

ISSN 1514-6634

ISSN (on line) 1668-3498

Volumen 21 N° 2

Diciembre 2019

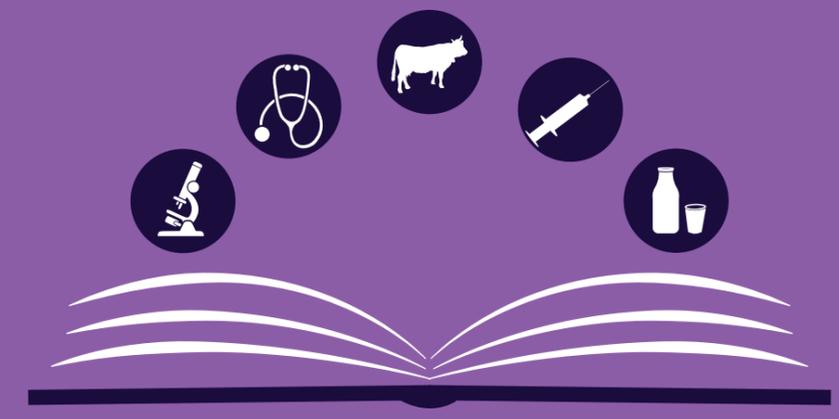


Investigación Veterinaria • Revista Argentina de Investigación en Ciencias Veterinarias Volumen 21 N° 2 - Diciembre 2019

InVet

Investigación Veterinaria

Revista Argentina de Investigación en Ciencias Veterinarias



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



.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 21 N° 2
Diciembre 2019



.UBAveterinaria 
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



InVet

(Investigación Veterinaria)

Vol. 21 N° 2, 2019

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. Nélide 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 Larriue

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

Universidad Complutense de Madrid. (España).

Comité Científico Asesor (CCA) *Cont.:*

Dr. Albert Lloret Roca

Hospital Clínic Veterinari, Universidad Autónoma 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
Nebraska. (Estados Unidos).

Dr. Francisco A. Uzal

California Animal Health and Food Safety Lab School of
Veterinary 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. 21 N° 2, 2019

Buenos Aires, Argentina

ISSN 1514-6634 (impreso)

ISSN 1668-3498 (en línea)

Índice / Contents

Artículos originales

Immunolocalización de la integrina $\alpha 5\beta 1$, la laminina y el colágeno tipo V en placenta porcina en diferentes etapas gestacionales

Immunolocalization of integrin $\alpha 5\beta 1$, laminin and type V collagen in porcine placenta in different gestational stages

Vélez, CL; Williamson, DM; Clauzure, M; Koncurat, MA; Barbeito, CG. 313

Estudio de transferencia de inmunidad en crianzas artificiales de terneros en la cuenca lechera santafecina

Immunity transfer study in an artificial rearing system of calves in the dairy region of Santa Fe

Aguirre, F.; Gutman, D.; Moroni, C.; Rollón, N.; Allasia, M.; Cattaneo, L.; Ruiz, MF.....323

Detección de la garrapata exótica *Amblyomma varanense* (Acari: Ixodidae) en especímenes importados de *Varanus salvator* (Squamata: Varanidae) en la Argentina

Exotic tick *Amblyomma varanense* (Acari: Ixodidae) in imported specimens from *Varanus salvator* (Squamata: Varanidae) in Argentina

Cicuttin, GL.; Wiemeyer, G.; Pérez, MA.; Guglielmone, AA.; Nava, S.331

Persistencia del conducto arterioso en caninos: evaluación retrospectiva de 88 casos (2014 - 2018)

Patent ductus arteriosus in dogs: 88 cases (2014 - 2018)

Bökenhans, RJ.337

Punción submandibular con aguja de inyección en ratones: comparación de dos procedimientos

Submandibular puncture with injection needle in mice: comparison between two different procedures

Fernández, V.; Domínguez, P.; García, J.P.; Estein, S.M.347

Índice de autores	353
Instrucciones para los autores	355

Inmunolocalización de la integrina $\alpha 5\beta 1$, la laminina y el colágeno tipo V en placenta porcina en diferentes etapas gestacionales

Immunolocalization of integrin $\alpha 5\beta 1$, laminin and type V collagen in porcine placenta in different gestational stages

VÉLEZ, CL^{1,2}; WILLIAMSON, DM¹; CLAUZURE, M^{1,2}; KONCURAT, MA¹; BARBEITO, CG^{2,3}

¹Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLPam; ²CONICET; ³Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada. Facultad de Ciencias Veterinarias – UNLP

RESUMEN

Las moléculas de adhesión son indispensables para el anclaje y la adhesión de los epitelios materno y fetal en la placentación porcina. El objetivo fue determinar la inmunolocalización de la integrina $\alpha 5\beta 1$, la laminina y el colágeno V, en placentas porcinas de diferentes períodos de gestación: 30, 60, 70 y 114 días de gestación (dg; n=23). Se determinó la inmunolocalización de las moléculas por inmunohistoquímica. La integrina $\alpha 5\beta 1$ fue fuerte en el tejido conectivo del endometrio y alrededor de vasos sanguíneos en placenta materna y fetal. La laminina se identificó en la interfase feto-materna porcina, a los 30, 60 y 114 dg de forma leve; en cambio, la intensidad de marcación fue fuerte en estroma endometrial, glándulas endometriales, en los vasos sanguíneos y en la membrana basal de las vellosidades a lo largo de toda la gestación. El colágeno V se evidenció con una fuerte intensidad en el mesénquima de las vellosidades placentarias maternas, y alrededor de los vasos sanguíneos en placenta fetal y materna. En base a nuestros resultados, postulamos que la integrina $\alpha 5\beta 1$, la laminina y el colágeno tipo V, podrían cumplir un rol crucial en el desarrollo y el mantenimiento de la arquitectura placentaria y angiogénesis.

Palabras clave: (integrinas), (laminina), (colágeno), (gestación porcina).

Recibido: 15-08-19

Aceptado: 23-12-19

Correspondencia *e-mail*: Claudio G. Barbeito barbeito8@hotmail.com

SUMMARY

Adhesion molecules are essential for anchoring and adhesion during swine placentation in both the maternal and the fetal epithelia. The aim of this work was to determine the expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin and its receptors, laminin and collagen type V, in swine placentas at different gestation intervals: 30, 60, 70 and 114 days of gestation (dg; n = 23). The expression of these molecules was determined by immunohistochemistry. Here we found that the $\alpha 5\beta 1$ integrin was expressed at high levels in endometrial connective tissue and around blood vessels of the maternal and fetal placenta. Laminin was expressed in the swine fetal-maternal interface, at 30, 60 and 114 dg in a mild manner. On the other hand, the expression was strong in endometrial stroma, endometrial glands, blood vessels and basal membrane of the villi throughout pregnancy. Collagen type V was strongly expressed in the mesenchyme villi of the maternal placenta and around the fetal and maternal placenta vessels.

Based on our results, we postulate that $\alpha 5\beta 1$ integrin, and its receptors, could play a crucial role in the development and maintenance of placental architecture and angiogenesis.

Key words: (integrin), (laminin), (collagen), (porcine gestation).

INTRODUCCIÓN

La placenta porcina cumple sus funciones a través de la adhesión entre las membranas fetales y el endometrio, permitiendo el intercambio fisiológico entre el feto y la madre.

En cerdos, debido a su placentación epitelio-corial²⁹, existen procesos de remodelación en diferentes momentos de la gestación¹⁹, que se complementan con cambios en los perfiles de citoquinas²⁴. Estas modificaciones nos permiten postular que las moléculas de adhesión de la interfase feto-materna, pueden modificarse en el transcurso de la preñez. Dentro de estas moléculas de adhesión, las integrinas intervienen en la adhesión célula a célula y conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto de la célula. A través de esta interacción, participan en la adhesión, la migración, la invasión tisular y el control de la fisiología celular, transmitiendo señales de activación metabólica. Conforman una familia de proteínas heterodiméricas que son receptores transmembrana, catión-dependientes, compuestas de dos subunidades: α y β ³.

Diversos estudios sobre la implantación embrionaria en diferentes especies mostraron la participación de las integrinas en los acontecimientos involucrados en la implanta-

ción^{1,2,8,10,12,16}. Se detectaron integrinas en los sitios de fijación durante la implantación temprana en humanos¹⁴, murinos³⁰ y porcinos^{2,11}. En la mujer, se considera a las integrinas como probables marcadores de la receptividad uterina para la implantación del embrión, cuando el útero se encuentra bajo la influencia de la progesterona⁵. Hanashi *et al.*⁹, demostraron que la subunidad de integrina $\beta 1$ participa en la fase final de la implantación en la decidua humana. La integrina $\alpha 5\beta 1$ posee un rol crucial en la implantación de murinos²¹, bovinos¹⁶ y porcinos¹⁸. Sin embargo, no se han hallado estudios de la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la placenta porcina en los períodos posteriores a la implantación.

Los principales ligandos de las integrinas incluyen un gran número de proteínas extracelulares de la matriz, como la fibronectina, la laminina y el colágeno tipo V¹². En el cerdo, se ha estudiado el papel de las integrinas y de sus ligandos de la matriz extracelular (MEC), comparando su expresión en útero no gestante con una preñez temprana a los 10-15 días^{2, 3}; pero no se realizaron estudios en estadios más avanzados de la preñez. Este trabajo tiene como objetivo determinar la inmunolocalización de la integrina $\alpha 5\beta 1$, la laminina y el colágeno

tipo V, en placentas porcinas de diferentes períodos de gestación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 23 tractos reproductivos de cerdas destinadas a faena, entre segundo y tercer parto, mestizas (Landrace x Large White) con períodos gestacionales entre los 30 y 114 días de gestación (dg) y 8 úteros de cerdas no gestantes (NG). Los tractos se obtuvieron de frigoríficos de la zona de General Pico, provincia de La Pampa, Argentina (35° 45' y 63° 50' de latitud y longitud, respectivamente), excepto 8 muestras placentarias de cerdas a término que se tomaron en criaderos de la misma zona, durante el parto. Todos los animales se encontraban en buen estado de salud con plan sanitario completo.

Los tractos reproductivos gestantes (n=23) se obtuvieron de cerdas de 30 dg (n=7), 60 dg (n=4), 70 dg (n=4) y 114 dg (n=8). Se determinó la edad gestacional de acuerdo al promedio de la longitud céfalo-caudal de los embriones/fetos según la tabla desarrollada por Marrable¹⁷. La elección de los días de gestación estudiados estuvo en relación a que en ellos se producen procesos determinantes para una gestación exitosa. A los 30 dg comienza la osificación y el desarrollo del sistema inmunológico⁴. En el período de 60 dg se alcanza el mayor crecimiento placentario y se terminan de formar las vellosidades secundarias y terciarias de la interfase feto-materna⁷. A los 70 dg las placentas inician un estado de meseta en su desarrollo y los fetos comienzan a crecer de manera exponencial, y además, se observa la mayor remodelación placentaria celular⁷. El período a término (114 dg), se escogió porque indica el fin de los mecanismos moleculares involucrados en el mantenimiento de la gestación. Los cuernos uterinos se incidieron por la curvatura mayor. Se recogieron muestras de placenta y úteros no gestantes (NG); que se fijaron en formal bufferado al 10%. Las placentas de 114 dg, fueron obtenidas en el momento del parto. Las muestras fueron procesadas para su inclusión en parafina. Algunos cortes se colorearon con la técnica convencional de la Hematoxilina-Eo-

sina¹⁵ y otros fueron procesados para inmunohistoquímica.

Determinación de integrinas y sus ligandos

Se determinó la inmunolocalización de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y sus ligandos laminina y colágeno V utilizando la técnica de inmunohistoquímica indirecta detallada en el trabajo de Vélez²³ por inmunoperoxidasa con Diaminobencidina como cromógeno. Para la integrina $\alpha 5\beta 1$: se utilizó un anticuerpo de ratón monoclonal, MAB1969 (Chemicon, USA), dilución 1:1500. Para laminina se utilizó un anticuerpo de conejo policlonal (ab11575; Abcam, USA), dilución 1:500; y para colágeno V se utilizó un anticuerpo de ratón monoclonal (NBP1-05118; Novus Biologicals, USA), dilución 1:300. A las muestras se las incubó 20 horas a 4°C. Se utilizó como control positivo cortes de piel de ratón. El control negativo se trató igual que las muestras, sólo que se reemplazó el anticuerpo primario por PBS. Los resultados de las técnicas inmunohistoquímicas se observaron en un microscopio Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) montado con una cámara Canon PowerShot G20 (Tokio, Japón). Se tomaron microfotografías (n=20) a 400X, de cada estructura estudiada (epitelio luminal endometrial, trofoblasto, glándulas y tejido conectivo). La intensidad de marcación de las integrinas y sus ligandos se expresó en forma semicuantitativa como: (-)negativo, (+)leve, (++)moderada y (+++)fuerte.

