77.

El análisis estadístico utilizando la prueba T para diferencias apareadas mostró diferencias

significativas $p \leq 0,05$ en la amplitud de la onda P100 antes y después del tratamiento.

DISCUSIÓN

La MG en caninos resulta una patología difícil de diagnosticar. La sintomatología es variada y afecta a múltiples órganos. Trabajos previos de nuestro grupo caracterizan y confirman su existencia en la especie canina¹⁸. La presencia de alteraciones oculares se describe en los seres humanos enfermos^{11,12}. En veterinaria los reportes sobre afecciones oculares relacionados con la MGA son escasos, así como la aplicación de la técnica de los PEV para caracterizarlas.

Nuestro estudio de aplicación de PEV permitió identificar alteraciones en la transmisión

Tabla 2. Latencias de la onda P100 (PEV) en caninos antes y después del tratamiento con Bromuro de piridostigmina

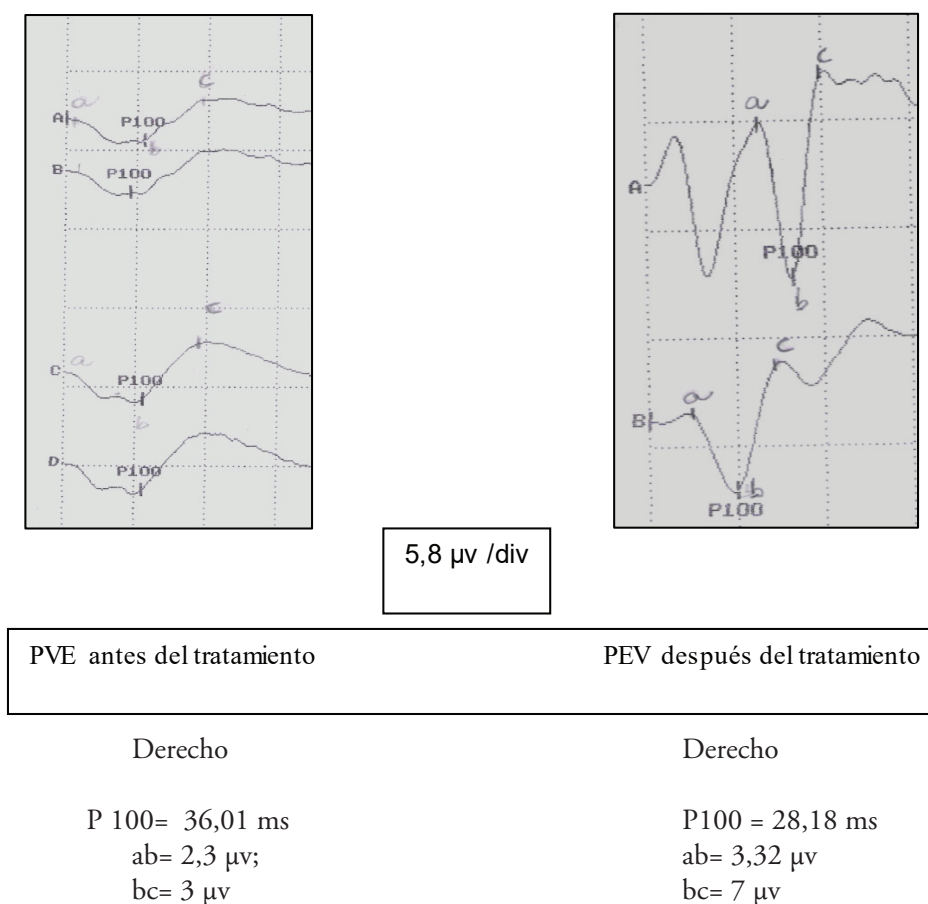
Paciente N°	Antes del tratamiento		Después del tratamiento	
	Ojo Derecho	Ojo Izquierdo	Ojo Derecho	Ojo Izquierdo
3	36,01	43,84	28,18	36,01
7	61,64	51,66	43,84	43,85
8	43,85	36,01	36,01	36,00
12	106,46	73,58	32,82	32,82
16	65,75	39,14	43,84	43,84
20	35,23	36,79	No se realizó	No se realizó

El valor de P100 se expresa en mseg y representa el promedio de las mediciones realizadas (VR hasta 120 con flash). OD: ojo derecho. OI: ojo izquierdo. El paciente N°20 no se repitieron los PEV ya que fueron conservados (normales) en la primera medición en ambos ojos.

Tabla 3. Amplitud de P100 (PEV) en caninos antes y después del tratamiento.

CANINO	OD a-b	OD b-c	OI a-b	OI b-c	OD a-b	OD b-c	OI a-b	OI b-c
3	2,3	3	3,1	4,6	3,32	7	4,99	8,5
7	1,33	2,08	3,02	1,08	4,33	4,7	3,2	4,8
8	2,29	3,7	2,1	4,8	9,2	17,4	8,7	12
12	2,83	2,68	1,77	1,69	4,2	3,1	2,1	1,9
16	8,3	10,8	4,01	5,6	11,2	19,8	11,7	13,3
20	6,2	9,1	10,14	10,49	ND	ND	ND	ND
Prom.	3,88	5,23	4,02	4,71	6,45	10,40	6,14	8,10
Desvío	2,74	3,73	3,10	3,36	3,52	7,66	3,99	4,79

P100 amplitud (VR: superior a $5,8\mu\text{V}$). Valores medidos de pico a pico (a-b y b-c). ND: no determinado.



Trazado de las ondas obtenidas en PEV correspondiente a un paciente representativo de los caninos estudiados. La amplitud de la onda P100 es medida en microvoltios (μv) y las latencias en milisegundos (ms). Cada división vertical corresponde a 5,8 μv . Los PEV del ojo derecho (De) se obtuvieron en los canales a y b; del izquierdo (Iz) en los c y d.

Figura 1. Potenciales evocados visuales (paciente N°3). Hospital Escuela. FCV. UBA 2016-2017

neuromuscular del ojo. El período de latencia se mantuvo dentro de los parámetros normales, sin embargo, este período disminuyó significativamente después del tratamiento. Esta observación podría estar relacionada con una mejora visual. Algunos autores atribuyen el aumento del periodo de latencia con un proceso de desmielinización⁴.

En pacientes humanos con MG, Fotiou³ estudió los cambios en el procesamiento psicofisiológico de la visión, y describió las diferencias de la onda P100 antes y después del

tratamiento con Bromuro de piridostigmina, señalando que los resultados podrían ofrecer evidencia neurofisiológica de la transmisión colinérgica alterada en el sistema central. Nuestros resultados muestran que la amplitud de la onda P100 estaba disminuida en la mayoría de los pacientes y que se incrementó y normalizó luego del tratamiento. Esto indicaría la efectividad del tratamiento realizado dado que podría mejorar la transmisión del impulso nervioso en algunos pacientes⁴.

CONCLUSIONES

Lo hallado sugiere que los PEV ofrecen un método no invasivo para identificar los efectos centrales y la evolución terapéutica de la MG en caninos. Según reportes en medicina humana, la razón de esa alteración causada por la Miastenia Gravis aguda puede ser atribuida a una disfunción de receptores de acetilcolina en el SNC. Serán necesarias futuras investigaciones en Medicina veterinaria para poder confirmar si las variaciones en caninos son semejantes a las mencionadas en los seres humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- Berrh-Aknin S, Frenkian-Cuvelier M, Eymard B. Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gravis. *J Autoimmun* 2014;48-49:(143-148)
- Bexfield NH1, Watson PJ, Herrtage ME. Management of myasthenia gravis using cyclosporine in 2 dogs. *J Vet Intern Med.* 2006 Nov-Dec;20(6):1487-90.
- Fotiou,F; Fountoulakis,K. Evidence for a central cholinergic deficit in Myasthenia gravis. *J neuropsychiatry Clin Neurosci* 2000.(12:4)514-515
- Keesey John C. Does myasthenia gravis affect the brain? *Review article Journal of the Neurological Sciences* 170 .1999 (77-89)
- Lennon VA, Lambert EH, Palmer AC, Cunningham J, Christie TR. Acquired and congenital myasthenia gravis in dogs: a study of 20 cases. In: Satoyoshi E, editor. *Myasthenia gravis: pathogenesis and treatment.* Tokyo: University of Tokyo Press; 1981. p. 51-4
- Nakayama, N., Arakawa, K. and Tarumoto, Y.. Visual function test in beagle with electro-physiological methods (ERG and VEP)—second report—. *Anim. Eye Res.* 1996 15: 148-154
- Richardson D. Acquired myasthenia gravis in a poodle. *Can Vet J.* 2011;52,2:(169-172)
- Silvestri NG, Wolfe GI. Myasthenia gravis. *Semin Neurol.* 2012; 32 (215-226)
- Shelton GD, Schule A, Kass PH. Risk factors for acquired myasthenia gravis in dogs: 1154 cases (1991-1995). *J Am Vet Med Assoc* 1997;211:1428-31
- Shelton GD, Willard MD, Cardinet IIIGH, Lindstrom J. Acquired myasthenia gravis. Selective involvement of esophageal, pharyngeal, and facial muscles. *J Vet Intern Med* 1990;4:281-4
- Shelton GD, Cardinet IIICH, Lindstrom JM. Canine and human myasthenia gravis autoantibodies recognize similar regions on the acetylcholine receptor. *Neurology* 1998;38:1417-23
- Shelton GD, Lindstrom JM. Spontaneous remission in canine myasthenia gravis: implications for assessing human MG therapies. *Neurology* 2001;57:2139-41
- Shelton GD: Canine seronegative acquired myasthenia gravis. *Proc 7th ACVIM Forum*1989.(999-1002)
- Shelton GD.Acquired Myasthenia gravis. *Journal Of Veterinary Internal Medicine.* November/December 1990. (281-284)
- Shelton D Myasthenia gravis and congenital myasthenic syndromes in dogs and cats:A history and mini-review *Neuromuscular Disorders* 26 (2016) 331-334
- Sims, MH.; Laratta, LJ. Visual Evoked Potentials in Cats using a light emitting diode stimulator. *Am J Res.* 1988. 49.(1876).
- Suraniti A. Caninos con síntomas de miastenia gravis: diagnóstico, terapéutica y evolución *Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.* 2015
- Surianiti A; Montoro,A; Gilardoni,L; Lopez,CM; Mieroski,A; Mundo,S. Perros con miastenia gravis adquirida e hipotiroidismo.*Universidad de Zulia.* Venezuela. Revista Electrónica: Depósito Legal: / ISSN electrónico: 2477- 944X. ISSN 0798-2259. Marzo-abril 2018 (pág. 136-138)
- Tsivgoulis G, Dervenoulas G, Kokotis P, et al. Double seronegative myasthenia gravis with low density lipoprotein-4 (LRP4) antibodies presenting with isolated ocular symptoms. *J Neurol Sci* 2014;346;1-2:(328-330)
- Townsel,C;Keller, M ; Johnson,K ; Hussain,N Winston C Seronegative Maternal Ocular Myasthenia Gravis and Delayed Transient Neonatal Myasthenia Gravis *Am J Perinatol Rep* 2016;6:(133-136)

Polimorfismos en el extremo 5' del gen WDTC1 y su asociación con el espesor de grasa dorsal en cerdos Landrace

Polymorphisms in the 5' end of WDTC1 gene and its association with backfat thickness in Landrace pigs

FASSA, MB¹; SCHOR, A²; LLOVERAS, MR³; MARRUBE, G¹

¹Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Genética. ²Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. Cátedra Bovinos de Carnes. ³E. E. A. Pergamino. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

RESUMEN

El gen WDTC1 (WD tetratricopeptido 1) tiene una función anti-adipogénica, convirtiéndose de esta manera en un gen candidato para explicar la variación fenotípica en caracteres de importancia económica de la producción porcina. El objetivo de este trabajo fue identificar polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) en la región 5' no traducida (UTR) del gen WDTC1 y evaluar su asociación con el espesor de grasa dorsal (EGD) en 128 cerdos de raza Landrace. Para la búsqueda de los SNPs se amplificaron y secuenciaron 808 pares de bases (pb) (posición 84.466.928 a 84.467.736 de la secuencia NC010448.4 del GenBank) en 48 cerdos, hallándose siete nuevos SNPs. Los polimorfismos hallados fueron: (i) SNP1 (T/C, posición 84.466.982); (ii) SNP2 (C/T, posición 84.467.066); (iii) SNP3 (T/C posición 84.467.131); (iv) SNP4 (C/T, posición 84.467.201); (v) SNP5 (G/T, posición 84.467.368); (vi) SNP6 (C/A, posición 84.467.402); y (vii) SNP7 (G/A, posición 84.467.413). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA solamente para el SNP1. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en 128 cerdos, entre genotipos del SNP1 y EGD. Los resultados obtenidos sugieren que la región 5'UTR de WDTC1 es polimórfica y el SNP1 estaría asociado con la expresión fenotípica del carácter.

Palabras clave: (porcinos), (espesor de grasa dorsal), (gen WDTC1)

Recibido: 11-12-19

Aceptado: 29-06-20

Correspondencia *e-mail*: Valeria Fassa vfassa@fvvet.uba.ar

SUMMARY

The WDTC1 (WD and tetratricopeptide repeats 1) gene has an anti-adipogenic function, converting it into a candidate gene to explain the phenotypic variation in traits of economic importance for swine breeding. The objective of this work was to identify and evaluate the effect of single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the 5'UTR region of WDTC1 and its association with backfat thickness (BFT) in 128 Landrace pigs. For the identification of SNPs, 808 bp (from 84,466,928 to 84,467,736 of sequence NC010448.4 of GenBank) were amplified, sequenced and analyzed by multiple alignments. The polymorphisms found were: SNP1 (T / C, 84.466.982), SNP2 (C / T, 84.467.066), SNP3 (T / C 84.467.131), SNP4 (C / T, 84.467.201), SNP5 (G / T, 84.467.368), SNP6 (C / A, 84.467.402) and SNP7 (G / A, 84.467.413). Statistical analysis was performed using ANOVA only for the SNP1. The differences were significant among genotypes of SNP 1 (p-value <0.05) for (BFT). These results indicate that the 5' UTR region of WDTC1 is polymorph and the SNP1 would be associated with the phenotypic expression of the character analyzed.