RESULTADOS

Integrina $\alpha 5\beta 1$

Los resultados de la intensidad de inmunomarcación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en diferentes períodos de gestación se detallan en la Tabla I y se pueden observar en la Figura 1.

Laminina

Los resultados de la intensidad de inmunomarcación de laminina en diferentes períodos de gestación, se detallan en la Tabla II y se pueden observar en la Figura 2.

Tabla I: Expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ sobre diferentes estructuras de la placenta materna y la placenta fetal; en útero no gestante y de diferentes periodos de gestación. NG: útero no gestante. ND: no determinado. +, ++, +++: Diferentes grados de positividad. -: Negativo. *: Coloración en porción apical del trofoblasto. vs: inmunomarcación alrededor de vasos sanguíneos.

Días Gestación (dg)	Placenta materna			Placenta fetal	
	Epitelio endometrial	Epitelio Glandular	Tejido conectivo	Trofoblasto	Mesénquima
NG	-	-	+	ND	ND
30 dg	+	-	+++	++	-
60 dg	-	-	+++	+	+ ^{vs}
70 dg	+	-	+++ ^{vs}	-	-
114 dg	ND	ND	ND	+*	++ ^{vs}

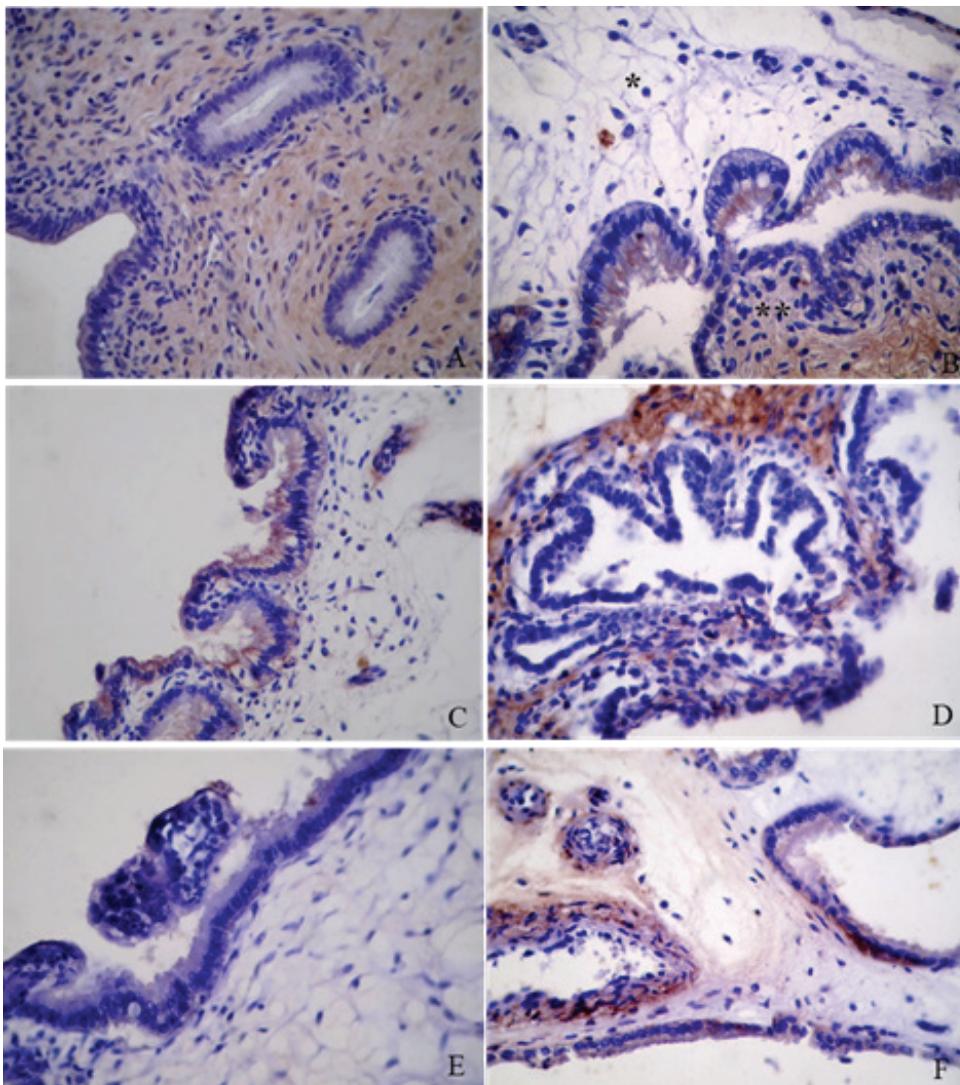


Figura 1. Expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ en la placenta porcina

Tabla II: Expresión de laminina sobre diferentes estructuras en placenta materna y fetal; en útero no gestante y de diferentes periodos de gestación. NG: útero no gestante. +, ++, +++: diferentes grados de positividad. -: Negativo. ND: no determinado. vs: vasos sanguíneos. mb: membrana basal.

Días Gestación (dg)	Placenta materna			Placenta fetal	
	Epitelio endometrial	Epitelio Glandular	Tejido conectivo	Trofoblasto	Mesénquima
NG	-	-	-	ND	ND
30 dg	+	-	+++ ^{vs}	++	+ ^{vs-mb}
60 dg	+	-	+++ ^{mb}	++	+ ^{vs-mb}
70 dg	-	-	++ ^{vs}	-	-
114 dg	ND	ND	ND	++	++

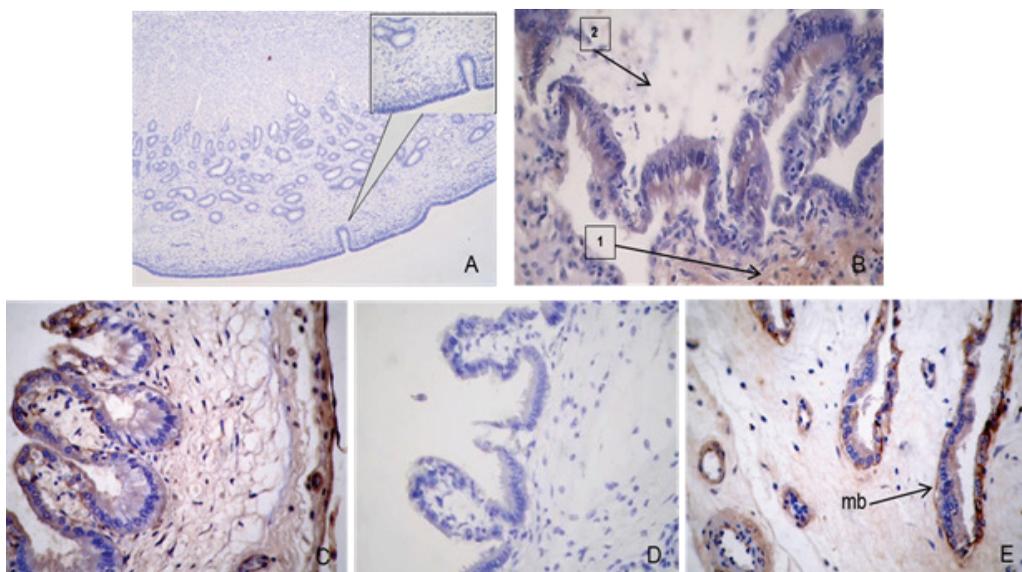


Figura 2. Expresión de laminina en la placenta porcina

Colágeno V

Los resultados de la intensidad de inmunomarcación del colágeno V en diferentes periodos de gestación, se detallan en la Tabla III y se pueden observar en la Figura 3.

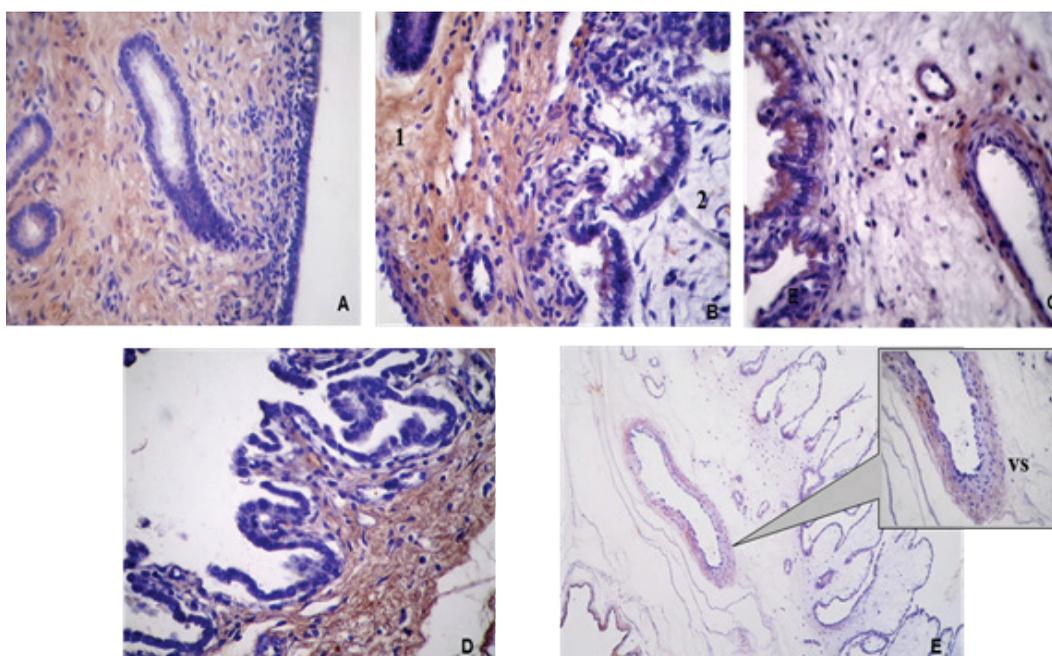
DISCUSIÓN

Este trabajo se realizó con el fin de aportar conocimientos acerca de la fisiología molecular reproductiva porcina. Para que la gestación progrese, es necesario que se establezca una

interacción entre el *conceptus* y el endometrio, que involucra, entre otras moléculas, a las integrinas y sus ligandos, que serían responsables del reconocimiento y anclaje de los epitelios materno y fetal en la interfase placentaria porcina^{26,25}. En trabajos anteriores postulamos que la integrina $\alpha\beta3$, participaría en el desarrollo de la arquitectura de la interfase feto-materna junto a su ligando, la fibronectina^{25,22}; debido a que hallamos estas moléculas fuertemente inmunomarcadas en ambos epitelios luminales en diferentes periodos de gestación.

Tabla III: Expresión de ColIV en diferentes estructuras de placenta materna y fetal; en útero no gestante y de diferentes períodos de gestación. NG: útero no gestante. +, ++, +++: Diferentes grados de positividad. -: Negativo. ND: no determinado. vs: vasos sanguíneos.

Días Gestación (dg)	Placenta materna			Placenta fetal	
	Epitelio endometrial	Epitelio Glandular	Tejido conectivo	Trofoblasto	Mesénquima
NG	-	-	++	ND	ND
30 dg	+	-	++	+	-
60 dg	+	-	++	++	+++ ^{vs}
70 dg	-	-	+	-	++ ^{vs}
114 dg	ND	ND	ND	+	++ ^{vs}

**Figura 3.** Expresión de colágeno V en la placenta porcina

Estudios realizados en porcinos durante la preñez temprana por Rashev *et al.*¹⁸, demostraron que la expresión de $\alpha 5\beta 1$ fue elevada en trofoectodermo, superficie epitelial del endometrio uterino y glándulas endometriales, disminuyendo levemente a los 35 días. La integrina $\alpha 5\beta 1$ es un receptor promiscuo, tanto de fibronectina y fibrinógeno como de colágeno, que participa en la formación de la arquitectura tisular, la vasculogénesis y la angiogénesis^{8,12}. Coincidente con el estudio de Rashev *et al.*¹⁸,

hemos hallado que la integrina $\alpha 5\beta 1$ se presenta con mayor intensidad en la interfase placentaria, a los 30 dg; tanto en la placenta materna como en la fetal. Sin embargo no ha sido evidenciada la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la interfase feto-materna (IFM) durante la gestación porcina en los períodos posteriores a la implantación. En el presente trabajo se observó que, la integrina $\alpha 5\beta 1$ disminuyó, tanto en su intensidad de marcación como en su extensión, en los epitelios que conforman la interfase, a

partir de los 60 dg hasta el período a término. Probablemente se deba a que a partir de los 70 dg la placenta cesa su crecimiento para permitir el aumento de peso de los fetos²⁸. Sin embargo, esta molécula se detectó intensamente en el tejido conectivo del endometrio y alrededor de vasos sanguíneos tanto en la placenta materna como en la fetal, lo que indicaría su posible participación en la angiogénesis en estas etapas de la placentación.

La laminina es el principal componente de la lámina basal, se la ha observado en las membranas basales de las vellosidades de placentas humanas a término²⁰. Estudios realizados en placenta humana y murina en gestación temprana¹³, demostraron que el rol principal de la laminina es el de adhesión de las células epiteliales a la lámina basal, ya que se presenta en el estroma decidual y en la lámina basal de las vellosidades placentarias, en el cordón umbilical, en las glándulas endometriales y en los vasos sanguíneos. Cristofolini *et al.*⁶ observaron neovascularización en gestaciones avanzadas, que estaría relacionada con el máximo crecimiento placentario entre los días 60 y 70, que permitiría un incremento de la superficie de intercambio y del flujo sanguíneo materno/fetal, para sostener la gran demanda metabólica de este período gestacional⁶. En este estudio determinamos la laminina en la IFM porcina, a los 30, 60 y 114 dg de forma leve. Además, en concordancia con los resultados de los autores mencionados, se evidenció una inmunomarcación fuerte en el estroma endometrial, en las glándulas endometriales, en los vasos sanguíneos y en la membrana basal de las vellosidades placentarias tanto maternas como fetales a lo largo de toda la gestación. De este modo la laminina participaría en la angiogénesis y en la adhesión de las células epiteliales de las vellosidades a la lámina basal. Estudios realizados en humanos sugieren que el colágeno V tendría un rol en la implantación, migración y mantenimiento de la interfase durante la gestación, al regular el correcto desarrollo de la matriz extracelular de la decidua¹⁰. Posiblemente, cumpla funciones similares en el porcino, debido a que se expresó intensamente en el mesénquima de

las vellosidades placentarias maternas, y alrededor de los vasos sanguíneos en la placenta fetal y materna. Debido a esto observamos que en la especie porcina el colágeno V también cumple un rol en el mantenimiento de la MEC materna durante la gestación.

En base a nuestros resultados, la integrina $\alpha 5\beta 1$, la laminina y el colágeno tipo V estarían cumpliendo un rol crucial en el desarrollo y mantenimiento de la arquitectura placentaria y angiogénesis.

En trabajos previos demostramos que las integrinas $\alpha v\beta 3$, $\beta 1$, $\alpha 3$ y $\beta 3$ aumentan su expresión a los 5 días de gestación en el endometrio gestante²⁷. Esto supone que la remodelación celular necesaria para el establecimiento y continuidad de la preñez porcina podría deberse a la influencia de los estrógenos, ya que previamente observamos que los picos de estrógenos séricos se correlacionan con la presencia de estas integrinas, tanto en el período de pre-implantación como en el de post-implantación. Debido a esto hallamos que la expresión de las integrinas estudiadas en el útero durante la gestación temprana porcina acompaña la presencia de los estrógenos, secretados principalmente por el componente placentario fetal^{22,27}.

En base a nuestros resultados, postulamos que la integrina $\alpha 5\beta 1$, la laminina y el colágeno tipo V, podrían cumplir un rol crucial en el desarrollo y el mantenimiento de la arquitectura placentaria y angiogénesis. Es necesario continuar con los estudios de las moléculas de adhesión y los ligandos que permitirían la construcción de la interfase feto-materna no invasiva de la especie porcina. Ya que son diversas las moléculas que estarían presentes, tomando un rol fundamental de adhesión y mantenimiento de la arquitectura placentaria, en los períodos donde las moléculas aquí estudiadas no se encuentran presentes, o su inmunomarcación es leve.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bazer, F.W.; Johnson, G.A. Pig blastocyst–uterine interactions. *Differentiation*. 2014;87:52–65.
2. Bowen, J.A.; Bazer, F.W.; Burghardt, R.C. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo. *Biol Reprod*. 1996;55(5):1098-106
3. Bowen, J.A. and Hunt, J.S. The role of Integrins in Reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000;223:331-43.
4. Butler, J.E.; Lager, K.M.; Splichal, I.; *et al.* The piglet as a model for B cell and immune system development. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;128(1–3):147–70.
5. Carson, D.D.; Bagchi, I.; Dey, S.K.; *et al.* Embryo implantation. *Dev Biol*. 2000;223:217-37.
6. Cristofolini, A.; Fiorimanti, M.; Campos, M.; *et al.* Morphometric study of the porcine placental vascularization. *Reprod Dom Anim*. 2018;53:217–25.
7. Cristofolini, A.; Sanchis, G.; Moliva, M.; *et al.* Cellular remodelling by apoptosis during porcine placentation. *Reprod Dom Anim*. 2013; 48, 584–90.
8. Francis, S.E.; Goh, K.L.; Hodivala-dilke, K.; *et al.* Central roles of $\alpha 5\beta 1$ Integrin and Fibronectin in Vascular Development in Mouse Embryos and Embryoid Bodies. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2002;22:927–33.
9. Hanashi, H.; Shiokawa, S.; Akimoto, Y.; *et al.* Physiologic Role of decidual beta1 integrin and focal adhesion kinase in embryonic implantation. *Endocr J*. 2003;50(2):189-98.
10. Iwahashi, M.; Nakano, R. Decreased type V collagen expression in human decidual tissues of spontaneous abortion during early pregnancy. *Clin Pathol*. 1998;51:44–6.
11. Jaeger, L.A.; Johnson, G.A.; Ka, H.; *et al.* Functional analysis of autocrine and paracrine signaling at the uterine-conceptus interface in pigs. *Reprod Suppl*. 2001; 58: 191-207.
12. Jimenez-Marín. Caracterización Molecular de las Integrinas Beta-1 (Cd29) y Beta-3 (Cd61) Porcinas. Obtención de Anticuerpos contra dominios específicos de ambas moléculas. Tesis doctoral. UNC. 2002.
13. Kaloglu, C.; Onarlioglu, B. Extracellular matrix remodelling in rat endometrium during early pregnancy: The role of fibronectin and laminin. *Tissue Cell*. 2010;42(5):301–06.
14. Kou, S.; Naoaki, K.; Shigetatsu, S.; Mamoru, T.; Toyohiko, M. Integrins and reproductive physiology: Expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. *Fertil Steril*. 1997;67(5):799–811.
15. Luna, L. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces. New York. Toronto. McGraw-Hill. 1968. 40 p.
16. MacLaren, L.A.; Wildeman, A.G. Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localization of the alpha 5 and beta 1 integrin subunits in bovine trophoblast. *Biol Reprod*. 1995;53(1):153–65.
17. Marrable, A.W. The Embryonic Pig: A Chronological Account. Ed. Pitman Medical Exe-ter. London. 1971.
18. Rashev, P.; Georgieva, D. Expression of $\alpha 5\beta 1$ Integrin and Fibronectin during Early Pregnancy in Pigs. *Folia Biologica(Praha)* 2005;51:121-25.
19. Sanchis, E. G. ;Cristofolini, A.L.;Fiorimanti, M.R.; Barbeito, C.G.; Merkis, C.I. Apoptosis and cell proliferation in porcine placental vascularization. *Animal Reproduction Science*. 2017;184:20–28.
20. Shan, N.; Zhang, X.; Xiao, X.; *et al.* Laminin $\alpha 4$ (LAMA4) expression promotes trophoblast cell invasion, migration, and angiogenesis, and is lowered in preeclamptic placentas. *Placenta*. 2015;4:1–12.
21. Sutherland, A.E.; Calarco, P.G.; Damsky, C.H. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development*. 1993;119(4):1175–86.
22. Vélez, C.; Barbeito, C.; Koncurat, M. $\alpha \beta 3$ Integrin and fibronectin expressions and their relation to estrogen and progesterone during placentation in swine. *Biotechnic & Histochemistry*. 2018; 93:1, 15-24.
23. Vélez, C. Integrinas y su regulación por el sistema inmune durante la placentación porcina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. 2017.
24. Vélez, C.; Barbeito, C.G.; Koncurat, M.A. IL-1 β , IL-2 and IL-4 concentration during porcine gestation. *Theriogenology*. 2019;128:133-39.
25. Vélez, C.; Williamson, D.; Koncurat, M. Detection of fibronectin during porcine placentation. *Arch Latinoam Prod Anim*. 2014;22(1):31–36.
26. Williamson, D.M.; Koncurat, M.A. Expresión de la integrina $\alpha \beta 3$ y de las subunidades de integrinas $\alpha 3$ y $\beta 1$ durante la placentación porcina. *In Vet*. 2009;11(1):31-7.

27. Williamson, D.M.; Yaful, G.N.; Riesco, O.E.; Koncurat, M.A. Progesterona, Estrógenos y Expresión de Integrinas en la Gestación Temprana Porcina. *Ciencia Veterinaria*. 2008;10(1):13-23.
28. Wilson, M.E.; Ford, S.P. Comparative aspects of placental efficiency. *Reprod Suppl*. 2001;(58):223-232.
29. Wooding, P.; Burton, G. Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution. Cambridge, United Kingdom, Ed. Springer, 2008, p. 105-14.
30. Wu, J.E.; Santoro, S.A. Complex patterns of expression suggest extensive roles for the alpha 2 beta 1 integrin in murine development. *Dev Dyn*. 1994;199(4):292-314.

Estudio de transferencia de inmunidad en crianzas artificiales de terneros en la cuenca lechera santafecina

Immunity transfer study in an artificial rearing system of calves in the dairy region of Santa Fe

AGUIRRE, F.¹; GUTMAN, D.³; MORONI, C.²; ROLLÓN, N.³; ALLASSIA, M.²; CATTANEO, L.⁴; RUIZ, MF.¹

¹Laboratorio de Análisis Clínicos, Hospital de Salud Animal (HSA), Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional del Litoral (UNL). ²Prácticas Hospitalarias de Grandes Animales, HSA, FCV, UNL. ³Actividad privada. ⁴Biotecnología de la Reproducción, FCV, UNL

RESUMEN

El ternero recién nacido depende de la inmunidad pasiva adquirida a través del consumo de calostro para hacer frente a los patógenos presentes en las crianzas. En el presente trabajo se propuso cuantificar la eficiencia de transferencia de inmunidad en terneros de 10 tambos comerciales de la provincia de Santa Fe y relacionar dicho resultado con la mortalidad. Se recibieron 2418 muestras de sangre de animales a los cuales se determinó por refractometría la concentración de proteínas séricas (indicador indirecto de transferencia de inmunidad). El 57,4% de los animales resultó con calostrado “bueno” (Grupo A: $\geq 5,5$ g/dl), el 22,7% tuvo calostrado “medio” (Grupo B: ≥ 5 g/dl y $< 5,5$ g/dl) y un 19,8% obtuvo calostrado “malo” (Grupo C: <5 g/dl). Los terneros con calostrado “malo” tuvieron 3,14 veces más probabilidades de morir antes de los 60 días de edad que los animales con calostrado “bueno”. No se observó que las crías de vacas primíparas o aquellas que nacieron producto de un parto distócico tengan resultados de calostrados menores.

Palabras clave: (calostrado), (terneros), (Santa Fe).