Keywords: (porcine), (backfat thickness), (WDTC1 gene)

INTRODUCCIÓN

La reducción en la deposición de grasa ha sido uno de los objetivos en el mejoramiento genético porcino. La grasa corporal se encuentra distribuida en diferentes depósitos en el animal, representando la grasa subcutánea el 60 a 70% de la misma. Por su importancia debido a que es el mayor depósito de grasa del organismo y el más sencillo de medir en el animal vivo, ha sido uno de los caracteres más utilizados en los planes de selección.

Las experiencias de mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTL) en familias de referencia (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>) y los estudios de asociación de genoma completo (GWAS)^{2,5,7,10,11,12,15} han identificado regiones cromosómicas y polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) asociados a diferentes caracteres de importancia económica que pueden ser incorporados en esquemas de selección asistida por genotipos. En el cromosoma 6 porcino (SSC6) se han hallado numerosas evidencias en relación al contenido de magro^{3, 5, 7, 8}. Debido a su función anti-adipogénica y su posición en 6q21-26, determinado por un panel de células híbridas¹⁶ el gen WDTC1 (WD tetratricopeptide 1) se considera como un gen candidato para explicar los QTL y SNPs hallados en este cromosoma asociados con efecto sobre al carácter EGD.

El gen WDTC1 codifica para la proteína homónima altamente conservada desde *Drosophila melanogaster* hasta humanos¹³. Las proteínas WD40 entre las que se encuentra WDTC1 tienen varias funciones e interactúan como cofactores para regular la transcripción génica. WDTC1 funciona como un nexo en el complejo proteico que participa en el metabolismo adiposo, se encuentra tanto en el citosol como en el núcleo celular. Es en el núcleo donde ejerce su función anti-adipogénica formando un complejo entre las histonas H2A, H4 y la desacetilasa de histona HDAC3, inhibiendo la actividad transcripcional de PPARγ principal gen responsable de la diferenciación de células precursoras en adipocitos¹³. Groh *et al.*⁶ demostraron que WDTC1 es un componente de la ligasa E3 DDB1-CUL4-ROC1 (CRL4), a través de modelos de adipogénesis en cultivo de células 3T3-L1, comprobaron que la falta de interacción entre WDTC1 y DDB1 conduce a una pérdida de supresión adipogénica por WDTC1, aumento de la acumulación de triglicéridos y expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico. Estos autores concluyeron que el complejo CRL4-WDTC1 promueve la mono-ubiquitinación de la histona H2AK119, lo que sugiere el rol de este complejo en la represión transcripcional durante la adipogénesis.

En porcinos se caracterizó la región 5' UTR del gen WDTC1 y se describieron diferentes secuencias de elementos reguladores en la misma¹⁴. Los SNPs dentro de los elementos reguladores pueden modificar la expresión génica al alterar los sitios de unión de los factores de transcripción.

Debido a que el gen RYR1 (receptor de ryanodina 1) se localiza en el mismo cromosoma presentando un efecto confirmado en la expresión fenotípica del espesor de grasa dorsal, y para no confundir los efectos entre ambos genes, todos los animales que participaron de la experiencia fueron genotipados para el polimorfismo c.1843 C>T de RYR1.

El objetivo de este trabajo fue identificar polimorfismos en la región 5' UTR de WDTC1 y evaluar su asociación en relación con EGD en cerdos de raza Landrace.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 58 capones y 70 cachorras provenientes de camadas obtenidas a partir de apareamientos dirigidos entre cerdas Landrace y dos padrillos de la misma raza, provistos por el núcleo genético Ceres. El ensayo fue realizado en la EEA Pergamino de INTA en la provincia de Buenos Aires. Todas las cerdas fueron servidas dentro de la misma semana en agosto de 2011. Los nacimientos tuvieron lugar en diciembre del mismo año y los lechones fueron destetados a los 28 días de vida en enero de 2012. Todos los animales fueron criados en iguales condiciones y alimentados con una ración comercial hasta las 8 semanas de edad (25 kg de PV).

Los cerdos fueron alojados en boxes individuales con bebederos tipo chupete y comederos secos de una boca, en los que se ofreció comida fresca a voluntad. La alimentación se llevó a cabo en dos fases: (i) crecimiento, de 30 a 60 kg de PV y (ii) terminación, de 60 a 110 kg de PV con raciones estándares de maíz, soja y concentrados comerciales. Las mismas fueron formuladas para cubrir los requerimientos nutricionales de los cerdos en función del período de

desarrollo: 3300 Kcal de energía metabolizable (EM)/kg, 18% de proteína, 1,05% de lisina, 0,78% de calcio y 0,32% de fósforo en la fase de crecimiento y 3200 kcal de EM/kg, 16,5% de proteína, 1 % de lisina, 0,75% de calcio y 0,3% de fósforo en la fase de terminación.

Una vez alcanzados los 90 kg de PV, se procedió a la toma del EGD con un equipo ultrasonido Lean Meater Renco, definiéndose dos variables: (i) P2, es decir, a la altura de la primera vértebra lumbar desplazada 5 cm de la línea media, y (ii) EG3, que corresponde al promedio de 3 mediciones realizadas a la altura del codo, la última costilla y el glúteo medio, también desplazadas a 5 cm de la línea media.

Extracción de ADN

De cada animal se extrajeron 5 ml de sangre periférica de la vena yugular, con anticoagulante EDTA. La extracción de ADN se realizó mediante el kit comercial Easy-DNA™ gDNA Purification Kit (Inbio-Highway, Tandil, Argentina) a partir de 200 µl de sangre entera. El control de calidad se realizó en geles de agarosa al 0,8% teñidos con Gel Red™ Nucleid Acid Gel Stain (Biotium, USA) y visualizados en Geldoc-it Imaging System UVP. La cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante el equipo Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA), midiendo absorbancia a 260 nm.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificaron 808 pb comprendidas entre las posiciones 84.466.928 y 84.467.736 de la secuencia NC_010448.4 del GenBank. El diseño de los cebadores para la reacción se realizó por medio del programa Primer3: forward 5'GCTGGAAGTGCCTCTTCTTT 3' y reverse 5'AGATAAACAGAGGAGGAGGAGG 3'.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un equipo Techne TC 412 (Barloworld Scientific, UK). Para cada reacción a 70 ng de ADN se agregaron 5 µl de Buffer 5X, 0.4 M de cada cebador, 5U de MyTaq DNA Polymerase™ (Bio-

line, USA) y agua en cantidad suficiente para un volumen final de 25 µl. El ciclado fue de: 95 °C 1 min, 35 ciclos de 95 °C 15 seg, 58 °C de annealing 15 seg, 10 seg a 72 °C de extensión y una extensión final de 4 min a 72 °C.

Secuenciación del producto de PCR

Para la purificación del producto de PCR se utilizó Wizard® SV Gel and PCR clean-Up system (Promega, USA). La secuenciación se realizó con el equipo ABI3130XL (INTA Unidad de Genómica y Biotecnología). Para la reacción de secuenciación se utilizaron los mismos cebadores que para la reacción de PCR. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante un alineamiento múltiple (Clustalw) mediante el programa BioEdit v7.0.9 utilizando la secuencia de referencia NC_010448.4 (GenBank).

Determinación de genotipos

1. *SNP c.1843 C>T del gen RYR1* Los genotipos del SNP c.1843 C>T del gen RYR1 se determinaron por PCR-HRM (Polymerase Chain Reaction-High Resolution Melting). Cada reacción contuvo 10 µl de MeltDoctor® HRM Master Mix (Applied Biosystems®, USA), 5 µM de cada oligonucleótido (Forward: 5'GTGCTGGATGTCCTGTGTTCCCT 3' y Reverse: 5'CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG 3') y 30 ng de ADN en 20 µl de volumen final. Se realizó el ciclado en un equipo StepOne Real Time PCR (Applied Biosystem®, USA) con 40 ciclos de 95 °C 15 seg, 60 °C 1 min, seguido de una curva continua de fusión con incrementos de 0.3 °C desde 65 °C a 95 °C. Las salidas fueron analizadas con el software High Resolution Melting V3.1 (Applied Biosystems®, USA).

2. *SNP1 del gen WDTC1*. Se determinaron genotipos para el SNP1 mediante la técnica de PCR-RFLP. Se utilizó el programa dCAPS-Finder 2.0 para diseñar primers modificados con un sitio de corte para la endonucleasa de restricción XhoI: Forward 5'GAACAGCAGTAACTCCACCACT 3' y Reverse 5'TACACCGGGTGGCCTGGA 3' para amplificar un producto de 102 pares de bases (pb). Los ge-

notipos se visualizaron por medio de geles de poliacrilamida al 14% teñidos con Gel Red™ Nucleid Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, USA), presentando el genotipo TT una banda de 102 pb, el genotipo CT bandas de 102, 84 y 18 pb y el genotipo CC bandas de 84 y 18 pb.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados por ANOVA con el paquete estadístico InfoStat⁴ de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \beta_k + e_{ijkl}$$

dónde:

Y_{ijkl} : representa la variable respuesta (valor fenotípico)

μ : media general

α_i : efecto del *i*ésimo SNP1 del gen WDTC1

γ_j : efecto del *j*ésimo SNP c.1843C>T del gen RYR1

β_k : efecto del *k*ésimo sexo

e_{ijkl} : es el error experimental

El contraste de medias se realizó mediante test de Tukey ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

A partir de la comparación de las secuencias obtenidas de 48 animales se detectaron 7 polimorfismos del tipo SNPs en la región 5'UTR del gen WDTC1, según Tabla 1. Las frecuencias alélicas y genotípicas para cada polimorfismo se indican en la Tabla 2. La frecuencia genotípicas halladas para el SNP C/T del gen RYR1 fueron: CC 0.95 y CT 0.05.

Debido a que se hallaron los tres genotipos presentes en la muestra en estudio para el SNP1 (Tabla 1) y además dicho SNP modifica un potencial sitio de unión al factor de transcripción STAT, el cual está involucrado en el proceso de adipogénesis, se decidió incrementar el número de animales a genotipificar para este polimorfismo y realizar un análisis de asociación con los rasgos de interés. La frecuencia genotípica para los 128 animales analizados para el SNP1 fue: 0,13 (CC); 0,46 (CT) y 0,41 (TT).

Tabla 1. Polimorfismos identificados, sus posiciones en la secuencia de referencia (GenBank) y los potenciales factores de transcripción asociados

	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP7
Posición en NC_010448.4	84.466.982	84.467.066	84.467.131	84.467.201	84.467.368	84.467.402	84.467.413
SNP	T>C	T>C	T>C	T>C	T>G	C>A	G>A
Factor de transcripción ¹	STAT		KLF15	CREB	NF-kB		

¹Potencial sitio de unión para los factores de transcripción: STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), KLF (Kruppel Like Factor 15), CREB (cAMP-Responsive Element Binding protein) y NF-kB (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).

Tabla 2. Frecuencias alélicas y genotípicas para los SNPs hallados en la región 5'UTR del gen WDTC1

SNP	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas	
SNP1	CC	CT	TT	C	T
	0,024	0,452	0,524	0,754	0,254
SNP2	CC	CT	TT	C	T
	0,810	0,190	0,000	0,905	0,095
SNP3	TT	TC	CC	T	C
	0,810	0,190	0,000	0,905	0,095
SNP4	CC	CT	TT	C	T
	0,810	0,190	0,000	0,905	0,095
SNP5	GG	GT	TT	G	T
	0,714	0,286	0,000	0,857	0,143
SNP6	CC	CA	CC	C	A
	0,810	0,190	0,000	0,905	0,095
SNP7	AA	AG	GG	A	G
	0,024	0,048	0,928	0,048	0,952

Los resultados del análisis de asociación entre los diferentes genotipos para el SNP1, el SNP C/T del gen RYR 1, sexo y los caracteres productivos se presentan en la Tabla 3. Se encontraron diferencias significativas entre genotipos del SNP1 (p -valor $<0,05$) para los caracteres P2 y EG3. Se hallaron también diferencias entre medias para ambos caracteres, estando el menor espesor de grasa asociado al genotipo CC. No se hallaron diferencias significativas para genotipos del SNP c.1843 del gen RYR1 ($p>0,05$) y si como, era de esperar para sexo ($p<0,05$).

DISCUSIÓN

El proceso de adipogénesis es complejo e involucra una cascada de eventos con la actividad de numerosos genes que controlan la determinación y desarrollo del tejido adiposo. El cromosoma 6 porcino se caracteriza por la presencia de numerosos genes relacionados con este proceso, e.g. RYR1, FTO, FABP3, LEP, LEPR y LEPROT entre otros.

El rol del gen WDTC1 en el proceso de adipogénesis ha sido estudiado en diferentes especies^{6, 13}. En porcinos, Wu *et al.*¹⁴, identificaron secuencias para factores de transcripción asociados a la diferenciación del tejido lipídico

en la región 5' UTR de WDTC1. Entre estos factores encontramos aquellos que tienen un rol positivo como reguladores de la adipogénesis (KLF 4, 5, 6, 9 y 15) en especial por la activación de los genes PPAR γ , C/EBP α y β . Otros factores presentan un efecto negativo como KLF 2, 3 y 7 por la inhibición de la transcripción de PPAR γ , FASN, C/EBP α ⁹. STAT corresponde a una familia de factores de transcripción que involucra a STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B y 6, los cuales en respuesta a la estimulación de varios receptores son fosforilados en sus residuos de tirosina produciendo su translocación al núcleo celular para actuar como factores de transcripción de numerosos genes. En especial STAT 5 tiene un rol destacado en el proceso de adipogénesis ya que modula la expresión de PPAR γ al inducir su expresión y la posterior diferenciación de células mesenquimatosas en adipocitos⁹.