Recibido: 12-12-18

Aceptado: 25-11-19

Correspondencia *e-mail*: Fabián Aguirre faguirre@fcv.unl.edu.ar

SUMMARY

The new-born calf depends on the passive immunity acquired through the consumption of colostrum to fight against pathogens present in the environment. In this study we proposed to quantify the efficiency of the immunity transfer through colostrum in calves in commercial dairies in Santa Fe province and to correlate the results to mortality. Serum samples from 2418 animals were assessed for proteins by means of a refractometer (indirect indicator of immunity transference). 57,4% of animals resulted with “good” immunity transfer (group A: $\geq 5,5$ g/dl), 22,7% had a “medium” transfer (group B: ≥ 5 g/dl and $< 5,5$ g/dl) and 19,8% had a “poor” immunity transfer (group C: < 5 g/dl). Calves with “poor” immunity transfer had 3,14 times more probabilities to die before 60 days old than animals with a “good” colostrum. We did not notice that calves from primiparus cows or those born from a dystocic parturition had less immunity transfer results. More research is needed to evaluate other variables that could influence calf mortality in artificial rearing systems.

Keywords: (colostrum), (calves), (Santa Fe).

INTRODUCCIÓN

En la vaca gestante la circulación sanguínea maternal y la fetal se encuentran completamente separadas⁸, por lo tanto no existe transferencia de inmunoglobulinas a través de la placenta desde la madre al feto. El ternero nace con un estado inmunológico deficiente para hacer frente a los diferentes organismos patógenos a los cuales es expuesto a lo largo de su crianza²⁰. El neonato debe adquirir inmunidad pasiva a través del consumo de calostro. El calostro es la primera secreción de la glándula mamaria luego del parto. El mismo posee el doble de sólidos, tres veces más minerales y cinco veces más proteínas que la leche entera. Además, es más rico en energía y en vitaminas. A pesar de su alto valor nutricional, su principal función es proveer los anticuerpos necesarios para proteger a los terneros recién nacidos de diversas infecciones que pueden causar enfermedad y muerte¹⁶. Además de las inmunoglobulinas, se han identificado un gran número de componentes inespecíficos que juegan un rol muy importante en el desarrollo de inmunidad del animal⁵.

En caso que el ternero no pueda consumir en forma eficiente cantidades adecuadas de calostro puede sufrir una falla de transferencia de inmunidad (FTI). Estos animales están pre-

dispuestos a padecer diferentes enfermedades aumentando el riesgo de mortalidad en las primeras semanas de vida⁴.

Existen diferentes factores que predisponen a la falla de transferencia de inmunidad. Uno de ellos está relacionado con la producción de calostro de mala calidad por parte de las vacas¹⁴. Muchos autores sostienen que las vacas primíparas producen menos cantidad y calidad de calostro¹⁸.

Otro factor que adquiere gran impacto es el consumo inadecuado del calostro, en donde la cantidad adquirida y el momento en el que el ternero lo obtiene son factores que influyen en gran medida en la eficiencia de la absorción de los anticuerpos². Las prácticas de manejo como el calostrado inducido y el almacenamiento en un banco de calostro son de mucha importancia para favorecer dicha eficiencia¹⁸.

Drewry *et al.*⁷ hallaron que los terneros que nacen producto de un parto distócico tienen disminuida su capacidad de absorción de inmunoglobulinas debido a que la elevación de la tensión de dióxido de carbono arterial acelera el “cierre intestinal”.

Diferentes autores han relacionado la deficiencia en la transferencia de inmunidad con aumentos en la morbilidad y mortalidad de los terneros, atribuyendo al correcto manejo del

calostrado como uno de los puntos más importantes^{8,19}. Adicionalmente, es probado que el desempeño futuro de las terneras (crecimiento, consumo de alimento, resistencia a enfermedades, edad al primer parto) es profundamente afectado por las condiciones alcanzadas por el sistema inmunológico en las primeras 24 horas de vida¹³.

La estimación del grado de transferencia de inmunidad pasiva a los animales recién nacidos brinda valiosa información sobre el desempeño y evolución de una crianza, siendo una herramienta fundamental para el monitoreo y seguimiento de la misma⁶.

La FTI en terneros puede ser identificada usando diferentes técnicas. Las mismas se clasifican en métodos directos e indirectos. Los métodos indirectos son de tipo estimativo o de correlación, éstos valoran la concentración sérica de IgG en base a la concentración de globulinas totales u otras proteínas cuya transferencia pasiva está estadísticamente asociada con la de IgG. Entre los métodos indirectos más utilizados se encuentran la medición de proteínas totales séricas por refractometría, por método de biuret, prueba de turbidez de sulfito de sodio, prueba de turbidez del sulfato de zinc, actividad gamma glutamil transpeptidasa sérica (GGT), electroforesis y prueba de glutaraldehído. Por otra parte, entre los métodos directos se cuenta con la inmunodifusión radial (IDR) y el ensayo inmunoenzimático enzima vinculada (ELISA) conocidos como los únicos test que miden directamente las concentraciones séricas de IgG²⁰.

Uno de los métodos para detectar animales con FTI más prácticos para ser utilizados a campo, es la estimación de proteínas totales séricas mediante refractometría¹. Este método tiene una correlación por encima de 0.84 con la IDR¹⁵.

Si bien, se conoce de la importancia del eficiente calostrado para la supervivencia de las crías¹⁸, existen pocos estudios que analicen la situación actual de transferencia de inmunidad pasiva en las unidades de crianza artificial de terneros de tambos comerciales de Argentina.

Por su parte, la provincia de Santa Fe no está alejada de esta situación. A la vez, existen pocos trabajos que relacionen la mortalidad de los animales con la FTI y que analicen los diferentes factores de riesgo que la predisponen.

Los objetivos del presente estudio fueron: A) Cuantificar la situación en la que se encuentran las crianzas de terneros en establecimientos lecheros de la provincia de Santa Fe en referencia a la transferencia de inmunidad. B) Relacionar la FTI con la mortalidad de los animales. C) Estudiar la relación del calostrado con factores de riesgo como la edad de la madre y el tipo de parto.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue llevado a cabo durante los años 2014 y 2015. En dicho período, el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral recibió muestras de sangre de terneros para estudios de transferencia de inmunidad derivadas por Médicos Veterinarios que trabajaban en actividad privada asesorando crianzas artificiales en tambos comerciales ubicados en el departamento Castellanos de la provincia de Santa Fe. Las muestras consistían en sangre entera sin anticoagulante en tubos de Kahn las cuales provenían de animales de edades comprendidas entre 24 horas y 7 días de vida, rotuladas con el número de identificación de cada ternero.

De las mismas, se determinó la concentración de proteínas séricas mediante refractometría. Según el resultado, se clasificaba a los animales en tres categorías: A- “bien calostrados” ($\geq 5,5$ g/dl), B- “calostrado regular” (≥ 5 g/dl y $< 5,5$ g/dl) y C- “mal calostrados” (< 5 g/dl)¹². Se analizaron un total de 2.418 muestras de 10 establecimientos de producción lechera, los cuales presentaban diferencias en tamaño (cantidad de animales) diferentes tipos de manejos reproductivos (pariciones estacionadas y continuas), sistemas de crianza de terneros (individuales o colectivos) al igual que la cantidad de personal a cargo y manejo de los terneros recién nacidos.

Las características intrínsecas de cada rodeo no fueron tenidas en cuenta en este trabajo.

La información adicional solicitada a los profesionales responsables de la remisión de las muestras, fue: tipo de parto (normal o distócico) y número de lactancia de la madre (primípara o múltipara). A posteriori se corroboró si el animal había sobrevivido o no durante el periodo de crianza (se estableció el período de estudio hasta los 60 días de edad).

El análisis estadístico se realizó con el programa R Project for Statistical Computing (www.r-project.org). Se realizó un modelo de regresión logística relacionando la FTI (calostrado “malo”) con las variables “establecimiento”, “tipo de parto” (parto normal o parto con ayuda) y “edad de la madre” (primípara o múltipara). Por otro lado, se realizó un segundo modelo de regresión logística relacionando la supervivencia de los terneros (muerto o vivo) con respecto al calostrado (“bueno”, “medio” o “malo”), al “establecimiento”, al “tipo de parto” y “edad de la madre”. El valor de α adoptado fue 0.05.

RESULTADOS

Los resultados del análisis por refractometría mostraron la siguiente distribución: en la categoría “A” el 57,4% de los animales, dentro de la categoría “B” el 22,7% y en la categoría “C” el 19,8%. Se registró una mortalidad en los terne-

ros muestreados (desde el nacimiento hasta los 60 días de edad) del 7,73% (187/2.418). En el siguiente gráfico se observa la mortalidad registrada en cada uno de los grupos (ver Figura 1).

Al realizar el análisis de regresión logística, no se observó que el tipo de parto ni la edad de la madre (primípara o múltipara) tengan relación con la FTI ($p > 0,05$). A la vez, ninguno de estas dos variables tuvieron asociadas con la muerte del ternero en la crianza ($p > 0,05$). En un segundo modelo, se observó que el calostrado tiene relación estadísticamente significativa con la muerte o supervivencia de los animales ($p < 0,05$) y que aquellos con calostrado “malo” tuvieron 3,14 veces más probabilidades de morir antes de los 60 días de edad que los animales con calostrado “bueno” (Odds ratio: 3,14; IC 95%= 2,2 - 4,45). En dicho modelo se observó también la que variable “establecimiento” tuvo relación estadísticamente significativa teniendo influencia en la mortalidad de los terneros.

DISCUSIÓN

Este estudio es relevante ya que existe muy poca información en la zona y en nuestro país al respecto. Teniendo en cuenta el criterio de algunos autores^{8,10}, los resultados de los análisis de calostrado al igual que los niveles de mortalidad de los tambos de la región no son óptimos, encontrándose por encima de los límites reco-

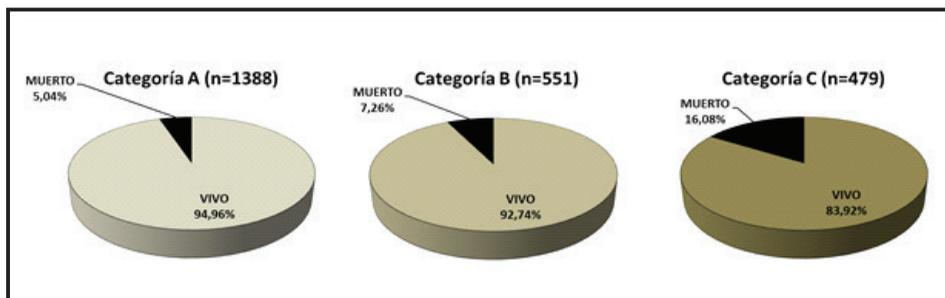


Figura 1. Mortalidad registrada en cada grupo formado de acuerdo al resultado del análisis de proteínas totales.

mendados. Existe controversia con respecto a los criterios a tener en cuenta en la selección de los animales a muestrear para la evaluación de la transferencia de inmunidad. Uno de los puntos en los que hay mayor discusión es en la edad que debe tener el ternero para que el resultado del análisis sea válido. Quigley *et al.* sostienen que los animales deben tener entre 24 horas y 3 días de edad para ser muestreados¹⁵. Por el contrario, Patel *et al.* indican que las mediciones realizadas dentro de la primera semana de vida tienen resultados similares¹¹. En este estudio, por cuestiones de practicidad, los profesionales muestreaban a los animales mayores de 24 horas y menores a 7 días de edad.

Diferentes autores utilizan distintos puntos de corte para identificar animales mal calostrados^{3,19}. En este sentido, han encontrado una alta sensibilidad y especificidad en el rango de 5 a 5,4 g/dl de proteínas séricas. En este estudio se utilizó el criterio recomendado por Quigley¹² clasificando los animales en tres categorías: calostrado bueno, calostrado regular y calostrado malo.

Estudios previos han relacionado la deficiencia en la transferencia de inmunidad con la mortalidad de los terneros^{17,19}. Tyler *et al.* detectaron que los animales con FTI tuvieron 4,6 veces mayor probabilidad de morir que los terneros con calostrado correcto medido por refractometría¹⁹. Del mismo modo, Rea *et al.* observaron que los animales mal calostrados tenían 2,6 veces más probabilidades de morir que los bien calostrados¹⁷. En el presente trabajo se observaron resultados que están en consonancia con dichos estudios.