Las diferencias significativas entre genotipos del SNP1 ($p <0,05$) para EGD medida en P2 y EG3 (Tabla 2) pueden ser explicadas debido a que dicho polimorfismo se localiza en la secuencia consenso para el factor de transcripción STAT. Con respecto al SNP de RYR1 cuyo efecto sobre contenido de magro y PSE ha sido confirmado en las diferentes poblaciones

Tabla 3: Medias y desvíos estándar de EGD según genotipos del SNP1.

Variable	Efecto	Medias y desvío estándar para genotipos del SNP1 y sexo			F	P-Valor
		TT	TC	CC		
P2	SNP1	13.04 $\pm$ 0.69 AB	14.16 $\pm$ 0.5 B	12.26 $\pm$ 0.72 A	4.85	0.0094
	SEXO	Capones	Cachorras			
		13.80 $\pm$ 0.52 B	12.25 $\pm$ 0.51 A		13.16	0.0004
EG3	SNP1	TT	TC	CC		
		17.37 $\pm$ 0.72 AB	18.51 $\pm$ 0.51 B	16.98 $\pm$ 0.74 A	5.39	0.0057
	SEXO	capones	cachorras			
		18.47 $\pm$ 0.53 A	16.52 $\pm$ 0.52 B		19.22	0.0001

porcinas, en nuestro estudio esas diferencias no se han detectado debido a la baja frecuencia de los animales heterocigotas y ausencia de los homocigotas para la mutación. Cherel *et al.*³, propusieron que si bien los animales heterocigotas para el SNP de RYR1 podrían contribuir, no explican por sí solos la disminución del EGD. Estos autores señalaron la presencia de otros polimorfismos segregando en forma conjunta con RYR1. De acuerdo a esta hipótesis, y por su posición en el genoma, los SNPs detectados en WDTC1 podrían estar asociados a la evidencia hallada por Fontanesi *et al.*⁵, en SSC6 en los bloques de 65,1-65,4; 70,6-72,5 y 100.7 a 101.8 Mb para EGD en Italian Large White. Estos autores señalaron como gen candidato a FTO pero no lograron confirmar esta asociación. Lee *et al.*⁸ en un estudio con cerdos cruza entre una raza nativa de Corea y Landrace confirmaron la presencia de SNPs en la región comprendida entre 88.750.779 y 103.764.358 pb entre los marcadores SW2098 y SW1881 en SSC6 para el carácter EGD.

En el presente estudio se han detectado polimorfismos en la región no codificante 5' del gen WDTC1 porcino, hallándose asociación del SNP1 con el carácter EGD, medido en P2 y EG3. Es necesaria la validación de este efecto en otras poblaciones porcinas para ampliar nuestro conocimiento sobre la arquitectura genética de dicho rasgo cuantitativo.

CONCLUSIÓN

El extremo 5' UTR del gen WDTC1 es polimórfico, identificándose en dicha región 7 nuevos SNPs al comparar las secuencias obtenidas en 48 cerdos Landrace. El SNP1 (T/C) presentó una asociación positiva con el carácter EGD.

FINANCIAMIENTO

Proyectos: INTA PNPA 1126033 (2013-2019) y UBACyT 2016-2019 20020150100165BA

BIBLIOGRAFÍA

1. Brenig, B. and Brem, G. Genomic organization and analysis of the 5' end of the porcine ryanodine receptor gene (RYR1). *FEBS Lett.* 1992; 298(2,3):277-279.
2. Chen D.; Wu P.; Yang Q., et. al. A genome-wide association study for Backfat thickness to 100 kg and Loin muscle thickness in domestic pigs based on genotyping by sequencing. *Physiol Genomics.* 2019; 51(7): 261-266.
3. Cherel, P.; Pires, J.; Glénisson, J. et al. Joint analysis of quantitative trait loci and mayor effect causative mutations affecting meat quality and carcass composition traits in pigs. *Genetics.* 2011; 12: 76-90.
4. Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzales, L.; Tablada, M.; Robledo, C. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. 2009.
5. Fontanesi, L.; Galimberti, G.; Calò, et al. Identification and association analysis of several hundred single nucleotide polymorphisms within candidate genes for backfat thickness in Italian Large White pigs using a selective genotyping approach. *J. Anim. Sci.* 2012; 90 (8): 2450-2464.
6. Groh, B.S.; Yan, F.; Smith, M.D.; et al. The antiobesity factor WDTC1 suppresses adipogenesis via the CRL4WDTC 1 E3 ligase. *EMBO Rep.* 2016; 17(5): 638-647.
7. Guo, Y.; Qiu, H.; Xiao, S. et al. A genome-wide association study identifies genomic loci associated with backfat thickness, carcass weight, and body weight in two commercial pig populations. *J Appl Genet.* 2017; 58(4):499-508.
8. Lee, K.T.; Byun, M.J.; Kang, K.S.; et al. Single nucleotide polymorphism association study for backfat and intramuscular fat content in the region between SW2098 and SW1881 on pig chromosome 6. *J. Anim. Sci.* 2015; 90: 1081-1087.
9. Mota de Sa, P.; Richard, A.J.; Hang, H.; Stephens, J.M. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Compr Physiol.* 2017; 7(2):635-674.
10. Okumura, N.; Matsumoto, T.; Hayashi, T. et al. Genomic regions affecting backfat thickness and anon bone circumference identified by genome wide association study in a Duroc pig population. *Animal Genetics.* 2012; 44: 454-457.
11. Rothhammer, S.; Kremer, P.V.; Burneau, M. et al. Genome-wide QTL mapping of nine body composition and bone mineral density traits in pigs. *Gen. Select. Evol.* 2014; 46: 68-79.

12. Sanchez, M.P; Tribout, T.; Iannuccelli, N. et al. A genome-wide association study of production traits in a commercial population of Large White pigs: evidence of haplotypes affecting meat quality. *Gen. Select. Evol.* 2014; 46:12-24.
13. Suh, J.M., Zeve, D., McKay, R., et al. Adipose is a conserved dosage-sensitive anti-obesity gene. *Cell Metab.* 2007; 6(3): 195–207.
14. Wu, Y., Long, Q., Feng, B., et al. Molecular cloning and characterization of anti-obesity gene adipose in pig. *Gene.* 2012; 509: 110-119.
15. Yang, Q.; Wu, P.; Wang, K.et al. SNPs associated with body weight and backfat thickness in two pig breeds identified by a genome-wide association study. *Genomics.* 2018; doi: 10.1016/j.ygeno.2018.11.002. [Epub ahead of print]
16. Yerle, M.; Pinton, P.; Robic, A.; et.al Construction of whole genome radiation hybrid panel for high resolution gene mapping in pigs. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1998; 82: 182- 188.

Utilización de un medio con lecitina de soja para congelar semen equino

Use of a medium with soy lecithin for freezing equine semen

CALDEVILLA, M.^{1,2,3}; FERRANTE, A.^{1,2,3}; NEILD, D.^{1,2,3}

¹Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. ²Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA). ³Cátedra de Teriogenología. Buenos Aires. Argentina. .

RESUMEN

La yema de huevo, empleada de rutina en numerosos protocolos de congelamiento de semen, presenta como limitantes ser un compuesto de origen animal y un potencial riesgo de contaminación. Debe ser procesada al momento de su utilización y al poseer gránulos de tamaño similar a los espermatozoides, interfiere con la evaluación del semen. El objetivo de este trabajo fue probar si el medio AndroMed®, a base de lecitina de soja, es efectivo para congelar semen equino. Los eyaculados se diluyeron con: 1) yema de huevo y dimetilformamida; 2) yema de huevo, dimetilformamida y glicerol; 3) AndroMed®; 4) AndroMed® suplementado con dimetilformamida. Se evaluaron los parámetros cinemáticos, la viabilidad y el estado acrosomal de los espermatozoides posdescongelado. La movilidad total y progresiva fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los medios de congelamiento con yema de huevo respecto los dos de AndroMed®. De igual manera los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los medios de congelamiento con yema de huevo respecto los dos de AndroMed®. Como conclusión, en las condiciones experimentales descritas, el diluyente AndroMed® no evidenció ventajas cuantitativas comparado con otro diluyente convencional respecto a la capacidad de congelar semen equino con parámetros mínimos de aceptación *in vitro*.

Palabras clave: (congelamiento), (yema de huevo), (dimetilformamida), (glicerol), (AndroMed®).

Recibido: 21/08/19

Aceptado: 02/07/20

Correspondencia *e-mail*: Mariana Caldevilla marianacaldevilla@gmail.com

ABSTRACT

Egg yolk, used routinely in numerous semen freezing protocols, has the limitation of being a compound of animal origin and thus a potential risk of contamination. It must be processed at the time of its use and as it has granules similar in size to sperm, it interferes with the evaluation of semen. The objective of this study was to evaluate if AndroMed®, a medium based on soybean lecithin, can be used successfully to freeze equine semen. The ejaculates were diluted with: 1) egg yolk and dimethylformamide; 2) egg yolk, dimethylformamide and glycerol; 3) AndroMed®; 4) AndroMed® with dimethylformamide. The kinematic parameters, viability and acrosome status of post-thaw spermatozoa were evaluated. Total and progressive motility were significantly higher ($p < 0.05$) in media with egg yolk when compared to AndroMed®. In addition, media with egg yolk showed significantly higher percentages of live sperm with intact acrosomes than those with AndroMed® ($p < 0.05$). In conclusion, under the described experimental conditions, the AndroMed® diluent did not show any quantitative advantages over a conventional diluent with regard to its ability to freeze equine semen with minimal parameters of *in vitro* acceptability.

Key words: (freezing), (egg yolk), (dimethylformamide), (glycerol), (AndroMed®).

INTRODUCCIÓN

Los diluyentes para congelamiento de semen equino suelen contener medios base que aportan sustrato energético, compuestos tampones (buffers), antibióticos y agentes crioprotectores. La elección adecuada del diluyente es crucial para el éxito de la criopreservación de semen en cualquier especie. La yema de huevo, empleada de rutina en numerosos protocolos de congelamiento de diversas especies, presenta algunas limitantes en su uso. En primer lugar, al ser un compuesto de origen animal, representa un potencial riesgo de contaminación de las dosis inseminantes, pudiendo entonces participar en la transmisión de enfermedades⁵. Es por ello que existen reglamentaciones internacionales que restringen el ingreso de productos que contengan huevo o derivados del mismo, viéndose limitadas las posibilidades de comercialización de semen congelado. Por otro lado, la yema de huevo es poco práctica para usar, ya que debe ser procesada al momento de su utilización y además porque, al tener en su composición gránulos de tamaño similar a los espermatozoides, en muchos casos interfiere con la observación microscópica y con ensayos bioquímicos incluidos en la evaluación del semen⁷. Por último, no es un producto estandarizado ya que depende de factores como la

dieta y el manejo de las gallinas que producen los huevos⁸. La soja contiene lecitina, una fracción de fosfolípidos que podría sustituir a las lipoproteínas de alto peso molecular y los fosfolípidos de la yema de huevo y prevenir el daño de la membrana plasmática del espermatozoide que se produce durante el enfriamiento y la criopreservación⁷. Los diluyentes a base de lecitina de soja se han evaluado para procesar y congelar el semen bovino, como una alternativa aceptable a la yema de huevo tradicional y a los diluyentes a base de leche para la criopreservación de semen de toro⁷. Estudios realizados comprobaron la efectividad del AndroMed®, un medio libre de proteínas de origen animal a base de lecitina de soja, para congelar semen de toros, obteniendo mejores tasas de no-retorno en la inseminación artificial que con semen diluido y congelado en un medio a base de TRIS y yema de huevo¹. Este medio permitió además una adecuada visualización de los diferentes parámetros espermáticos evaluados, no interfiriendo con las tinciones aplicadas a tal fin. Una modificación del AndroMed® fue desarrollado para refrigerar semen equino, el AndroMed-E (Minitüb, Alemania), y su efectividad fue comparado al de otros dos diluyentes de composición proteica definida: el EquiPro y el EquiPro TM³. En ese estudio, el semen fue refrigerado

a 5 °C durante 4 días, observando que la movilidad progresiva, la velocidad y la viabilidad espermáticas disminuyeron notablemente con el AndroMed-E. Hasta el momento solo dos grupos de investigadores^{13,17} han reportado el uso de lecitina de soja, en reemplazo de la yema de huevo en dos diluyentes comerciales para congelar semen equino. No encontraron diferencias en los parámetros evaluados *in vitro* (movilidad total y progresiva y la integridad de membrana) del semen equino pos-descongelado comparando diluyentes con yema de huevo o con lecitina de soja, sin embargo los resultados de fertilidad fueron significativamente menores en ambos trabajos cuando se inseminó con semen criopreservado con lecitina de soja. El objetivo del presente trabajo fue probar si el medio de congelamiento AndroMed®, que es un diluyente comercial para congelar semen bovino a base de lecitina de soja, puede emplearse y es efectivo para congelar semen equino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y evaluación de rutina del semen

El presente estudio cuenta con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (Aprobación N° 2016/3).

El semen se recolectó utilizando una vagina artificial modelo Missouri y un súcubo natural. Los eyaculados se evaluaron macro y microscópicamente previo al procesamiento. Se recolectó semen de 6 padrillos (n=6, r=3), 5 padrillos alojados en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires y 1 padrillo de un establecimiento privado. Todos eran padrillos de fertilidad probada, 3 de raza criolla, 1 Cuarto de milla y 2 Silla Argentino, entre 5 y 15 años de edad, en condiciones de D.S.O. (Daily Sperm Output) al momento de la colecta de semen. La movilidad espermática del semen fresco se evaluó de manera subjetiva por observación directa sobre platina termostatiza-

da (37 °C) y la concentración espermática se evaluó mediante hemocitometría utilizando una cámara de Neubauer. Cada eyaculado se diluyó volumen: volumen en medio a base de leche descremada (diluyente de Kenney: 2,4 gr de leche descremada, 4,9 gr de glucosa, antibiótico 1 gr de ticarcilina, 100 ml agua destilada estéril), se dividió en 4 alícuotas, se centrifugó 15 minutos a 800 g, se aspiró el sobrenadante y el pellet fue rediluido a una concentración de 300 millones de espermatozoides/ml con los siguientes diluyentes: 1) diluyente base (50 % de lactosa al 11 %, 25 % EDTA-glucosa, 0,5 % Equex, 20% de yema de huevo) con 5% de dimetilformamida (DMF); 2) diluyente base con 2,5% de DMF y 2,5% de glicerol; 3) diluyente comercial para semen bovino: AndroMed® (Minitüb, Alemania) que contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, buffers, glicerol, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina) ; 4) diluyente comercial para semen bovino AndroMed® (Minitüb, Alemania) suplementado con 2,5% de DMF. El congelamiento se realizó de acuerdo a un protocolo usado para semen equino en 2001^{6,10,11}. El semen diluido se equilibró 30 minutos a temperatura ambiente (22 a 26 °C), luego se envasó en pajuelas de 0,5 ml. Las pajuelas fueron colocadas en gobeletes plásticos y sumergidos en una mezcla de etanol-acetona 1:1 dentro de un canastillo de bronce. Brevemente, el canastillo fue mantenido dentro del termo de nitrógeno (de 10 litros) a 6 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido, controlando el descenso de la temperatura con un termómetro digital desde temperatura ambiente hasta -15 °C (descenso de 10-12 °C/minuto). Luego se llevó el canastillo hasta el nivel del nitrógeno líquido, hasta alcanzar los -120 °C (descenso de 25 a 40 °C/minuto), se sacaron las pajuelas de la mezcla de etanol-acetona y finalmente se sumergieron en el nitrógeno líquido, a -196 °C. El descongelamiento se realizó en baño térmico a 37 °C durante 1 minuto.

Evaluación de los parámetros cinemáticos

Se evaluaron los parámetros cinemáticos utilizando un sistema computarizado (CASA: Computer Assisted Semen Analysis), el Andro-Vision® (Minitüb, Alemania). En cada muestra se analizaron los valores cinemáticos de al menos 1000 espermatozoides totales y se determinó el porcentaje de espermatozoides móviles totales y el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva. Se analizaron los siguientes parámetros cinemáticos: velocidad curvilínea (VCL: velocidad media de la trayectoria de la cabeza del espermatozoide; expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$), velocidad en línea recta (VSL: velocidad media medida en línea recta entre el primer y último punto de la trayectoria; expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$), velocidad de trayectoria media (VAP: distancia promedio que el espermatozoide ha atravesado durante el período de análisis; expresada en $\mu\text{m}/\text{seg}$), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, amplitud de las oscilaciones de la cabeza del espermatozoide; expresada en μm), frecuencia de bateo espermático (BCF: frecuencia con que la cabeza atraviesa la trayectoria del espermatozoide; expresada en Hertz), índice de oscilación (WOB, expresado en %) rectitud (STR, expresada en %; $\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} \times 100$) y linealidad (LIN, expresada en %; $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$).

Evaluación de viabilidad espermática e integridad acrosomal

Se evaluó la capacitación midiendo la capacidad de los espermatozoides de llevar a cabo la reacción acrosomal. Para evaluar el estado del acrosoma se empleó la tinción con la lectina de la aglutinina del maní marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA)¹⁴ junto con el colorante fluorescente Ioduro de Propidio (PI) para detectar los espermatozoides muertos. Brevemente, las muestras de semen se tiñeron con Ioduro de Propidio y FITC-PNA incubándolos durante 10 minutos a 37 °C. Los patrones de reacción acrosomal se observaron con microscopía de epifluorescencia entre porta y cubreobjetos a 1000x. En espermatozoides

que no han realizado la reacción acrosomal, los acrosomas permanecen sin teñir, mientras que en los espermatozoides reaccionados, la lectina se une selectivamente a la membrana acrosomal externa y los acrosomas se tiñen de verde emitiendo señal fluorescente. El Ioduro de Propidio es un colorante específico de ADN que no puede penetrar si la membrana citoplasmática está intacta, penetrando solamente en las células que han perdido la integridad de la membrana, por lo tanto tiñe el núcleo de los espermatozoides muertos de color rojo.

Análisis estadístico

Para analizar los parámetros cinemáticos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) del índice de oscilación y la rectitud, mientras que, al no demostrar una distribución normal, se realizó un análisis de Friedman para la movilidad total y progresiva, velocidad curvilínea, velocidad en línea recta, velocidad de trayectoria media, frecuencia de bateo espermático, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y la linealidad.

Dentro de los patrones de FITC-PNA/PI, fueron analizados mediante un ANOVA el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado, mientras que el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado y el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto, al no demostrar una distribución normal, fueron analizados utilizando el test de Friedman.

En todos los casos se bloqueó por padrillo. Los datos se expresan en valores medios $\pm$ desvío estándar (DS), y se consideró un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

Parámetros cinemáticos del semen descongelado

En las muestras de semen equino pos-descongelado la movilidad total y progresiva fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en los medios de congelamiento con yema de huevo

respecto los dos de AndroMed® (Figura 1).

Los parámetros cinéticos VCL, VSL, VAP, ALH, BCF fueron significativamente mayores en los dos diluyentes que contenían yema de huevo con respecto al diluyente AndroMed® ($p<0,05$). Sin embargo no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en los parámetros cinéticos de LIN, STR y WOB entre los diferentes diluyentes utilizados (Tabla 1).

El uso del diluyente AndroMed® mejoró sensiblemente la visualización de los espermatozoides en el AndroVision® (sistema CASA utilizado en este estudio), como puede observarse en la Figura 2.

Viabilidad espermática e integridad acrosomal

En las muestras de semen pos-descongelado los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado fueron significativamente mayores ($p<0,05$) en los medios de congelamiento con yema de huevo respecto a los dos de AndroMed®. Mientras

que los porcentajes de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado fueron significativamente mayores ($p<0,05$) en los medios de congelamiento AndroMed® con respecto a los de yema de huevo.

No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma intacto luego de ser congelados-descongelados en los diferentes medios ensayados (Tabla 2).

DISCUSIÓN

Los componentes básicos de los diluyentes para criopreservación de semen equino son los mismos desde hace 35 años, y en la mayoría de los protocolos incluyen yema de huevo, un crioprotector permeable, un azúcar y sustancias detergentes^{7, 9,19}. La yema de huevo y la leche, compuestos de origen animal, se incluyen de forma rutinaria en protocolos de criopreservación para semen de animales domésticos y su función radica en proteger a la célula del shock por frío⁶. Se ha reportado que el daño producido por el congelamiento-descongelamiento

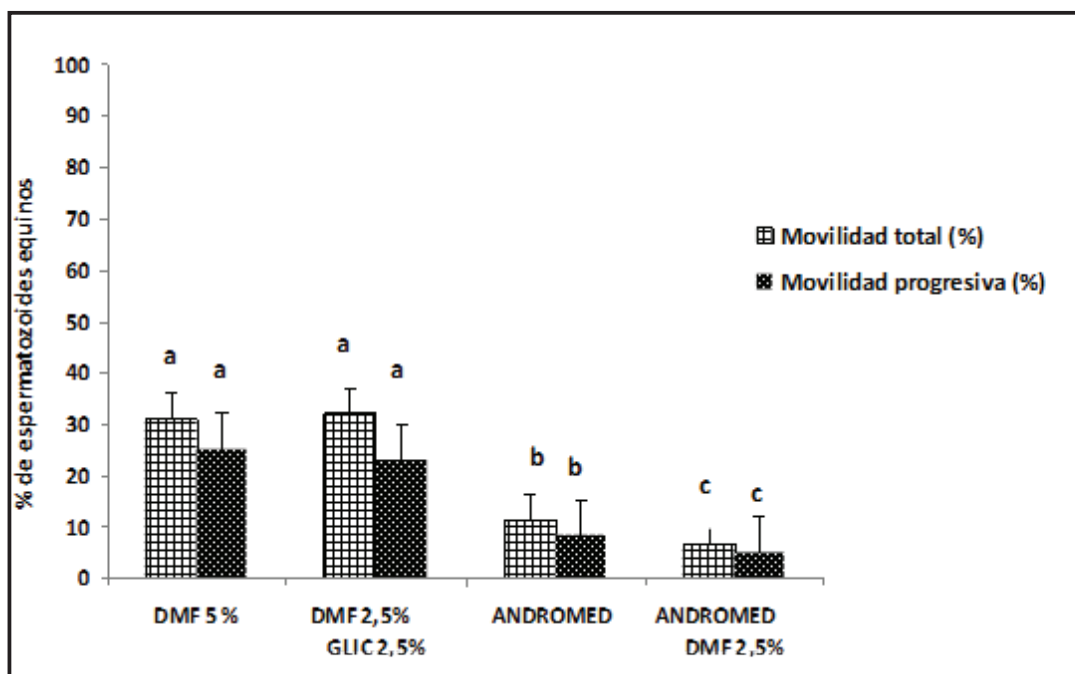


Figura 1. Evaluación de la movilidad total y progresiva de espermatozoides equinos pos-descongelado, utilizando un sistema computarizado de análisis de semen AndroVision® (Minitüb, Alemania).

^{a,b} letras diferentes indican diferencias significativas entre los diluyentes en la movilidad total y progresiva ($p<0,05$).

Tabla 1. Evaluación mediante un sistema computarizado de análisis de semen (CASA; AndroVision®, Minitüb, Alemania) de los parámetros cinemáticos del semen equino pos-descongelado. Los datos son porcentajes promedio $\pm$ DS.

MEDIOS	VCL [$\mu\text{m/s}$]	VSL [$\mu\text{m/s}$]	VAP [$\mu\text{m/s}$]	BCF [Hz]	ALH [μm]	LIN	STR	WOB
Yema-DMF 5 %	36 ± 20^a	11 ± 8^a	16 ± 9^a	$5,4 \pm 5^a$	$0,6 \pm 0,3^a$	$0,32 \pm 0,2^a$	$0,6 \pm 0,2^a$	$0,5 \pm 0,1^a$
Yema-DMF 2,5% -GLIC 2,5%	31 ± 20^a	11 ± 10^a	15 ± 11^a	$4,7 \pm 3,6^a$	$0,5 \pm 0,3^a$	$0,31 \pm 0,1^a$	$0,7 \pm 0,1^a$	$0,5 \pm 0,1^a$
ANDROMED®	17 ± 11^b	8 ± 7^b	10 ± 8^b	$1,5 \pm 1^b$	$0,3 \pm 0,2^b$	$0,4 \pm 0,2^a$	$0,7 \pm 0,2^a$	$0,5 \pm 0,1^a$
ANDROMED®- DMF 2,5%	14 ± 10^b	6 ± 5^b	8 ± 7^b	2 ± 1^b	$0,2 \pm 0,2^b$	$0,5 \pm 0,3^a$	$0,8 \pm 0,2^a$	$0,6 \pm 0,2^a$

^{a,b} letras diferentes indican diferencias significativas entre medios para cada parámetro cinemático ($p < 0,05$).

DMF: dimetilformamida

GLIC: glicerol

ALH amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (μm)

BCF: frecuencia de bateo espermático (Hertz)

LIN: linealidad (%)

STR: rectitud (%)

VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/seg}$)

VSL: velocidad en línea recta ($\mu\text{m/seg}$)

VAP: velocidad de trayectoria media ($\mu\text{m/seg}$),

WOB: índice de oscilación (%)

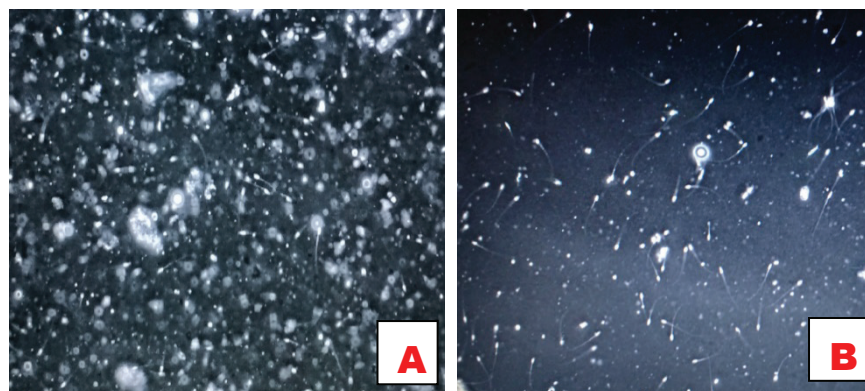


Figura 2. Visualización de los espermatozoides equinos pos-descongelados evaluados con el sistema computarizado de análisis de semen AndroVision® (Minitüb, Alemania). A: es la imagen del CASA con un diluyente que contiene yema de huevo, B: es la imagen del CASA con Andromed®.

Tabla 2. Estado del acrosoma y viabilidad espermática, evaluados con la tinción FITC-PNA/PI, en semen equino congelado-descongelado con diferentes diluyentes. Los datos son porcentajes promedio $\pm$ DS.