Se estudió también la asociación con diferentes factores que predisponen a la FTI citados en la bibliografía^{7,18}. Si bien está documentado que las vacas primíparas secretan calostro de menor calidad aumentando el riesgo de que los terneros no absorban suficientes inmunoglobulinas¹⁸, en este trabajo no se encontró que la edad de la madre tenga relación con el resultado del calostrado. Este efecto pudo haber estado enmascarado por el hecho de que en

algunos establecimientos muestreados emplean la técnica de calostrado inducido y el uso de banco de calostro que compensaría en muchos casos las deficiencias de producción de calostro de calidad de algunos animales. Esto fue también documentado por Lora *et al.* quienes tampoco han encontrado asociación entre la FTI y la cantidad de partos de la madre.⁹

En el presente estudio, a diferencia de lo registrado por Drewry *et al.*⁷, no se observaron indicios de que los terneros nacidos por medio de un parto distócico tengan mayores probabilidades de sufrir falla de transferencia de inmunidad. Resultados similares fueron observados por Lora *et al.*⁹. Esto podría deberse a la mayor facilidad de las tareas de recolección y suministro de calostro cuando la vaca es encerrada para su atención durante el parto, aumentando de esta forma la posibilidad de que el ternero reciba en forma rápida su toma luego del nacimiento.

Al observarse una asociación significativa entre la variable “establecimiento” y la mortalidad de los terneros, se asume que las particularidades de cada crianza influyen de manera considerable en la supervivencia de los animales. Factores como el manejo sanitario, los recursos humanos disponibles en el establecimiento, así como la contaminación ambiental que son propios de cada sistema productivo y que no fueron tenidos en cuenta en este trabajo pudieran tener mayor importancia que el calostrado.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio permitieron mostrar la situación en cuanto a la transferencia de la inmunidad pasiva en los terneros de los sistemas de crianza artificial de la región. Se confirmó además la importancia del correcto calostrado para la supervivencia de los animales y la necesidad de seguir trabajando en este punto para lograr parámetros aceptables de mortandad en las crianzas. De todas formas, en este trabajo solamente se analizaron algunos

pocos factores intervinientes. Esta visión acotada no permite interpretar en forma correcta la problemática, por lo cual se necesitan más estudios que aborden en forma sistémica y multidisciplinar a las unidades de crianza artificial de terneros de la región.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arthington, J.D.; Cattell, M.B.; Quigley, J.D. Effect of dietary IgG source (colostrum, serum, or milk-derived supplement) on the efficiency of IgG absorption in newborn Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 83: 2000. 1463-1467.
2. Beam, A.L.; Lombard, J.E.; Koprál, C.; Garber, L.P.; Winter, A.L.; Hicks, J.A.; Schlater, J.L. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *Journal of Dairy Science* 2009. 92: 3973–3980.
3. Calloway, C.D.; Tyler, J.W.; Tessman, R.K.; Hostetler, D.; Holle, J. Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum transfer status in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 2002. 221, 1–4.
4. Chigerwe, M.; Tyler, J.W.; Summers, M.K.; Middleton, J.R.; Schultz, L.G.; Nagy, D.W. Evaluation of factors affecting serum IgG concentrations in bottle-fed calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 2009. 234: 785–789.
5. Davis, C.L.; Leibaschoff, V.; Drackley, J.K.; Tomkins, T. *Desarrollo, nutrición y manejo del ternero joven.* Ed Intermédica. 2001. Buenos Aires.
6. Deelen, S.M.; Ollivett, T.L.; Haines, D.M.; Leslie, K.E. Evaluation of a brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *J Dairy Sci.* 2014. 97:3838-3844.
7. Drewry, J.; Quigley, J.; Geiser, D.R.; Welborn, M.G. The effect of elevated arterial carbón dioxide tensión on efficiency of immunoglobulin G absorption in calves. *A.M.J. Vet. Res.* 1999.60: 609-614.
8. Godden, S. Colostrum management for dairy calves. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* 2008. 24: 19–39.
9. Lora, I.; Barberio, A.; Contiero, B.; Paparella, P.; Bonfanti, L.; Brscic, M.; Stefani, L.; Gottardo, F. Factors associated with passive immunity transfer in dairy calves: combined affect of delivery time, amount and quality of the first colostrum meal. *The Animal Consortium.* 2017. 1-9.
10. McGuirk, S. Herd-based problem solving: Failure of Passive Transfer. Food animal production medicine, University of WI School of Veterinary Medicine. 2010. En: https://www.vetmed.wisc.edu/dms/fapm/fapmtools/8calf/calf_herd_FPT_Troubleshooting.pdf
11. Patel, S.; Gibbons, J.; Wathes, D.C. Ensuring optimal colostrum transfer to new-born dairy calves. *Cattle Practice.* 2014. Volume 22, Part 1, p95-104
12. Quigley, J. Notes about calves #39, using the refractometer. Calf notes.com by Dr. Jim Quigley. 1999. En: <http://www.calfnotes.com>.
13. Quigley, J.; Drewry, J. Nutrient and immunitytransfer from cow to calf pre- and post-calving. *J. Dairy Sci.* 1998. 81: 2779–2790.
14. Quigley, J., Lago, A.; Chapman, C.; Erickson, P.; Polo, J. Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science.* 2013. 96: 1148–1155.
15. Quigley, J.; Kost, C.J.; Wolfe, T.M. Absorption of protein and IgG in calves fed a colostrum supplement or replacer. *Journal of Dairy Science* 2002. 85: 1243–1248.
16. Rajala, P.; Castrén, H. Serum immunoglobulin concentration and health of dairy calves in two management systems from birth to 12 weeks of age. *Journal Dairy Science.* 1995. 78: 2737-44.
17. Rea, D.E.; Tyler, J.W.; Hancock, D.D; Besser, T.E.; Wilson, L.; Krytenberg, D.S.; Sanders, S.G. Prediction of calf mortality by use of tests for passive transfer of colostrum immunoglobulins. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1996. 208, 2047-2049.
18. Redman, D.R. Prenatal influence on immunocompetence of the neonate. *J. Anim. Sci.* 1979. 49: 258–267.
19. Tyler, J.W.; Hancock, D.D; Parish, S.M. Evaluation of 3 assays for failure of passive transfer in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 1996. 10, 304–307.

20. Weaver, D.M.; Tyler, J.; VanMetre, D.J.; Hostetler, D.; Barrington, G. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2000. 14: 569–577.

Detección de la garrapata exótica *Amblyomma varanense* (Acari: Ixodidae) en especímenes importados de *Varanus salvator* (Squamata: Varanidae) en la Argentina

Exotic tick *Amblyomma varanense* (Acari: Ixodidae) in imported specimens from *Varanus salvator* (Squamata: Varanidae) in Argentina

CICUTTIN, GL.¹; WIEMEYER, G.^{2*}; PÉREZ, MA.^{2*}; GUGLIELMONE, AA.³; NAVA, S.³

¹Instituto de Zoonosis Luis Pasteur- Ministerio de Salud- Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Av. Díaz Vélez 4821 C1405DCD CABA. ²Jardín Zoológico de la Ciudad de Buenos Aires. República de la India 3000 CP 1425, CABA, Argentina. ³Filiación actual: Ecoparque Buenos Aires. República de la India 3000 CP 1425, CABA, Argentina. *Filiación actual: Estación Experimental Agropecuaria Rafaela y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CC 22, CP 2300 Rafaela, Santa Fe, Argentina.

RESUMEN

La importación de animales vivos, especialmente reptiles, ha contribuido al transporte e introducción de garrapatas exóticas en muchas regiones del mundo. Se describe el hallazgo de 11 especímenes (un macho, dos hembras y ocho ninfas) de *Amblyomma varanense* colectados de dos varanos acuáticos (*Varanus salvator*) importados legalmente desde Jakarta, Indonesia.

Amblyomma varanense es una garrapata distribuida en las regiones zoogeográficas Oriental y de Australasia, y *V. salvator* se encuentra entre los principales hospedadores.

Es necesario prevenir la introducción de garrapatas exóticas y microorganismos asociados, poniéndose en evidencia el riesgo que conlleva la importación de vertebrados exóticos.

Palabras clave: (garrapata), (varano), (Argentina).

Recibido: 24-03-19

Aceptado: 18-09-19

Correspondencia *e-mail*: Gabriel Cicuttin gicuttin@gmail.com

SUMMARY

The importation of live animals, especially reptiles, has contributed to the transport and introduction of exotic ticks in many regions of the world. We describe the finding of 11 specimens (one male, two females and eight nymphs) of *Amblyomma varanense* collected from two common water monitors (*Varanus salvator*) legally imported from Jakarta, Indonesia.

Amblyomma varanense is a tick distributed in the Eastern and Australasian zoogeographic regions, and *V. salvator* is among the main hosts.

It is necessary to prevent the introduction of exotic ticks and associated microorganisms, highlighting the risk involved in the importation of exotic vertebrates.

Key words: (tick), (monitor), (Argentina).

INTRODUCCIÓN

El comercio de animales exóticos puede transportar una importante cantidad de organismos asociados, con potencial de infestar e infectar nuevos hospedadores en el país de destino (humanos, animales domésticos y silvestres) y ser un potencial riesgo para la salud humana y animal. Las garrapatas están entre los parásitos más comúnmente reportados en el comercio internacional de animales; especialmente para el caso de reptiles vivos, que contribuyeron a la introducción de garrapatas exóticas en todo el mundo y a la potencial dispersión de patógenos asociados². Por ejemplo en Estados Unidos y Reino Unido se ha reportado la introducción de numerosas especies de garrapatas exóticas pertenecientes a los géneros *Ornithodoros*, *Amblyomma*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* con la importación de vertebrados, mayormente reptiles^{1-4,10,12,13,17,19,21}. Asimismo, diferentes microorganismos potencialmente patógenos también fueron detectados en garrapatas exóticas introducidas con reptiles^{1,3,13}.

En Sudamérica existen algunos registros de introducción de garrapatas exóticas por reptiles importados. *Amblyomma argentiniae* fue detectada en tortugas terrestres argentinas importadas a Chile y Uruguay, *Amblyomma rotundatum* fue hallada en el Jardín Zoológico de Montevideo (Uruguay) sin determinarse el hospedador, una especie desconocida de *Amblyomma* (citada como *Aponomma*) fue encontrada en Argentina en

una serpiente *Python molurus* procedente de Asia y, por último, *Amblyomma latum* fue detectada en serpientes (*Python regius*) importadas a Chile, Argentina y Uruguay^{7,26}, para citar algunos ejemplos recientes para el sur del continente.

En Argentina, la importación de animales implica el cumplimiento de un certificado veterinario internacional acordado especialmente entre las autoridades de sanidad agroalimentaria de cada país de origen y la de el receptor (para el caso de Argentina el Servicio Nacional de Sanidad Agroalimentaria, SENASA). En el caso puntual de importación de reptiles, la resolución N° 49/2008 de SENASA, solicita la inspección del reptil por un veterinario oficial del país exportador dentro de las 72 h previa a su importación, enfocándose en signos de enfermedades infectocontagiosas (en especial salmonelosis) y/o parasitarias de interés cuarentenario; la única mención en dicha resolución sobre ectoparásitos se refiere al ácaro *Ophionyssus natricis* (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria 2008).

En esta comunicación se describe la introducción de una especie de garrapata exótica en reptiles importados legalmente a la Argentina desde Jakarta, Indonesia.

MATERIALES Y MÉTODOS

En septiembre de 2014, el Zoológico de Buenos Aires recibió 4 ejemplares de varano

acuático (*Varanus salvator*) para ser integrados a una exhibición ambulante montada de manera transitoria en el parque con motivo de las vacaciones de invierno. Los animales fueron admitidos al país seis días antes, como parte de un lote de 919 reptiles importados legalmente desde Jakarta, Indonesia con certificación veterinaria que declaraba al establecimiento de origen “libre de enfermedades de interés cuarentenario y que puedan ser vehiculizadas por las especies importadas, habiendo recibido tratamiento contra parásitos externos e internos que garantice una condición sanitaria satisfactoria”.

Al examen clínico los cuatro varanos presentaron un mal estado general con severo deterioro de la salud. Entre los cuadros identificados se registraron necrosis de falanges distales y amputación de dedos, fracturas, tumefacción articular compatible con artritis séptica, endoparásitos (exámenes compatibles con huevos de cestodes sin identificar), ectoparásitos, anemia, heterofilia, hiperuricemia, e hipoalbuminemia. Se colectaron 11 garrapatas a partir de dos ejemplares.