MEDIOS	PNA- / PI- (%)	PNA+ / PI- (%)	PNA- / PI+ (%)	PNA+ / PI+ (%)
YEMA 20 %- DMF 5 %	44 $\pm$ 9 ^a	4 $\pm$ 2 ^a	14 $\pm$ 5 ^a	38 $\pm$ 10 ^a
YEMA 20 %-DMF 2,5 % - GLIC 2,5%	37 $\pm$ 8 ^b	4 $\pm$ 2 ^a	16 $\pm$ 7 ^a	43 $\pm$ 8 ^a
ANDROMED®	13 $\pm$ 6 ^c	2 $\pm$ 1 ^b	11 $\pm$ 4 ^a	74 $\pm$ 9 ^b
ANDROMED® - DMF 2,5%	13 $\pm$ 6 ^c	1 $\pm$ 1 ^b	12 $\pm$ 4 ^a	74 $\pm$ 8 ^b

PNA-/PI-: Espermatozoide vivo con acrosoma intacto.

PNA+/PI-: Espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado.

PNA-/PI+: Espermatozoide muerto con acrosoma intacto.

PNA+/PI+: Espermatozoide muerto con acrosoma reaccionado.

^{a,b} letras diferentes indican diferencias significativas entre medios para cada patrón de FITC-PNA/PI ($p < 0,05$).

puede ser disminuido por la adición de las lipoproteínas presentes en la yema de huevo, que actuarían protegiendo al espermatozoide del shock por frío y estabilizando la membrana espermática^{20, 21}. Con el objetivo de establecer una alternativa que reemplace a la yema de huevo se ha demostrado que el plasma de yema de huevo esterilizado tiene el potencial de reemplazar la yema de huevo en el diluyente de congelación de semen equino ya que los parámetros de movilidad no fueron significativamente diferentes entre los diluyentes, aunque la integridad de la membrana se conservó mejor en el semen congelado con yema de huevo. Sin embargo se obtuvieron los mismos resultados en los índices de preñez¹⁵. En un trabajo posterior, estos mismos autores evaluaron la capacidad crioprotectora del agregado de liposomas, compuestos de los fosfolípidos de la yema de huevo, al diluyente para congelar semen equino¹⁶. Si bien encontraron que los liposomas fueron efectivos en proteger a los espermatozoides, los resultados no mejoraron los obtenidos con yema de huevo y concluyeron que aún se requiere optimizar la composición de los liposomas a ser utilizados para reemplazar eficientemente a la yema de huevo. En un estudio reciente se demostró que el reemplazo de la yema de huevo con un

complejo de Hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HPBCD) y colesterol en el diluyente para criopreservar semen mejoró la movilidad total, progresiva y la viabilidad del semen equino pos-descongelado⁴. Otros autores han sugerido que se podría utilizar goma arábiga precalentada como un crioprotector alternativo para la crioconservación de semen equino, ya que mantuvo la movilidad total de los espermatozoides en 46-50%, elevó la movilidad progresiva en 27% y obtuvo los mismos porcentajes de preñez que el control con yema de huevo². Por otro lado para congelar semen equino un grupo de investigadores en Brasil reemplazaron la yema de huevo en el diluyente comercial Botu-Crio® (Botupharma, Brasil) por diferentes concentraciones de lecitina de soja. *In vitro*, ambos diluyentes mostraron porcentajes similares de movilidad total, progresiva y de membranas intactas. Sin embargo, los mejores resultados de fertilidad luego de la inseminación artificial se obtuvieron con el semen congelado con Botu-Crio®¹³. Por lo tanto, aunque los resultados de laboratorio (*in vitro*) fueron similares, se obtuvieron menores tasas de preñez utilizando semen congelado con lecitina de soja. Si contrastamos estos resultados con los del presente estudio con AndroMed®, los pará-

metros seminales *in vitro* no fueron similares ya que la movilidad total y progresiva disminuyeron significativamente en el presente estudio y además aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado cuando se congeló con el diluyente AndroMed® sin yema. Las diferencias entre este estudio y el trabajo citado anteriormente¹³ podrían deberse a las distintas concentraciones de lecitina de soja presentes en el medio de congelamiento, como así también diferencias en los componentes de los diluyentes comerciales AndroMed® y Botu-Crio®. El mismo grupo de investigación evaluó si se produciría una asociación entre los lípidos de la lecitina de soja con los lípidos de la yema de huevo para mejorar la protección de las membranas de los espermatozoides de padrillos “malos congeladores” agregando lecitina de soja al diluyente comercial Botu-Crio¹⁸. Sin embargo, si bien esta modificación no dio diferencias significativas con el control, no proporcionó un aumento en los parámetros cinemáticos ni en la integridad de la membrana espermática evaluados en el semen equino pos-descongelado, y tampoco incrementó la tasa de preñez pos-inseminación artificial¹⁸. En otro estudio¹² se evaluó si se producía un efecto protector sinérgico entre un 2% o un 4% de yema de huevo centrifugada y 1,25% de lecitina de soja, ambos agregados al diluyente comercial INRA para congelamiento profundo del semen del caballo miniatura del Caspio. En este caso evaluaron la movilidad espermática, las anomalías morfológicas y la integridad de membrana, concluyendo que el uso de una concentración del 2% de yema centrifugada en combinación con la lecitina de soja mejoraba significativamente la congelabilidad del semen¹². Sin embargo, estos dos estudios difieren del actual en que el diluyente en ambos casos contenía yema de huevo (ya sea entera o centrifugada) y esa presencia podría explicar los mejores resultados obtenidos por esos autores.

Cuando se realiza el congelamiento profundo, se busca utilizar una curva de enfriamiento óptima que minimice los daños producidos durante el proceso de criopreservación de semen. En ambos trabajos que usaron lecitina de soja

para congelar semen equino^{13, 17}, se implementó una curva lenta de descenso de temperatura, una de ellas durando aproximadamente 40 minutos¹³. Por el contrario, en el presente estudio se utilizó una curva rápida de congelamiento, que ha sido utilizada con éxito en la especie equina y que disminuye los tiempos empleados en el proceso de criopreservación (no más de 7-8 minutos). Esta diferencia en procedimiento quizás haya tenido un impacto en los resultados obtenidos con el AndroMed en semen equino, sobre todo si se toma en cuenta que en los protocolos de congelamiento de semen bovino para el que fue desarrollado, también es utilizado con una curva lenta de descenso de temperatura. Entonces, quizás el protocolo de curva de descenso rápido no sea el adecuado cuando se emplea diluyentes con lecitina de soja.

CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos, podemos afirmar que el diluyente AndroMed® no evidenció ventajas cuantitativas comparado con otros diluyentes convencionales respecto a la capacidad de congelar semen equino con parámetros mínimos de aceptación *in vitro*, bajo las condiciones en las que se ensayó. Sin embargo este medio permitió una adecuada visualización de los diferentes parámetros espermáticos evaluados con el sistema AndroVision®. Sería importante seguir ensayando alternativas de diluyentes sin yema de huevo, siendo que lograr un medio de congelamiento profundo sin proteínas de origen animal impactaría positivamente en el comercio internacional de semen equino, disminuyendo no solo los riesgos sanitarios sino también facilitando la elaboración de los medios y mejorando la evaluación *in vitro* de los parámetros seminales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aires, V.A.; Hinsch, K.D.; Mueller-Schloesser, F.; Bogner, K.; Mueller-Schloesser, S.; Hinsch, E. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 2003; 60(2): 269-279.
2. Ali, M.; Musa, M.; Alfadul, S.; Al-Sobayel, K. Consequences of adding gum Arabic as a cryoprotectant on

- motility and viability of frozen stallion semen. *Cryobiology* 2017; 79: 21-28.
3. Aurich, C.; Seeber, P.; Müller-Schlösser, F. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5°C. *Reproduction Domestic Animals* 2007; 42: 445-448.
 4. Blommaert, D.; Thierry, F.; Donnay, I.; Lejeune, J.; Detilleux, J.; Serthein, D. Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerol concentration into the freezing medium of equine sperm. *Cryobiology* 2016; 72: 27-32.
 5. Bousseau, S.; Brillard, J.P.; Marguant-Le Guienne, B.; Guerin, B.; Camus, A.; Lechat, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 1998; 50: 699-706.
 6. Cristanelli, M.J.; Squires, E.L.; Amann, R.P.; Pickett, B.W. Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology* 1984; 22 (1): 39-45.
 7. Layek, S.S.; Mohanty, T.K.; Kumaresan, A.; Parks, J.E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science* 2016; 172:1-9.
 8. Lima-Verde, I.B.; Johannisson, A.; Ntallaris, T.; Al-Essawe, E.; Al-Kass, Z.; Nongbua1, T.; Dórea, F.; Lundeheim, N.; Kupisiewicz, K.; Edman, A.; Morrell, J.M. Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 2018; 53:127-136.
 9. Malo, C.; Gil, L.; Cano, R.; Martínez, F.; García, A.; Jerez, R. Dimethylformamide is not better than glycerol for cryopreservation of boar semen. *Andrología* 2012; 44: 605-610.
 10. Martin, J.C.; Klug, E.; Gunzel, A. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility* 1979; 27:47-51.
 11. Miragaya M.H.; Chaves M.G.; Neild, D.M.; Berritta, C.; Agüero, A. Artificial insemination using semen cryopreserved with a simple manual method. In: Proc. Third International Symposium on Stallions Reproduction, January 10-12, Fort Collins, Colorado, USA. / *Fertility and Sterility*. 2001; 68: 336-337.
 12. Nouri, H.; Towhidi, A.; Zhandi, M.; Sadeghi, R. The Effects of Centrifuged Egg Yolk Used with INRA Plus Soybean Lecithin Extender on Semen Quality to Freeze Miniature Caspian Horse Semen. *Journal of Equine Veterinary Science* 2013; 33(12): 1050-1053.
 13. Papa, F.; Felício, G.; Melo-Oña, C.; *et al.* Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science* 2011; 129: 73-77.
 14. Petrunkina, A.M.; Gröpper, B.; Töper-Petersen, E.; Günsel Apel, R. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology* 2005; 63: 1390-1406.
 15. Pillet, E.; Duchamp, G.; Batellier, F.; *et al.* Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology* 2011; 75: 105-114.
 16. Pillet, E.; Labbe, C.; Batellier, F.; *et al.* Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 2012; 77: 268-279.
 17. Ricker, J.; Linfor, J.; Delfino, W.; Kysar, P.; Scholtz, E.; Tablin, F.; Crowe, J.; Ball, B.; Meyers, S. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol. Reproduction* 2006; 74, 359-365.
 18. Rocha, A.; Martin, I.; Monteiro, G.; Guasti, P.; Sancier-Silva, Y.; Papa, F. Effect of addition of soybean lecithin to Botu-Crio® on sperm parameters and fertility rates of frozen equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science* 2012; 32: 510-511.
 19. Sieme, H.; Oldenhof, H.; Wolkers, W.F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science* 2016; 169: 2-5.
 20. Watson, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility* 1981; 62: 483-492.
 21. Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 2000; 60/61: 481-492.

Índice de autores

Albarellos, GA. 5
Ambros, L. 13
Berttoli, A. 21
Caldevilla, M. 35
Castillo, M. 11
Cerutti, DA. 11
Doxandabarat, XD. 5
Esmoris, S. 13
Fassa, MB. 27
Ferrante, A. 35
Gilardoni, LR. 21
Gómez, MB. 11
Kreil, V. 13
Lloveras, MR. 27
López, CM. 21
Marrube, G. 27
Meglia, GE. 11
Mundo, SL. 21
Neild, D. 35
Paes Rodríguez, JD. 5
Schor, A. 27
Suarez Belzoni, F. 13
Suraniti, AP. 21
Vera, V. 13

Instrucciones para los autores

InVet (Investigación Veterinaria) es una revista de publicaciones científicas, cuyo objetivo es difundir trabajos científicos y académicos que abordan las temáticas inherentes a las áreas de conocimiento de las Ciencias Veterinarias; Ciencias Básicas, Producción Animal, Medicina Preventiva, Salud Pública y Bromatología, Salud Animal y Formación General. Esta publicación está orientada a Veterinarios, Médicos, Biólogos, Bioteristas, Zootecnistas, Técnicos en alimentación y todos aquellos profesionales relacionados a la salud y producción animal. InVet publicará artículos originales y comunicaciones breves de autores nacionales y extranjeros que deberán ser presentados según las instrucciones que aquí se explicitan. Los artículos de revisión bibliográfica quedarán a consideración del Comité Científico Editorial en lo que respecta a su pertinencia para la revista y según los requisitos de admisibilidad editorial.

Todos los trabajos recibidos se encuentran sujetos a aceptación y su recepción no implica la obligatoriedad de publicación. Los trabajos serán evaluados por dos árbitros externos a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA. En caso de discrepancia entre las evaluaciones se podrá recurrir a un tercer árbitro. La decisión final será tomada por el Comité Científico Editorial. Todo el proceso de evaluación se desarrolla bajo la modalidad “doble ciego” esto mantendrá bajo anonimato las identidades tanto de los autores como de los evaluadores. Finalizada la tarea de arbitraje, el autor recibirá la comunicación que indica la aceptación o el rechazo del trabajo.

El Editor se reserva el derecho de la revisión editorial.

Los trabajos deben ser inéditos. Se aceptarán para su publicación trabajos que hayan sido motivo de presentaciones en Congresos, Simposios y Jornadas o que hubieren sido publicados como resúmenes o comunicaciones cortas, situación que deberá indicarse al pie de la primera página del artículo, quedando su publicación a consideración del Comité Científico Editorial y de los evaluadores propuestos para el mismo.