Los dos animales afectados por ectoparásitos murieron durante los primeros 30 días, mientras que los restantes debieron recibir tratamiento multimodal y una vez estabilizados fueron devueltos al importador por considerarlos un riesgo para el plantel animal de la institución receptora.

Las muestras de ectoparásitos fueron conservadas en etanol al 70% hasta su procesamiento en el Laboratorio de Inmunología y Parasitología del INTA Rafaela, donde las garrapatas fueron determinadas a nivel específico con las descripciones morfológicas y claves dicotómicas presentadas en Kaufman¹¹, Sharif²², Durden y Beati⁶ y Pun *et al*²⁰.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las garrapatas fueron identificadas como pertenecientes al género *Amblyomma*, subgénero *Aponomma*, de acuerdo a Durden y Beati⁶. En total se identificaron un macho, dos hembras y ocho ninfas de *Amblyomma varanense* (Figuras 1 y 2) en base a las descripciones

y claves de Kaufman¹¹ para adultos (mencionada como *Aponomma varanense*, actualmente sinónimo de *Am. varanense*⁸) y de Sharif²² para ninfas (mencionada con el nombre de *Aponomma gervaisi lucasi*, actualmente sinónimo de *Am. varanense*⁸). *Amblyomma varanense* fue tradicionalmente incluida dentro del género *Aponomma*, pero en la actualidad existe amplio consenso de su pertenencia al género *Amblyomma*^{8,9,15}. Morfológicamente el macho se caracteriza por un contorno corporal sub-circular, ojos y surco marginal ausentes, puntuaciones numerosas, ornato del escudo con cinco manchas de coloración metálica amarillenta-verdosa (dos posteriores, dos laterales, y una en posición antero-central, ninguna en el área escapular), cornua pequeña y redondeada, festones conspicuos, dentición del hipostoma 3/3, coxa I con dos espinas cortas y redondeadas (la externa más larga que la interna), y coxas II-III con una espina central bien marcada más ancha que larga. La diagnosis morfológica de la hembra se basa en la combinación de los siguientes caracteres: ojos ausentes, ornato del escudo caracterizado por tres manchas (dos en el área escapular, y una en el área central), cornua pequeña y redondeada, áreas porosas sub-ovales separadas por un área con un diámetro mayor al de cada área porosa, dentición del hipostoma 3/3, superficie ventral cubierta por setas, coxa I con dos espinas cortas y redondeadas (la externa más larga que la interna), y coxas II-III con una espina central bien marcada más ancha que larga. La ninfa se caracteriza por un capítulo sub-rectangular con cornuas pequeñas, hipostoma con dentición 2/2, ojos ausentes, márgenes laterales del escudo con una leve concavidad y margen posterior apenas redondeado, coxa I con dos espinas cortas bien conspicuas, sub-iguales y redondeadas, y coxas II-III con una espina de posición central. Los especímenes están depositados en la Colección de Garrapatas del INTA Rafaela (INTA 2415).

Morfológicamente, los adultos de *Am. varanense* son similares a los de *Amblyomma gervaisi*. *Amblyomma varanense* posee dos espinas conspicuas en la coxa I, de las cuáles la externa es más larga que la interna, mientras



Figura 1. Macho de *Amblyomma varanense*. Vista dorsal.



Figura 2. Hembra de *Amblyomma varanense*. Vista dorsal.

que en *Am. gervaisi* la espina interna es apenas visible y está fusionada a la externa, dando la apariencia de tener una sola espina sobre la coxa I^{11,20}. Estas dos especies también se diferencian por el ornato del escudo de los machos. *Amblyomma gervaisi* posee dos manchas en el área el área escapular, pero las mismas están ausentes en *Am. varanense*. La presencia de dos espinas conspicuas en la coxa I de la ninfa de *Am. varanense* permite diferenciarla de la ninfa de *Am. gervaisi*, en la cual solo es conspicua una sola espina²².

Amblyomma varanense es una garrapata distribuida en las regiones zoogeográficas Oriental y de Australasia^{5,9}. Los lagartos de la familia *Varanidae*, incluyendo a la especie *V. salvator*, se encuentran entre los principales hospedadores de los estadios inmaduros y adultos de *Am. varanense*^{2,11,16}, por lo que la asociación registrada en este trabajo de ninfas y adultos de *Am. varanense* con *V. salvator* no se puede considerar como fortuita. Existen registros de la introducción de esta garrapata fijadas a reptiles importados en Estados Unidos, Reino Unido y Polonia^{2,3,12,13,18}.

Este trabajo pone en evidencia el riesgo que conlleva la importación de vertebrados exóticos para la introducción de sus parásitos, y también, en el caso particular de las garrapatas, de la introducción de microorganismos potencialmente patógenos de los cuáles estos ectoparásitos son vectores. En este sentido, existen registros de la presencia de infección con *Borrelia* sp., *Rickettsia* sp., *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp. y *Hepatozoon* spp. en especímenes de *Am. varanense*^{13,14,23-25}. Lamentablemente se desconoce el destino y evolución del resto de los animales pertenecientes al lote proveniente de Indonesia. Sin embargo, en base a nuestros hallazgos y dado el nivel de deterioro sanitario de los animales, se considera que ese tipo de importaciones conlleva un alto riesgo de introducción de patógenos exóticos. En vista de lo mencionado anteriormente, se resalta la necesidad de reforzar las medidas de control con el objeto de prevenir la introducción de enfermedades exóticas, incluyendo garrapatas exóticas y microorganismos asociados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Burrridge, M.J. Ticks (Acari: Ixodidae) spread by the international trade in reptiles and their potential roles in dissemination of diseases. *Bull Entomol Res.* 2001; 91:3-23.
2. Burrridge, M.J. Non-native and invasive ticks: threats to human and animal health in the United States. *University Press of Florida*, Gainesville, USA, 2011.
3. Burrridge, M.J.; Simmons, L.A. Exotic ticks introduced into the United States on imported reptiles from 1962 to 2001 and their potential roles in international dissemination of diseases. *Vet Parasitol.* 2003; 113:289-320.
4. Burrridge, M.J.; Simmons, L.A.; Allan, S.A. Introduction of potential hearwater vectors and other exotic ticks into Florida on imported reptiles. *J Parasitol.* 2000; 86:700-4.
5. Durden, L.A.; Merker, S.; Beati, L. The tick fauna of Sulawesi, Indonesia (Acari: Ixodoidea: Argasidae and Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 2008; 45:85-110.
6. Durden, L.A.; Beati, L. Modern tick systematic. En: *Biology of Ticks*, Volume 1, Second Edition. Oxford University Press, Oxford, UK, 2014.
7. González Acuña, D.; Beldoménico, P.M.; Venzal, J.M.; Fabry, M.; Keirans, J.E.; Guglielmone, A.A. Reptile trade and the risk of exotic tick introductions into southern South America countries. *Exp Appl Acarol.* 2005; 35:335-9.
8. Guglielmone, A.A.; Nava, S. 2014. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names—with notes on confusions and misidentifications. *Zootaxa*, 2014; 3767.
9. Guglielmone, A.A.; Robbins, R.G.; Apanaskevich, D.A.; Petney, T.N.; Estrada-Peña, A.; Horak, I. *The hard ticks of the world*. Springer, Dordrecht, Netherlands, 2014.
10. Jameson LJ, Phipps LP, Medlock JM. 2010. Surveillance for exotic ticks on companion animals in the UK. *Veterinary Record.* 2010; 166:202-4.
11. Kaufman, T.S. A revision of the genus *Aponomma* Neumann, 1899 (Acarina: Ixodidae). Ph. D. Dissertation, University of Maryland, Maryland, USA, 1972.
12. Keirans, J.E., Durden, L.A. 2001. Invasion: exotic ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) imported into the United States. A review and new records. *J Med Entomol.* 2001; 38:850-61.

13. Kenny, M.J., Shaw, S.E., Hyllyard, P.D., Forbes, A.B. 2004. Ectoparasite and haemoparasite with imported exotic reptiles. *Veterinary Record*. 2004; 154:435-6.
14. Kho, K.L., Kho, F.X., Tay, S.T. Molecular evidence of potential novel spotted fever group rickettsiae, Anaplasma and Ehrlichia species in Amblyomma ticks parasitizing wild snakes. *Parasit Vectors*. 2015; 8:112.
15. Klompen, J.S.H., Dobson, S.J., Barker, S.C. A new subfamily, Bothriocrotinae n. subfam., for the genus Bothriocroton Keirans, King & Sharrad, 1994 status amend. (Ixodida: Ixodidae), and the synonymy of Aponomma Neumann, 1899 with Amblyomma Koch, 1844. *Syst Parasitol*. 2002; 53:101-7.
16. Liyanaarachchi, D.R., Rajakaruna, R.S., Dikkumbura, A.W., Silva, A., Rajapakse, J. Ticks (Acarian: Ixodida) infesting reptile species in Sri Lanka with sixteen new host records. *Zootaxa*. 2015; 3964:146-8.
17. Mihalca, A.D. Ticks imported to Europe with exotic reptiles. *Vet Parasitol*. 2015; 213:67-71.
18. Nowak-Chmura, M. A biological/medical review of alien ticks species (Acari: Ixodidae) accidentally transferred to Poland. *Ann Parasitol*. 2014; 60:49-59.
19. Pietzsch, M.E., Quest, R., Hillyard, P.D., Medlock, J.M., Leach, S. Importation of exotic ticks into the United Kingdom via the international trade in reptiles. *Exp Appl Acarol*. 2006; 38:59-65.
20. Pun, S.K., Guglielmono, A.A., Tarragona, E.L., Nava, S., Maharjan, M. Ticks (Acari: Ixodidae) of Nepal: First record of *Amblyomma varanense* (Supino), with an update of species list. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018; 9:526-34.
21. Simmons, L.A., Stadler, C.K., Burrige, M.J. Introduction of the exotic tick *Amblyomma helvolum* Koch (Acari: Ixodidae) into the United States on imported cobras (Squamata: Elapidae). *Int J Acarol*. 2002; 28:45-8.
22. Sharif, M. A revision of the Indian Ixodidae with special reference to the collection in the Indian Museum. *Records of the Indian Museum*. 1928; 30:217-344.
23. Sumrandee, C., Hirunkanokpun, S., Doornbos, K., et al. Molecular detection of Rickettsia species in *Amblyomma* ticks collected from snakes in Thailand. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014; 5:632-50.
24. Sumrandee, C., Baimai, V., Trinachartvanit, W., Ahantarig, A. Hepatozoon and Theileria species detected in ticks collected from mammals and snakes in Thailand. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015; 6:309-15.
25. Trinachartvanit, W., Hirunkanokpun, S., Sudsangiem, R., et al. Borrelia sp. phylogenetically different from Lyme disease- and relapsing fever-related Borrelia spp. in *Amblyomma varanense* from Python reticulatus. *Parasit Vectors*. 2016; 9:359.
26. Venzal, J.M., Nava, S., Guglielmono, A.A. Garrapatas exóticas: hallazgo de *Amblyomma latum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) parasitando *Phyton regius* (Serpentes: Boidae) en Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo). 2007; 42:15-7.

Persistencia del conducto arterioso en caninos: evaluación retrospectiva de 88 casos (2014 - 2018)

Patent ductus arteriosus in dogs: 88 cases (2014 - 2018)

BÖKENHANS, RJ¹

¹ Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Clínica Médica de Pequeños Animales.

RESUMEN

La persistencia del conducto arterioso con flujo de izquierda a derecha es una de las cardiopatías congénitas más frecuentes en perros. Sin corrección está asociada con alta mortalidad antes del año de vida. El cierre del conducto por medio de ligadura ha sido el método habitual de tratamiento en el Hospital Veterinario de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Se evaluaron 88 casos en el Hospital Escuela; 67 fueron operados y se presentan los resultados de controles posquirúrgicos de 32 pacientes. En el control al mes de la cirugía se registró una disminución estadísticamente significativa ($P < 0,05$) del acortamiento fraccional. Se observó una disminución significativa del diámetro diastólico del ventrículo izquierdo en todos los controles posquirúrgicos hasta un año de evolución ($P < 0,01$).