Una vez aceptados los trabajos pasan a ser propiedad intelectual de InVet y su futura publicación, completa o parcial, sólo podrá realizarse a través de una autorización escrita del editor. InVet garantiza a los autores la utilización para la publicación del material de su autoría en libros donde intervenga como autor o editor, con la única obligación de que en dicho libro se mencione la fuente de la publicación original.

Los trabajos pueden redactarse en castellano, inglés o portugués y se podrán presentar en las siguientes categorías:

a) Artículos de investigación: corresponden a informes resultantes de investigación científica original, científicamente apropiada que aporte conocimientos nuevos a la disciplina. Estos se organizarán de acuerdo con el formato previsto mas adelante.

b) Artículos de revisión bibliográfica y/o actualización: son revisiones de aspectos puntuales de temas de actualidad o emergentes, relevantes a la disciplina. No tienen por objeto configurar una recopilación bibliográfica, sino

que presentarán temas en los que existe diversidad de opiniones, sobre los cuales el autor proveerá una opinión objetiva, brindando para ello detalles de los hallazgos científicos, así como opiniones de diversas fuentes. Es requisito de la revista que el autor sea un investigador formado, con amplia experiencia y antecedentes en la temática a desarrollar en el artículo. La publicación de este tipo de trabajos se procesará por invitación del Comité Editorial. No obstante, si un autor desea publicar en esta categoría, deberá proveer al Editor en Jefe su sugerencia respecto del título y estructura propuesta del trabajo para que sea considerada.

c) Notas o comunicaciones breves: corresponden a informes resultantes de la investigación científica, con el objeto de comunicar resultados de amplitud más restringida que los trabajos de investigación, de hasta 2000 palabras de longitud, con la organización correspondiente al trabajo de investigación como se describe más adelante.

d) Nota técnica: se trata de la descripción concisa de una técnica, desarrollo, procedimiento o dispositivo original e innovador, basado en la investigación, que tiende a brindar una solución a un problema relevante para la práctica profesional. Deberá enfatizar las ventajas comparativas que la nueva técnica aporta a la disciplina profesional en la cual se desarrolla. El manuscrito no deberá superar las 2000 palabras y se organizará con secciones de introducción, metodología, resultados y conclusión, no incluyendo al efecto más de diez referencias bibliográficas, ni más de cuatro tablas y/o figuras.

Los mismos, deberán acompañarse de una nota donde se asienten todos los datos del autor principal y del autor a quien se deba dirigir la correspondencia (dirección postal completa, teléfono, fax y correo electrónico), la indicación de que los contenidos del trabajo no han sido anteriormente publicados, ni están siendo considerados para su publicación en otro medio y la autorización para la publicación del artículo firmada por todos los autores. Asimismo, aquellos trabajos fruto de la investigación en animales vivos deberán presentar, y citar en el manuscrito, la aprobación

del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) o del comité semejante en la institución donde se haya desarrollado la misma. Si los datos utilizados en la elaboración del trabajo provienen de pacientes de alguna institución, por ejemplo Hospitales Veterinarios, los autores deberán adjuntar una nota donde se explicita la autorización por parte de la institución para hacer uso de dichos datos.

Los originales impresos por triplicado y grabados en un soporte de disco compacto (CD) o adjuntos a un correo electrónico deben enviarse dirigidos al Editor en Jefe Prof. Dr. Daniel M. Lombardo a:

Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Av. Chorroarín 280 (C1427CWO) Buenos Aires, Argentina. Tel: +54-11-4524-8458, Fax: +54-11-4524-8480, E-mail: invet@fvet.uba.ar

Los trabajos deberán ser tipeados en Microsoft Word versión 2003 o superior. El CD deberá llevar un rotulo identificador que incluya el apellido del primer autor y las tres primeras palabras del título. El nombre del archivo debe ser el apellido del primer autor del artículo, salvado con la extensión *.rtf. El contenido del soporte (CD) debe ser idéntico al de la copia enviada en papel.

La copia escrita debe confeccionarse en papel tamaño A4 (21,6 x 29,4 cm) a doble espacio y con ambos márgenes, encabezamiento y pie de 2,5 cm, colocando la numeración correlativa de cada hoja en el ángulo superior derecho y numerando las todas líneas del texto en forma consecutiva. El tipo de letra debe ser Times New Roman y tamaño de 12 p. El número de páginas no debe ser mayor a 12 para los artículos ni mayor a 6 para las comunicaciones cortas. El manuscrito debe poseer todas sus líneas secuencialmente numeradas.

El artículo debe constar de título (castellano e inglés o portugués) nombre de los autores, institución a la cual pertenecen, resumen (en castellano e inglés o portugués) palabras clave, introducción, materiales y métodos (o diseño experimental) resultados, discusión, conclusiones y

bibliografía. Las comunicaciones cortas presentarán una estructura similar, pudiendo presentar discusión y conclusiones en una misma sección.

Título. Debe ser lo más conciso posible y debe incluirse su forma reducida (el «running title»). Debe corresponderse con la temática del artículo.

Nombre de los autores. Deben colocarse a continuación del título principal del artículo, dejando dos espacios y justificados a la derecha. El nombre de cada autor comenzará en mayúscula y el resto en minúscula, las iniciales de los nombres serán en mayúscula, separadas del apellido por una coma y un espacio y sin espacio ni coma entre ellas. Los diferentes autores irán separados por punto y coma. Al pie de página, con la misma letra que la del cuerpo del texto de tamaño 10 p y precedido por un número de referencia, se colocará la institución a la que pertenece, títulos, etc., indicando también la dirección postal y electrónica del autor correspondiente.

González, G¹., Pérez, H².

¹Departamento de Producción Animal, ²Departamento de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (1427) Buenos Aires. e-mail:.....

Resúmenes. Se deberán incluir los aspectos más destacados de los objetivos, materiales y métodos, resultados y conclusiones. La extensión máxima es de 200 palabras (se considera palabra a cualquier unidad separada por un espacio en cada lado) para los artículos y 150 para las comunicaciones cortas. No se deben utilizar abreviaturas, salvo para las unidades de medida. Se ubica primero el resumen en castellano o portugués, seguido por las palabras clave; luego el título del artículo y el resumen en inglés, seguidos de las correspondientes palabras clave en el mismo idioma. Si se emplea idioma inglés, se incluirá resumen y palabras clave en castellano.

Palabras clave. A continuación del título «Palabras clave» enumerar hasta cinco palabras las que se utilizarán para indexar el artículo. Es

conveniente que parte de dichas palabras no sean tomadas del título. Cada una de ellas se escribirá separada por una coma.

Ejemplo

Palabras clave: (hígado), (ultrasonografía).

Cuerpo del artículo. En general se toma como base que el artículo contará con tres niveles de subtítulos. Los subtítulos de primer orden deben centrarse respecto del cuerpo del texto, escribirse en mayúscula y en negrita. Corresponden al RESUMEN, INTRODUCCIÓN, MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSIÓN, CONCLUSIONES y BIBLIOGRAFÍA.

Los subtítulos de segundo orden deben justificarse a la izquierda y escribirse con minúscula y negrita. Los de tercer orden, comienzan en la primera línea del párrafo, separados del mismo por un punto, justificados sobre el margen izquierdo y escritos en *itálica*. En caso de requerir un cuarto nivel de subtítulo se respetará lo dicho para el tercer nivel, reemplazando *itálica* por subrayado.

El uso de abreviaturas deberá ser mínimo y de acuerdo a lo estipulado por la Real Academia Española (para los trabajos redactados en español). No se permiten abreviaturas en los títulos, subtítulos y palabras clave. En el resumen sólo se aceptarán abreviaturas de las unidades de medida y en el resto del texto sólo se utilizarán cuando sucedan a un número.

Cuando se mencionen productos comerciales deberá aclararse a continuación entre paréntesis los datos del nombre comercial, nombre del fabricante, ciudad y país de fabricación. Los microorganismos y parásitos deberán citarse por género y especie. El nombre del género debe escribirse completo la primera vez que se cita en el texto y luego abreviado por su primera letra. Todos los nombres deben escribirse en *itálica*.

En caso de que se utilicen abreviaturas o siglas poco frecuentes, se deberán definir la primera vez que aparezcan en el texto.

Introducción. Debe ser lo más breve posible

y en ella se presentarán los antecedentes más relevantes del tema existentes en la bibliografía, se fijarán los objetivos de la investigación y se indicará la importancia e impacto de la misma.

Materiales y Métodos. Se describirán los diseños experimentales, los materiales y metodologías empleadas. En caso de utilizarse técnicas conocidas, sólo se citarán, pero en el caso de procedimientos nuevos o poco difundidos, se describirán en detalle. Asimismo, deberán ser mencionados los métodos estadísticos empleados para el análisis de los datos obtenidos. En el caso de que la experimentación haya requerido el uso de animales deberá indicarse como fueron conducidos los experimentos a los fines de evitar el sufrimiento innecesario de los mismos y el empleo del mínimo necesario para el tipo de experimentos llevados a cabo. Es recomendable, en el caso que el lugar donde se realizaron las investigaciones cuente con un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio tener constancia de la aprobación por parte del mismo. En caso contrario el Comité Científico Editorial se reserva el derecho de consultar al Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de esta institución sobre aquellos protocolos que no estén previamente evaluados por Comités de Ética institucionales.

Resultados. Se expresarán en forma clara y concisa, para lo cual podrán emplearse cuadros, gráficos o fotografías. Como los gráficos serán reducidos, los símbolos y textos deben ser suficientemente grandes para que puedan leerse luego de la reducción. La información suministrada en gráficos no debe repetirse en cuadros.

Discusión. Conclusiones. Se explicitará todo lo relacionado con el significado y validez de los resultados, evitando repetir aspectos mencionados bajo el subtítulo Resultados. Las conclusiones deben ser concisas y claras.

Agradecimientos. Si corresponde agradecer ayudas técnicas, soportes financieros, etc. En

caso de existir conflictos de intereses, éstos deben ser declarados.

Bibliografía. Las citas bibliográficas deberán limitarse al mínimo necesario, incluyendo exclusivamente las consultadas. Se sugiere no incluir más de 30 referencias. Estas se presentarán según lo determinado para la publicación de artículos científicos del International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Se enumerarán en forma consecutiva, por orden alfabético del apellido del primer autor. Se incluirán todos los autores cuando sean seis o menos, en caso de ser más, a partir del tercer autor serán reemplazados por *et al.* Las citas en el texto se indicarán con el número de orden, colocado como superíndice. El tamaño de la letra debe ser 10 p.

Las abreviaturas aceptadas internacionalmente de los títulos de las publicaciones se pueden encontrar en la base de datos Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>). En la lista de referencia los artículos de revistas, capítulos de libros, libros y eventos científicos serán presentados según los siguientes ejemplos:

Dunhan, B.; Liu, S.A.; Taffet, S. Immunolocalization and expression of functional and non-functional cell-to-cell channels from wild-type and mutant rat heart connexin 43 CDNA. *Circ Res.* 1998; 70:1233-43

Marrube, G.; Rozen, F.; Pinto, GB.; *et al.* New polymorphism of FASN gene in chicken. *J Appl Genet.* 2004; 45(4):453-5.

Zipes, DP.; Jalife, J. Cardiac electrophysiology. *From cell to bedside. 2nd Edition.* W.B.Saunders Co. Philadelphia, USA, 1995.

Marban, E.; O'Rourke, B. Calcium channels: Structure, function, and regulation. En Zipes DP. (ed.). Cardiac electrophysiology. *From cell to bedside. 2nd Edition.* W.D. Saunders Co. Philadelphia, USA, 1995:11-21

Givon-Lavi, N.; Greenberg, D.; Sharf, A.; Vardy, D.; Katz, A.; Dagan, R. Risk of breakthrough pneumococcal bacteremia in children aged <5 years: comparison between oral amino-penicillin, cephalosporins

and azithromycin. *5th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases 2006*. Alice Springs, Australia.

Marra, F.; Patrick, D.; Chong, M.; Bowie, W. Increased Use of Second-Generation Macrolide Antibiotics among Children in British Columbia, Canada [Abstract G-1354]: *45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Washington, DC, December 16-19, 2005. Washington, DC: American Society for Microbiology

Negro, V.; Hernández, SZ.; Saccomanno, DM. Detección de lesiones odontoclásticas reabsortivas felinas (LORF) mediante examen clínico y radiológico. En: <http://www.fvet.uba.ar/invet/negro3.pdf>, consultado 2 de octubre 2006

La fuente del artículo deberá encontrarse en *itálica*.

Cuando se trate de informaciones no publicadas y no referenciadas se mencionarán como sigue: Delelis JC. Comunicación personal (1996)

Ilustraciones. En cada artículo se aceptará hasta 4 fotografías blanco y negro y hasta 4 tablas o gráficos. Las ilustraciones excedentes serán

costeadas por los autores, como las ilustraciones en color.

Todas las tablas y gráficos deberán remitirse separadas del cuerpo del artículo, al igual que sus pies explicativos, así como incluidas en el texto. Se numerarán en orden cronológico de inclusión en el cuerpo del artículo en el anverso y en caso de ser confusa su orientación, se indicará la parte superior y derecha con sendas flechas. Los dibujos originales deben estar confeccionados sobre papel blanco y con tinta china. Si son tomados de equipos de computación sólo se aceptarán escaneados de alta calidad, con una resolución mínima de **150 dpi**, en archivos formato *.jpeg o *.tif. Las fotografías deben enviarse en papel brillante, originales, con alta resolución y en foco, en caso de estar escaneadas deberán cumplir los mismos requisitos especificados para los dibujos. Los autores deberán indicar en el margen izquierdo del original con un círculo y el número correspondiente, el lugar donde consideran más adecuada la colocación de gráficos e ilustraciones, así como también sugerirán el tamaño final de las reproducciones. Sin embargo, el editor se reserva el derecho de alterar tanto la ubicación como el tamaño de las mismas.