Palabras clave: (persistencia del conducto arterioso), (caninos), (cardiopatía congénita), (flujo de izquierda a derecha).

SUMMARY

Left to right shunting patent ductus arteriosus is one of the most common canine congenital heart defects. It is associated with high mortality. Surgical ligation has been the standart method of correction. 88 cases have been evaluated in the Veterinary school hospital of the University of Buenos Aires (UBA); 67 were operated on and the results of 32 of the post-surgical patients are presented. One month after surgery a reduction of the fractional shortening ($P < 0.05$) has been observed. Follow-up one year later showed in all controls after surgery a reduction of the left ventricle diastolic diameter ($P < 0.01$).

Key words: (patent ductus arteriosus), (canine), (congenital heart disease), (left to right shunting).

INTRODUCCIÓN

El conducto arterioso cumple una importante función durante la vida fetal: conduce la sangre de la arteria pulmonar hacia la aorta, evitando que fluya a los pulmones, en ese momento afuncionales. La persistencia del conducto arterioso (PCA) es una de las patologías congénitas más frecuentes en los caninos, representando entre 20 y 30% de las mismas^{5,12}. Aunque existe predisposición en algunas razas, puede aparecer en cualquier raza^{1,6}, siendo la incidencia menor en mestizos que en individuos puros^{1,12}. Por el contrario, la presentación de esta patología en gatos es infrecuente⁵. Inicialmente genera una sobrecarga de volumen al sector izquierdo del corazón con dilatación atrial izquierda e hipertrofia excéntrica del ventrículo izquierdo. Con frecuencia desencadena insuficiencia cardíaca a temprana edad. Sin corrección quirúrgica la mayoría de los afectados presentan disfunción cardíaca¹⁷ o mueren durante el primer año de vida^{7,19}. Sin embargo, algunos pacientes se mantienen compensados por años. En general, se indica la cirugía correctiva a los pocos meses de vida para evitar el deterioro de la función cardíaca y la aparición de posibles complicaciones, por ejemplo, la dilatación de la aorta o de la arteria pulmonar. En los pacientes que presentan signos de descompensación o alteraciones de la función sistólica se indica medicación hasta estabilizarlos, y poder operarlos con mayor margen de seguridad. Sin embargo, algunos nunca llegan a compensarse y mueren por insuficiencia cardíaca. Por esta razón es de fundamental importan-

cia reconocer la patología antes de que aparezcan signos de descompensación. Se comprobó que el cierre quirúrgico del conducto arterioso se asocia a disminución del tamaño cardíaco y a mayor sobrevida^{4,13,16}. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar retrospectivamente la evolución de los caninos con diagnóstico de PCA, controlar las modificaciones físicas (diámetro diastólico) y funcionales (acortamiento fraccional) del ventrículo izquierdo en caninos sometidos a corrección quirúrgica y considerar las causas por las cuales algunos pacientes no fueron intervenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se revisaron las historias clínicas informatizadas del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, desde enero de 2014 hasta julio de 2018 y se seleccionaron los casos confirmados de PCA ($n=88$). Se consignaron raza, sexo y edad a la primera consulta. Todos los pacientes fueron evaluados en la Unidad de Cardiología del Hospital Escuela, mediante examen clínico y estudio ecocardiográfico en modo B, en modo M y Doppler, realizando la confirmación de la patología de acuerdo a la técnica descrita por Boon³. Se utilizó equipo SonoScape S8 multifrecuencia con transductores Phased array 2P y 5P. Las mediciones de las dimensiones cardíacas fueron realizadas desde la ventana paraesternal derecha en modo M, incluyendo diámetros diastólico y sistólico de ventrículo izquierdo, espesores diastólico y sistólico de la pared libre del ventrículo izquierdo y del septo interventricular. Se

determinó también el valor del acortamiento fraccional. Todos los evaluadores fueron especialistas en Cardiología clínica de la UBA. Se descartaron caninos con diagnóstico presuntivo de PCA sin la confirmación pertinente. En cada animal se evaluó la posibilidad de realizar la corrección quirúrgica. Se efectuó la cirugía en 67 caninos, que consistió en toracotomía izquierda y ligadura del conducto. Luego de la cirugía los caninos quedaron en internación hasta que fueron dados de alta. Se reevaluaron 32 caninos, realizando controles ecocardiográficos. Al evaluar los resultados y por tratarse de perros de distintas edades y tamaños se decidió agruparlos de acuerdo al momento del control y comparar cada grupo con los valores previos a la cirugía. Se controlaron 18 pacientes al mes poscirugía (grupo 1), 23 pacientes entre los 2 y 5 meses (grupo 2), 15 pacientes entre los 6 y 8 meses (grupo 3) y 15 pacientes al año luego de la cirugía (grupo 4).

Todos los caninos presentados en este estudio fueron traídos al Hospital Escuela por sus propietarios. Los tratamientos efectuados son los recomendados por la bibliografía mundial y no se aplicaron técnicas experimentales. Por lo tanto no se solicitó intervención del tribunal de bioética.

Estudio estadístico: fue utilizado el test "t" de muestras pareadas (test de Student). Los valores son expresados como promedio \pm DS con nivel de significación $P < 0,05$. (Graph pad 6).

RESULTADOS

Se presentan 88 casos de PCA en caninos evaluados en la Unidad de Cardiología del Hospital Escuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA.

La distribución de acuerdo al sexo fue: 66 hembras (75%) y 22 machos (25%).

La raza caniche y los mestizos se presentaron con mayor frecuencia, con 27 casos (30,7%), cada una de ellas. Otras razas: maltés (5), chihuahua (4), yorkshire terrier (4), ovejero alemán (4), jackrussell (3), cocker (2), y -con un individuo- westhighlandwhite terrier, schnauzer, vizsla, bretón, bichon frisé, pekinés, afgano, dachshund, bordercollie, pitbull.

En 2 casos no se registró la raza.

Se observó un marcado predominio de individuos de talla chica (n= 47, 53,4%).

La distribución de acuerdo a la edad fue: hasta 6 meses (n= 45; 51,1%), mayores de 6 meses hasta 12 meses (n=10; 11,4%), de 1 a 2 años (n=12; 13,6%), mayores de 2 hasta 4 años (n= 9; 10,2%), mayores de 4 años (n=9; 10,2%). En tres pacientes no se consignó la edad.

Pacientes no operados

Se evaluaron las historias de los pacientes que no fueron operados o que sufrieron muerte cercana a la cirugía: 21 pacientes no fueron operados (23,9%). Las causas fueron:

- 7 pacientes descompensados que no se estabilizaron con los tratamientos instaurados (edades: 2 de 3 meses, 2 de 4 meses, 1 de 6 meses, 1 de 2 años, 1 de 8 años). Entre estos pacientes cabe destacar a un mestizo, hembra, de 2 años a la que se le había indicado cirugía un año antes y que fue traída al Hospital Escuela con descompensación global, ascitis, dilatación atrial izquierda, hipertrofia excéntrica del VI y disfunción sistólica. Otro paciente fue presentado con disnea, severa dilatación atrial izquierda, hipertrofia excéntrica de VI y edema pulmonar.

- 2 pacientes (de 3 y 7 meses) murieron por causas desconocidas pocos días antes de la cirugía; uno presentaba dilatación de la arteria pulmonar.

- 4 pacientes mayores de 6 años, cuyos propietarios no aceptaron los riesgos de la cirugía o que se hallaban compensados al momento del diagnóstico y en los que se consideró de alto riesgo la cirugía (1 de 6 años, 2 de 8 años, 1 de 13 años).

- 4 pacientes que no volvieron a los controles previos a la cirugía por razones desconocidas (edades: 2 de 4 meses, 1 de 5 meses, 1 de 3 años).

- 3 pacientes con patologías asociadas (hidrocefalia: 1 y estenosis subaórtica severa: 2).

- en un paciente no se consigna en la historia clínica las razones por las que no fue intervenido.

Pacientes operados que no sobrevivieron

4 pacientes fueron operados pero presentaron mala evolución:

- un paciente, macho de 2 meses, murió durante la cirugía; además de PCA presentaba hidrocefalia.

- un paciente, de 4 meses, murió un mes poscirugía al desarrollar hipertensión pulmonar: al 5to día poscirugía presentó disnea y fue medicado (sildenafil, furosemida).

- en un paciente (Chihuahua, 4 meses) no se pudo completar la ligadura del conducto por presentar arritmias y paro cardíaco durante la cirugía y murió al día siguiente;

- un paciente (Yorkshire, de 9 años) fue operado, pero murió durante la internación.

Evaluación por edad

Dado que la edad al diagnóstico es un factor importante para evaluar las posibilidades quirúrgicas o de descompensación, se presentan los casos discriminados por edad:

- hasta 6 meses (n=45): 31 fueron operados y dados de alta, 5 no llegaron a compensar, 3 no volvieron a los controles; 3 no fueron operados por patologías asociadas; 3 muertes periquirúrgicas.

- de 6 a 12 meses (n=10): 8 fueron operados; dos no fueron intervenidos por descompensación;

- mayores de 1 año y hasta 2 años (n=12): 11 fueron operados; uno no fue intervenido por descompensación.

- mayores de 2 años y hasta 4 años (n=9): 7 fueron operados; un paciente no llegó a compensar; uno no volvió a los controles.

- mayores de 4 años (n= 9): 3 fueron operados y dados de alta (2 de 5 años, 1 de 6 años); 5 no fueron intervenidos (un yorkshire terrier de 8 años por alto riesgo, ya presentaba signos de hipertrofia excéntrica de ventrículo izquierdo con disfunción sistólica y dilatación de atrio izquierdo; fue medicado y vivió dos años; un caniche de 6 años, que fue vuelto a controlar 4 años después, aún compensado; un cocker de 13 años y un mestizo de 8 años que se encontraban compensados y un mestizo de 8 años por descompensación); 1 yorkshire terrier de

9 años fue operado y presentó complicaciones intraquirúrgicas (desgarro de la aorta dilatada; se resolvió, pero murió durante la internación).

Asociación con otras cardiopatías (n= 5)

Al existir concurrencia de cardiopatías debe evaluarse la conveniencia de la corrección del conducto arterioso y el tratamiento médico posterior de la otra patología.

- no fueron operados: 2 con estenosis subaórtica severa

- fueron operados: 2 con estenosis pulmonar; 1 con estenosis pulmonar y comunicación interventricular.

Pacientes operados

De los 88 pacientes evaluados, 67 fueron sometidos a cirugía y 64 fueron dados de alta luego de la internación posquirúrgica (una muerte intraquirúrgica, dos muertes durante la internación).

Controles posquirúrgicos

Uno de los objetivos de este trabajo fue la valoración de la evolución posterior a la corrección quirúrgica de la función del ventrículo izquierdo, basándose en dos parámetros: diámetro diastólico de VI y acortamiento fraccional. Luego de la cirugía fueron reevaluados 32 pacientes. Se separaron los pacientes según el momento del control: al mes (grupo 1), entre 2 y 5 meses (grupo 2), entre 6 y 8 meses (grupo 3) y al año (grupo 4); se compararon con los valores registrados antes de la cirugía (basal) correspondientes a esos pacientes.

Diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DDVI) (Gráfico 1)

Comparados con los respectivos valores basales, en todos los controles se registró disminución del DDVI que resultó ser estadísticamente significativa: grupos 1, 2, 3 (P< 0,01), grupo 4 (P<0,001). Esta disminución del DDVI se atribuye al remodelado inverso debido a la desaparición de la sobrecarga crónica de volumen luego del cierre del conducto.