Instructions for authors

InVet (Veterinary Research) is a scientific journal whose objective is to make known scientific and academic research on subjects inherent to areas of knowledge of Veterinary Sciences; Basic Sciences, Animal Production, Preventive Medicine, Public Health and Bromatology, Animal Health and General Education. This journal is aimed at Veterinarians, Doctors in Medicine, Biologists, Technicians in laboratory animal, Zoo-technicians, Food technicians and all professionals related to health and animal production. InVet publishes original articles and short communications from national and foreign authors which should be presented according to the following instructions. Bibliography reviews are subject to evaluation by the Editorial Scientific Committee regarding their relevance for the journal according to the editorial admission requisites.

All studies received are subject to acceptance and their reception does not imply necessary publication. All work will be evaluated by two external reviewers i.e. not from the Faculty of Veterinary Sciences of the University of Buenos Aires. Should a discrepancy result from the evaluations received, a third reviewer could be consulted. The final decision will be taken by the Editorial Scientific Committee.

The whole evaluation process will be carried out using the “double blind” modality to maintain the anonymity of both the authors and the reviewers. Once the evaluation has been finalized, the author will be notified whether the work has been accepted or rejected.

The Editor maintains the right to editorial revision.

All work submitted must be unpublished. Articles that have been presented at Congresses and Symposia or that have been published as summaries or short communications, a fact which must be indicated at the foot of the first page of the article, will be accepted but publication remains subject to the Editorial Committee's consideration and that of the reviewers proposed to evaluate them.

Once accepted, the articles become the intellectual property of InVet and their future publication, either partial or complete, will only be possible with written permission from the Editor. InVet guarantees authors the use of their published material in books where they intervene as authors or editors, with the sole obligation of mentioning in the book the source of the original publication. Articles can be written in Spanish, English or Portuguese and can be presented in the following categories:

a) Research articles: these correspond to results from original scientific research, scientifically appropriate that provide new information to the area of knowledge. They will be organized according to the format shown further on.

b) Articles of bibliography revision and/or update: these are specific revisions of current or emerging subjects, relevant to the area of knowledge. The objective is not to make a bibliographic compilation, rather present subjects having diverse opinions where the author/s provide an objective opinion and details of scientific findings as well as opinions from different sources. It is a requirement of this

journal that the author is a researcher trained with extensive experience and background in the subject to be discussed in the article. Generally these articles are by invitation from the Editorial Committee. Nevertheless, if an author wishes to publish in this category, he/she should provide the Editor in Chief with his/her suggestion for a title and proposed structure for it to be considered.

c) Short communications or Notes: these correspond to reports resulting from scientific research where the objective is to communicate results of a more restricted nature, of up to 2000 words in length, and organized as described further on.

d) Technical Note: It is the concise description of a technique, a development, a procedure, or original and innovative device, based on research that aims at providing a solution to a problem relevant to professional practice. Emphasis must be placed on the comparative advantages that the new technique provides to the professional discipline in which it is developed. The manuscript should not have more than 2000 words and should be organized into the following sections: introduction, methodology, results and conclusion. Not including, to this effect, more than ten references and no more than four tables and / or figures. They should be accompanied by a note consigning information of the main author and the corresponding author (complete postal address, fax, e-mail), a statement that the contents of the article have not been previously published nor are being considered for publication in any other form and the authorization to publish it signed by all the authors. Also, those scientific articles that stem from research on live animals must submit, and cited in the manuscript, approval of the "Institutional Committee and Use of Experimental Animals (CICUAL)" or similar committee in the institution where they have developed research. If the data used in the preparation of the paper came from patients of an institution, for example Veterinary Hospitals, authors should attach a note where the institution explicit permission to make use of that data. Triplicate printed copies of the originals and a

digital back-up copy on a compact disk (CD) or as an e-mail attachment, must be sent to the Editor in Chief Prof. Daniel M. Lombardo, MV PhD to:

Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Av. Chorroarín 280 (C1427CWO) Buenos Aires, Argentina. Tel: +54-11-4524-8458, Fax: +54-11-4524-8480, E-mail: invet@fvet.uba.ar

The manuscripts should be typed using Microsoft Word 2003 version or higher. The CD must be identified, including the surname of the first author and the first three words of the title. The name of the document must be the surname of the first author and it must be saved with the extension: *.rtf. The contents of the back-up (CD) should be identical to the printed copy that is sent. The printed copy must be on A4 (21.6 x 29.4 cm) size paper, double-spaced and having all margins of 2.5 cm, with consecutive numbering on each page placed in the top right hand corner and all lines of the text also numbered consecutively. Font type should be Times New Roman size 12 p. Articles should not exceed 12 pages and short communications should not exceed 6 pages. The manuscript should have all its lines numbered sequentially.

The manuscript must have a title (in Spanish, English or Portuguese), name of the authors, Institution they belong to, summary (in Spanish, English or Portuguese), key words, introduction, materials and methods (or experimental design), results, discussion, conclusions and references.

Short communications should have a similar structure and the discussion and conclusions can be in the same section.

Title. It should be as concise as possible and a short title must be included («running title»). It should correspond with the subject of the article.

Names of the authors. They should be immediately after the main title of the manuscript, separated by two spaces, and justified to the right. Each author's name should start with a capital letter and the initials also in capital letters, separated from the surname by a comma and a space but without spaces

or commas between them. Different authors should be separated by semicolons. At the foot of the page, using the same font as the text, size 10 p and preceded by a reference number, the name of the institution the author belongs to, titles, etc., also indicating postal and e-mail address of the corresponding author.

GONZÁLEZ, G.¹, PÉREZ, H.²

¹Departamento de Producción Animal, ²Departamento de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (1427) Buenos Aires. email:.....

Summary. The most important aspects of the objectives, materials and methods, results and conclusions should be included. Maximum length for articles is 200 words (each unit separated by a space on either side is considered a word) and for short communications, 150 words. No abbreviations should be used save measurement units. The order should be: first the summary in either Spanish or Portuguese followed by the Key Words; second the title and the summary in English, followed by the corresponding Key Words in the same language. If English is used, a summary and key words in Spanish must be included.

Key words. Following the title «Key words» enumerate a maximum of five words which will be used to index the article. Each word should be separated by a comma.

Example Key words: (liver), (ultrasonography).

Body of the manuscript. In general the article should have three levels of subtitles. Those of first order should be centered with regard to the body of the text, be written in capital letters and bold type.

These should be SUMMARY, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONCLUSIONS and REFERENCES.

Second order subtitles must be justified to the left and written in small bold type. Those of third order start on the first line of the paragraph, separated by a full stop, and justified to the left margin and written in italics. Should a fourth

level subtitle be necessary, it should be similar to the third level ones, underlining it instead of using italics. The use of abbreviations should be kept to a minimum and according to that stipulated by the Real Academia Española in cases where the article was written in Spanish. No abbreviations should be used in the titles, subtitles and key words. In the summary, only measurement units will be accepted as abbreviations and in the rest of the text, they will only be used when following a number. When commercial products are mentioned, the commercial name, name of the manufacturer, city and country of manufacture should be added between brackets immediately afterwards. Microorganisms and parasites must be cited by genus and species. The complete genus name should be written the first time it is mentioned and thereafter can be abbreviated using its first letter. All names must be written in italics.

When using uncommon abbreviations, they should be defined the first time they appear in the text.

Introduction. It should be as short as possible and should present the most relevant information existing in the bibliography, the objectives of the study should be mentioned and their importance and impact should be indicated.

Materials and Methods. The experimental design, materials and methodologies used should be described. When using known techniques, they can simply be cited, but in the case of new or not very widespread procedures, they must be described in detail. Likewise, the statistical methods used to analyze the data should be mentioned. If animals were used in the experiments, how these were carried out to avoid their unnecessary suffering must be indicated, as also the minimum number of animals necessary according to the type of experiment. A written statement from the Committee for the Care and Use of Laboratory Animals approving the experiments would be recommended if this is possible. Otherwise the Scientific Editorial Committee reserves the right to consult the Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of this institution concerning the protocols that have

not previously been evaluated by an institutional Ethics Committee.

Results. Should be expressed clearly and concisely. Tables, graphs or photographs can be used to this end. As the graphs will be reduced in size, the symbols and text need to be sufficiently large to allow reading after reduction. Information supplied in graphs must not be repeated in tables.

Discussion. Conclusions. Everything related to the significance and validity of the results must be stated, avoiding repetition of aspects mentioned under the subtitle Results. Conclusions must be clear and concise.

Acknowledgments. If it is appropriate to give thanks for technical or financial support, etc. Should there be a conflict of interests, these should be stated.

References. Bibliography cited should be limited to the minimum necessary, including only those consulted. It is suggested that no more than 30 references be included. These will be presented according to that determined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). They must be consecutively numbered, using alphabetical order for the first authors' surnames. All authors should be included when their number does not surpass six. Should there be more, after the third author, the rest will be replaced by et al. References must be indicated in the text with their order number as a superscript, size 10 p. Internationally accepted abbreviations of the publication titles can be found in the Pubmed data base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>). Journal articles, book chapters, books and scientific events should be presented in the reference list according to the following examples:

Dunhan, B.; Liu, S.A.; Taffet, S. Immunolocalization and expression of functional and non-functional cell-to-cell channels from wildtype and mutant rat heart connexin 43 CDNA. *Circ Res.* 1998; 70:1233-43.

Marrube, G.; Rozen, F.; Pinto, GB.; et al. New polymorphism of FASN gene in chicken. *J Appl Genet.* 2004; 45(4):453-5.

Zipes, DP.; Jalife, J. *Cardiac electrophysiology. From cell to bedside.* 2nd Edition. W.B.Saunders Co. Philadelphia, USA, 1995.

Marban, E.; O'Rourke, B. Calcium channels: Structure, function, and regulation. En Zipes DP. (ed.). *Cardiac electrophysiology. From cell to bedside.* 2nd Edition. W.D. Saunders Co. Philadelphia, USA, 1995:11-21.

Givon-Lavi, N.; Greenberg, D.; Sharf, A.; Vardy, D.; Katz, A.; Dagan, R. Risk of breakthrough pneumococcal bacteremia in children aged <5 years: comparison between oral amino-penicillin, cephalosporins and azithromycin. *5th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases* 2006. Alice Springs, Australia.

Marra, F.; Patrick, D.; Chong, M.; Bowie, W. Increased Use of Second-Generation Macrolide Antibiotics among Children in British Columbia, Canada [Abstract G-1354]: *45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Washington, DC, December 16-19, 2005. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Negro, V.; Hernández, SZ.; Saccomanno, DM. Detección de lesiones odontoclásticas reabsorptivas felinas (LORF) mediante examen clínico y radiológico. In: <http://www.fvet.uba.ar/invet/negro3.pdf>, consulted 2nd of October of 2006.

The source of the article should be in italics.

In the case of unpublished information, they should be mentioned as follows: Delelis JC. Personal communication (1996).

Illustrations. For each manuscript, a total of 4 black and white photographs and a maximum of 4 tables or graphs will be accepted. Excess illustrations will be financed by the authors, as also color illustrations. All tables and graphs as well as their captions, as included in the text, should be sent separate from the body of the manuscript. They should be numbered chronologically according to their inclusion in the body of the manuscript, on the front of the page and, should their orientation be confusing, in the top right hand corner with the corresponding arrows. Original drawings must be prepared on white paper with) Indian

ink. If taken from a computer, only high quality scannings will be accepted, with a minimum resolution of 150 dpi, in *.jpeg or *.tif format. Photographs must be original, printed on shiny paper, with a high resolution and in focus. If they are scanned, they must comply with the same requisites as those for drawings. Authors should

indicate, on the left margin of the original and with a circle and the corresponding number, the place they consider most adequate for placing the graphs and illustrations. They should also suggest the final size of the reproductions. Nevertheless, the Editor reserves the right to alter both the location and the size of the illustrations.

Instruções para os autores

InVet (Investigação Veterinária) é uma revista de publicações científicas cujo objetivo é difundir trabalhos científicos e acadêmicos que abordam as temáticas inerentes às áreas de conhecimento das Ciências Veterinárias: Ciências Básicas, Produção Animal, Medicina Preventiva, Saúde Pública e Bromatologia, Saúde Animal e Formação Geral. Esta publicação destina-se a Veterinários, Médicos, Biólogos, Bioteristas, Zootecnistas, Técnicos em Alimentação e todos aqueles profissionais relacionados à saúde e produção animal. InVet publicará artigos originais e comunicações breves de autores nacionais e estrangeiros, que devem ser apresentados segundo as instruções que aqui se explicam. Os artigos de revisão bibliográfica serão acatados pelo Comitê Científico Editorial levando em consideração a sua pertinência para a revista, além dos requisitos de admissibilidade editorial.

Todos os trabalhos recebidos ficam sujeitos à aceitação e sua recepção não implica na obrigatoriedade de publicação. Os trabalhos serão avaliados por dois árbitros externos à Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade de Buenos Aires. No caso de discrepância entre as avaliações, se poderá recorrer a um terceiro árbitro. A decisão final será tomada pelo Comitê Científico Editorial. Todo o processo de avaliação se desenvolve sob a modalidade “duplo cego”, mantendo sob anonimato tanto as identidades dos autores quanto as dos avaliadores. Finalizada a tarefa de arbitragem, o autor receberá a comunicação que indica a aceitação ou a rejeição do trabalho. O Editor se reserva o direito da revisão editorial.

Os trabalhos devem ser inéditos. Serão aceitos para publicação trabalhos que tenham sido motivo de apresentações em Congressos, Simpósios e Jornadas ou que tenham sido publicados como resumos ou comunicações breves, situação que deverá ser indicada no rodapé da primeira página do artigo, para que a publicação seja considerada pelo Comitê Científico Editorial e pelos avaliadores.

Uma vez aceitos, os trabalhos passam a ser propriedade intelectual de InVet. Sua futura publicação, completa ou parcial, só poderá se realizar através de uma autorização escrita do Editor. InVet assegura a um autor a utilização do material de sua autoria para publicação em livros onde intervenha como autor ou editor, com a única obrigação de que seja mencionada nos livros a fonte da publicação original.

Os trabalhos podem ser escritos em espanhol, inglês ou português e podem ser apresentados nas seguintes categorias:

a) Artigos de investigação: correspondem a informes resultantes de investigação científica original e cientificamente apropriada que aporte novos conhecimentos à disciplina. Tais informes serão organizados de acordo com o formato estipulado mais adiante.

b) Artigos de revisão bibliográfica e/ou atualização: são revisões de aspectos pontuais de temas atuais ou emergentes, relevantes à disciplina. Não tem como objeto configurar uma recopilação bibliográfica, mas apresentar temas em que existe diversidade de opiniões, em que o autor dar uma opinião objetiva, fornecendo para isso detalhes dos descobrimentos científicos junto com opiniões de

diversas fontes. É uma exigência da revista que o autor é um pesquisador treinado com ampla experiência e formação no assunto a ser discutido no artigo. Tais artigos, em geral, são processados por convite do Comitê Editorial. No entanto, caso um autor deseje publicar nesta categoria, deverá apresentar ao Editor-Chefe sua sugestão sobre o título e estrutura proposta do trabalho para que seja considerada.

c) Notas ou comunicações breves: correspondem a informes resultantes da investigação científica, com o objetivo de comunicar resultados de amplitude mais restrita que os trabalhos de investigação, de até 2000 palavras de extensão, com a organização correspondente ao trabalho de investigação, descrita mais adiante.

d) Nota técnica: trata-se da descrição concisa de uma técnica, desenvolvimento, procedimento ou dispositivo original e inovador, baseado na investigação, que tende a dar solução a um problema relevante para a prática profissional. Deverá enfatizar as vantagens comparativas que a nova técnica aporta à disciplina profissional na qual se desenvolve. O manuscrito não deverá conter mais de 2000 palavras e deverá ser organizado com seções de introdução, metodologia, resultados e conclusão, não incluindo mais de dez referências bibliográficas, nem mais de quatro tabelas e/ou figuras.

Os trabalhos devem estar acompanhados de uma nota comunicando todos os dados do autor principal e do autor a quem se deve dirigir a correspondência (endereço postal completo, telefone, fax e correio eletrônico), a declaração de que os conteúdos do trabalho não foram publicados anteriormente nem estão sendo considerados para publicação em outro meio e a autorização para a publicação do artigo firmada por todos os autores. Da mesma forma, aqueles resultantes do trabalho de investigação em animais vivos devem apresentar, e citado no manuscrito, a aprovação do Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais Experimentais (CICUAL) ou comitê semelhante na instituição, onde é desenvolvido. Se os dados utilizados na elaboração do trabalho veio de pacientes de uma

instituição, por exemplo, hospitais veterinários, os autores devem anexar uma nota em que a autorização explícita da instituição para fazer uso desses dados.

Os originais impressos em três vias e gravados num suporte de disco compacto (CD) ou anexos a um correio eletrônico devem ser dirigidos ao Editor-Chefe, Prof. Dr. Daniel M. Lombardo em:

Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Av. Chorroarín 280 (C1427CWO) Buenos Aires, Argentina. Tel: +54-11-4524-8458, Fax: +54-11-4524-8480, E-mail: invet@fvet.uba.ar

Os trabalhos devem ser digitados em Microsoft Word, versão 2003 ou superior. O CD deverá levar um rótulo identificador contendo o sobrenome do primeiro autor e as três primeiras palavras do título. O nome do arquivo deve ser o sobrenome do primeiro autor do artigo, salvo com extensão *.rtf. O conteúdo do suporte (CD) deve ser idêntico ao da cópia enviada em papel.

A cópia impressa deve estar em papel tamanho A4 (21,6 x 29,4 cm) com espaço duplo entre linhas e com margens superior, inferior, esquerda e direita de 2,5 cm, com a numeração das páginas exibida no ângulo superior direito e numeração sequencial de todas as linhas do texto. A fonte deve ser Times New Roman de tamanho 12 p. A quantidade de páginas não deve ser maior que 12 para os artigos nem maior que seis para as comunicações breves. O manuscrito deve ter todas as linhas numeradas sequencialmente.

O artigo deve constar de título (em espanhol e inglês ou português), nome dos autores, instituição a que pertencem, resumo (em espanhol, inglês ou português), palavras-chave, introdução, materiais e métodos (ou desenho experimental), resultados, discussão, conclusões e bibliografia. As comunicações breves terão uma estrutura similar, podendo ter discussão e conclusões numa mesma seção.

Título. Deve ser o mais conciso possível e deve-se incluir sua forma reduzida (o “running title”). Deve corresponder à temática do artigo.

Nomes dos autores. Devem ser colocados depois do título principal do artigo, deixando dois espaços e justificados à direita. O sobrenome de cada autor começará em maiúscula com o resto em minúscula, as iniciais dos nomes serão em maiúscula, separadas do sobrenome por uma vírgula e um espaço e sem espaço nem vírgula entre elas. Os diferentes autores estarão separados por ponto e vírgula. Em rodapé de página, na mesma fonte do corpo do texto de tamanho 10 p e precedido por um número de referência, deve-se informar a instituição a que pertence o autor, com títulos, etc., indicando também o endereço postal e eletrônico do autor a quem se deve dirigir a correspondência.

González, G.¹; Pérez, H.²

¹Departamento de Producción Animal,

²Departamento de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Chorroarín 280 (1427) Buenos Aires. email:

Resumos. Devem conter os aspectos mais destacados dos objetivos, materiais e métodos, resultados e conclusões. A extensão máxima é de 200 palavras (considera-se palavra qualquer unidade separada por um espaço em cada lado) para os artigos e 150 palavras para as comunicações breves. Não se deve utilizar abreviaturas, salvo para as unidades de medida. Coloca-se primeiro o resumo em espanhol ou português, seguido pelas palavras-chave; depois o título do artigo e o resumo em inglês, seguidos pelas correspondentes palavras-chave na mesma língua. Caso o artigo seja escrito em inglês, serão incluídos resumo e palavras-chave em espanhol.

Palavras-chave. Após o título “Palavras-chave”, deve-se indicar até cinco palavras que serão utilizadas para indexar o artigo. É conveniente que nem todas essas palavras-chave sejam palavras que integram o título. Cada uma delas será escrita entre parênteses, com uma vírgula antes da palavra-chave seguinte.

Exemplo

Palavras-chave: (fígado), (ultrassonografia).

Corpo do artigo. Em geral, se supõe que o artigo terá três níveis de subtítulos. Os subtítulos de primeira ordem devem estar centralizados em relação ao corpo do texto e escritos em maiúscula e em negrito. Correspondem ao RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES e BIBLIOGRAFIA.

Os subtítulos de segunda ordem devem ser justificados à esquerda e escritos em minúscula e em negrito. Os de terceira ordem começam na primeira linha do parágrafo, separados do mesmo por um ponto, justificados à esquerda e escritos em itálico. No caso de requerer um quarto nível, se respeitará o dito para o terceiro nível, substituindo itálico por sublinhado.

O uso de abreviaturas deve ser mínimo. Não se permitem abreviaturas nos títulos, subtítulos ou palavras-chave. No resumo, só serão aceitas abreviaturas das unidades de medida que, no resto do texto, só serão utilizadas quando estiverem sucedendo um número.

Ao mencionar produtos comerciais, devem ser informados, entre parênteses, os dados do nome comercial, nome do fabricante e cidade e país de fabricação. Os micro-organismos e parasitas devem ser citados por gênero e espécie. O nome do gênero deve ser escrito completo na primeira vez que aparece no texto e depois abreviado por sua primeira letra. Todos os nomes devem ser escritos em itálico.

No caso de utilizar abreviaturas ou siglas pouco comuns, essas devem ser definidas na primeira vez que aparecem no texto.

Introdução. Deve ser o mais breve possível, apresentando os antecedentes mais relevantes do tema existentes na bibliografia, expondo os objetivos da investigação e indicando sua importância e impacto.

Materiais e Métodos. Devem ser descritos os desenhos experimentais, materiais e

metodologias usadas. No caso de ter utilizado técnicas conhecidas, essas só precisam ser citadas; mas procedimentos novos ou pouco difundidos devem ser descritos com detalhes. Igualmente, devem ser mencionados os métodos estatísticos usados para analisar os dados obtidos. Caso a experimentação tenha requerido o uso de animais, é preciso indicar como foram conduzidos os experimentos visando usar a quantidade mínima de animais para o tipo de experimento e evitar o sofrimento desnecessário. Se o lugar onde as investigações foram realizadas contar com um Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, é recomendável que haja registro da aprovação desse Comitê. O Comitê Científico Editorial se reserva o direito de consultar o Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais de Laboratório desta Faculdade sobre aqueles protocolos que não tenham sido previamente avaliados por Comitês de Ética institucionais.

Resultados. Devem ser expressos de forma clara e concisa, podendo para isso ser usados tabelas, gráficos ou fotografias. Como os gráficos serão reduzidos, os símbolos e textos devem ser suficientemente grandes para que possam ser lidos após redução. A informação subministrada em gráficos não deve ser repetida em tabelas.

Discussão. Conclusões. Deve ser explicitado tudo que se relacione com o significado e validação dos resultados, evitando repetir aspectos mencionados sob o subtítulo Resultados. As conclusões devem ser concisas e claras.

Agradecimentos. Sob este subtítulo, podem ser agradecidas ajudas técnicas, suporte financeiro, etc. Deve ser declarado qualquer conflito de interesses, se houver.

Bibliografia. As citações bibliográficas deverão ser limitadas ao mínimo necessário, incluindo apenas as consultadas. Sugere-se não incluir mais que 30 referências. Elas serão apresentadas segundo o determinado, para a publicação de artigos científicos, pelo

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Serão enumeradas por ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor. Serão incluídos todos os autores quando forem seis ou menos; em caso de ser mais, a partir do terceiro autor serão substituídos por et al. As citações no texto serão indicadas com o número de ordem, colocado em sobre-escrito. O tamanho da letra deve ser 10 p.

As abreviaturas aceitas internacionalmente dos títulos das publicações podem ser encontradas na base de dados Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>). Na lista de referência, os artigos de revistas, capítulos de livros, livros e eventos científicos serão apresentados de acordo com os seguintes exemplos:

Dunhan, B.; Liu, S.A.; Taffet, S. Immunolocalization and expression of functional and non-functional cell-to-cell channels from wildtype and mutant rat heart connectin 43 CDNA. *Circ Res.* 1998; 70:1233-43

Marrube, G.; Rozen, F; Pinto, GB.; et al. New polymorphism of FASN gene in chicken. *J Appl Genet.* 2004; 45(4):453-5.

Zipes, DP; Jalife, J. Cardiac electrophysiology. *From cell to bedside.* 2nd Edition. W.B.Saunders Co. Philadelphia, USA, 1995.

Marban, E.; O'Rourke, B. Calcium channels: Structure, function, and regulation. En Zipes DP. (ed.). Cardiac electrophysiology. *From cell to bedside.* 2nd Edition. W.D. Saunders Co. Philadelphia, USA, 1995:11-21

Givon-Lavi, N.; Greenberg, D.; Sharf, A.; Vardy, D.; Katz, A.; Dagan, R. Risk of breakthrough pneumococcal bacteremia in children aged <5 years: comparison between oral amino-penicillin, cephalosporins and azithromycin. *5th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases 2006.* Alice Springs, Australia.

Marra, F.; Patrick, D.; Chong, M.; Bowie, W. Increased Use of Second-Generation Macrolide Antibiotics among Children in British Columbia, Canada [Abstract G-1354]: *45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC, December 16-19, 2005*. Washington, DC: American Society for Microbiology

Negro, V.; Hernández, SZ.; Saccomanno, DM. Detección de lesiones odontoclásticas reabsortivas felinas (LORF) mediante examen clínico y radiológico. En: <http://www.fvet.uba.ar/invet/negro3.pdf>, consultado 2 de octubre 2006

A fonte do artigo deverá ser exibida em itálico.

Tratando-se de informações não publicadas e não referenciadas, serão mencionadas da seguinte forma: Delelis, JC. Comunicação pessoal (1996)

Ilustrações. Em cada artigo serão aceitas até quatro fotografias em preto-e-branco e até quatro tabelas ou gráficos. As ilustrações excedentes serão custeadas pelos autores, assim como ilustrações coloridas.

Além de ser incluídas no texto, todas as tabelas e gráficos, com suas legendas explicativas, devem ser enviados separados do corpo do artigo, numerados no anverso em ordem de inclusão no corpo do artigo, e com a orientação indicada com setas na parte superior e direita no caso de possíveis dúvidas. Os desenhos originais devem estar em papel branco, com tinta nanquim. Caso venham de equipes de computação, só serão aceitos escaneados de alta qualidade, com uma resolução mínima de 150 dpi, em arquivos de formato *.jpeg ou *.tif. As fotografias devem estar em papel brilhante, originais, com alta resolução e em foco, Caso sejam escaneadas, deverão cumprir os mesmos requisitos especificados para os desenhos. Os autores devem indicar na margem esquerda do texto, com um círculo e o número correspondente, o lugar onde consideram mais adequada a colocação de gráficos e ilustrações e também sugerir o tamanho final das reproduções. No entanto, o editor se reserva o direito de alterar tanto a localização como o tamanho.