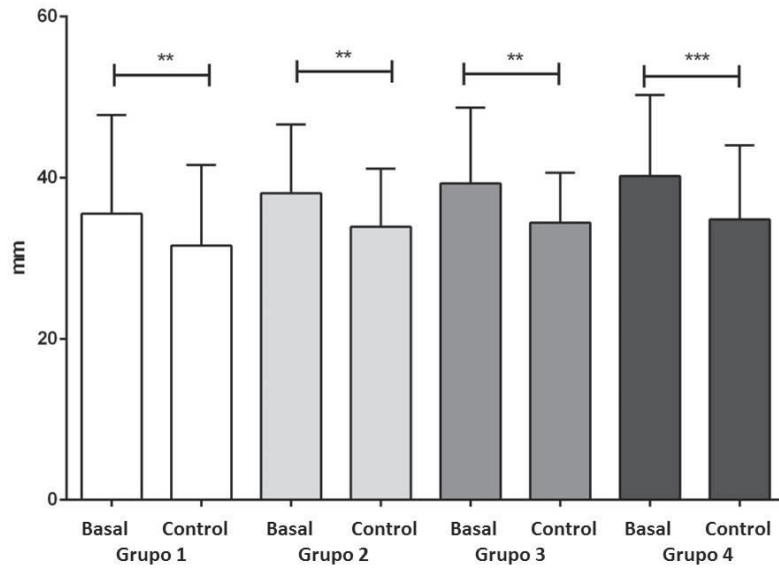


Gráfico 1. Valores de diámetro diastólico del ventrículo izquierdo en los pacientes operados a los distintos momentos de control comparados con sus respectivos valores basales (** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$).

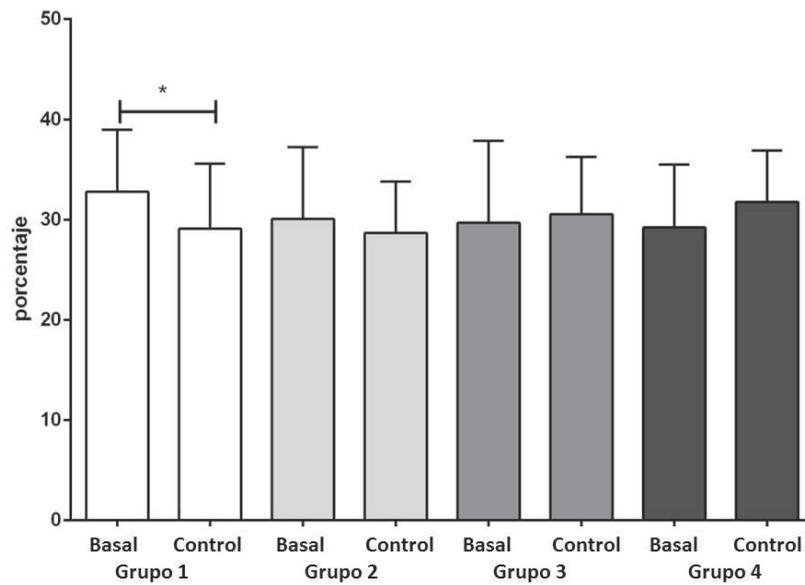


Gráfico 2. Valores de acortamiento fraccional en los pacientes operados a los distintos momentos de control comparados con sus respectivos valores basales (* $P < 0,05$).

- *Acortamiento fraccional (AF) (Gráfico 2)*

Se comprobó una disminución estadísticamente significativa ($P < 0,05$) del acortamiento fraccional en el control al mes de la cirugía (grupo 1). Este hallazgo coincide con lo señalado en la bibliografía; no se lo considera un indicador de la contractilidad miocárdica, sino que se atribuye a la modificación en las condiciones de sobrecarga de volumen del ventrículo izquierdo⁹. Las modificaciones del AF en los controles posteriores al mes no resultaron estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

El conducto arterioso cumple una importante función durante la vida fetal al permitir el pasaje de la sangre de la arteria pulmonar hacia la aorta, evitando la circulación pulmonar. En la pared del conducto de los perros sanos predomina el músculo liso y hay poco tejido elástico. Buchanan describió que la pared del conducto normal presenta 98% de fibras de músculo liso con algunas fibras elásticas (2%)⁵. La distribución del músculo es en sentido circunferencial. El conducto se cierra en las primeras horas de vida (cierre funcional) por contracción del músculo liso de la pared del conducto, en respuesta al aumento de la tensión de oxígeno y a la disminución de la resistencia vascular pulmonar. Luego se produce degeneración no inflamatoria del músculo y citólisis que se completa durante el primer mes dejando las fibras elásticas remanentes. No se produce fibrosis proliferativa⁵. Se comprobó que en caninos en los que no se produce el cierre, el conducto presenta capa muscular hipoplásica o ausente, y que presenta fibras elásticas, no contráctiles, similares a las de la pared de la aorta⁵. Generalmente el conducto tiene forma de embudo con el extremo más angosto en el contacto con la arteria pulmonar^{5,11,14}. Al permanecer permeable se establece un flujo de sangre de aorta a arteria pulmonar - “flujo de izquierda a derecha”-, durante la diástole y la sístole, generando sobrecarga de la circulación pulmonar, del atrio y ventrículo izquierdos. En algunos pacientes se produce hipertensión pul-

monar con inversión del flujo (de pulmonar a aorta, “de derecha a izquierda”). Estos pacientes no fueron incluidos, ya que no están dentro de los objetivos de este trabajo.

El aumento del flujo genera dilatación del atrio izquierdo e hipertrofia excéntrica del ventrículo izquierdo^{5,7,9}. De acuerdo a datos de la bibliografía, por ecocardiografía se reconocen dilatación de atrio izquierdo en 35%, aumento del diámetro diastólico del VI en 82% y aumento del diámetro sistólico del VI en 84% de los caninos con PCA¹⁸. También se puede producir dilatación de la arteria pulmonar y/o de la aorta, que constituyen un riesgo durante la cirugía, ya que la pared se encuentra adelgazada y se puede desgarrar durante el procedimiento. La sobrecarga crónica de volumen puede causar la disminución de la contractilidad miocárdica (disfunción sistólica). Además, la dilatación atrial izquierda favorece la aparición de arritmias supraventriculares, que en algunos casos llega a la fibrilación auricular y la descompensación del paciente. Esta arritmia constituye un aumento en el riesgo quirúrgico, ya que se asocia a complicaciones. Bureau reportó que 2 caninos con fibrilación auricular fueron operados y que murieron 8 y 17 días después de la cirugía⁷.

Es muy importante el diagnóstico presuntivo precoz basado en el examen clínico: se ausculta soplo continuo (diastólico-sistólico) cercano al foco aórtico (en precordio izquierdo), también denominado soplo en maquinaria; es frecuente que también se ausculta soplo de insuficiencia mitral secundaria. El pulso presenta características particulares: se lo describe como hiperquinético (de mayor amplitud y mayor velocidad) debido al aumento del volumen sistólico y al flujo desde la aorta hacia la arteria pulmonar. La bibliografía señala la mayor incidencia en hembras^{7,8}.

En este trabajo no se evaluaron los cambios radiológicos y electrocardiográficos más característicos; sin embargo, estos estudios pueden aportar al diagnóstico. En la radiografía de tórax se puede observar: dilatación atrial izquierda, aumento del ventrículo izquierdo, dilatación del arco aórtico, dilatación del tron-

co pulmonar, cardiomegalia generalizada. En ocasiones se pueden observar los cambios por descompensación: congestión vascular, edema pulmonar. En el electrocardiograma se pueden registrar aumento de duración de la onda P (indicio de sobrecarga atrial izquierda), aumento de amplitud y voltaje del complejo QRS (indicios de sobrecarga ventricular izquierda) y es posible observar, también, taquiarritmias supraventriculares.

La ecocardiografía en modo B y M puede mostrar la hipertrofia excéntrica del ventrículo izquierdo, la dilatación atrial izquierda y a medida de que el caso progresa los signos de disfunción sistólica, en especial la disminución del acortamiento fraccional. También puede observarse, en algunos casos, la dilatación de la arteria aorta y/o de la arteria pulmonar. La ecocardiografía Doppler permite registrar el flujo turbulento en la arteria pulmonar debido al flujo de sangre desde la aorta durante la sístole y la diástole.

Considerando que el cierre del conducto arterioso está asociado a mayor sobrevida y menor incidencia de descompensación, debemos centrar nuestra atención en las causas por las que numerosos pacientes (n=21; 23,9%) no fueron operados: las principales razones fueron la descompensación cardiocirculatoria (n=7) y el diagnóstico de la patología en pacientes de mayor edad (n=11). En ambos casos el diagnóstico precoz, antes de las modificaciones del corazón y/o de la descompensación, hubiera permitido la corrección quirúrgica.

La incidencia de muerte intraquirúrgica o posquirúrgica inmediata (72 h) fue de 3 pacientes (4,5%) (operados= 66). Un paciente murió un mes luego de la cirugía.

Se considera ideal operar a estos pacientes a la edad más temprana posible⁷, para tratar de evitar la aparición de cambios anatómicos relacionados a la sobrecarga de volumen: la disminución de la función sistólica, la dilatación atrial izquierda, de la aorta y/o de la arteria pulmonar. Buchanan⁵ presentó una clasificación de los pacientes con PCA sobre la base de las características clínicas y al grado de compensación:

Tipo I: conducto pequeño, presenta radiografía y electrocardiograma normales al año; la cirugía está recomendada, pero no es urgente.

Tipo II: conducto mediano; la cirugía está recomendada, pero puede esperar unas semanas.

Tipo III a: conducto grande sin insuficiencia cardíaca; realizar la cirugía sin demora.

Tipo III b: conducto grande con signos de insuficiencia cardíaca; se indica tratamiento antes de la cirugía.

Tipo IV: conducto grande con hipertensión pulmonar; en este caso la cirugía está contraindicada.

También se considera que el riesgo de complicaciones intra o posquirúrgicas aumenta al operar pacientes de mayor edad: el tejido del conducto es más friable⁷ y la dilatación aórtica reduce la posibilidad de acceso al conducto⁵.

Se considera que la edad es un factor asociado en forma negativa a la sobrevida^{7,8}; sin embargo, la recomendación general es que todos los afectados deben ser intervenidos, salvo los que presentan hipertensión pulmonar⁵. Si bien hay autores que recomiendan la cirugía de todos los pacientes con PCA, salvo los que presentan inversión del flujo, también hay coincidencia que la sobrevida está asociada en forma negativa en caso de pacientes de mayor edad o que hayan presentado signos de insuficiencia cardíaca^{7,8}.

En medicina humana al diagnosticar PCA en personas adultas se recomienda la cirugía en presencia de conductos de tamaño moderado a severo y se debate en los casos de pacientes asintomáticos y conducto pequeño⁴. Probablemente sea el criterio a adoptar en los caninos de mayor edad.

Se ha descrito la presencia de flujo residual a través del conducto luego de la cirugía¹⁸, pero no se considera indicación para volver a operar: el proceso de cicatrización cierra la comunicación antes de los tres meses posquirúrgicos⁵.

En algunos pacientes de este trabajo se observó la presencia de una disfunción sistólica transitoria luego de la cirugía. Este hallazgo coincide con lo señalado en la bibliografía y que no se considera un indicador de la contractilidad miocárdica, sino que se adjudica a las modificaciones en la sobrecarga de volumen⁹.

En este trabajo no se consideró la insuficiencia mitral secundaria que se produce por dilatación del anillo valvular debido a la tracción de las fibras musculares. Su presencia no constituye contraindicación para la cirugía⁷ y se ha descrito que en muchos casos se normaliza luego de la cirugía⁷. Sin embargo, también se ha publicado que la persistencia de insuficiencia mitral severa luego de 24 h poscirugía, se asocia a menor sobrevivencia¹³.

También debe remarcar la necesidad de castrar a los caninos afectados, ya que no deben reproducirse. Es particularmente importante en las hembras, ya que son las más frecuentemente afectadas.

Cabe aclarar que hay numerosos artículos^{8,10,13,16} sobre la corrección de la PCA por medio de cateterismo que no es la técnica utilizada actualmente en el Hospital Escuela de la UBA.

CONCLUSIONES

Los datos presentados en este estudio constituyen una casuística que representa el estado actual del diagnóstico y tratamiento de la PCA en el Hospital Escuela de la UBA.

Es importante destacar la importancia del diagnóstico precoz de esta patología, para realizar la corrección quirúrgica lo más tempranamente posible, antes que se desarrollen las alteraciones anatómicas. Se ha comprobado la involución de estas modificaciones luego de la cirugía: el remodelado inverso del ventrículo izquierdo¹³ y la disminución del diámetro diastólico del ventrículo izquierdo⁷, comprobada en esta serie de pacientes. El diagnóstico precoz permite la cirugía a temprana edad y con menor riesgo de complicaciones.

Cabe destacarse que entre los pacientes que no fueron intervenidos hubo 10 caninos mayores de 6 meses que podrían haber sido operados si se hubiera diagnosticado precozmente.

Es auspicioso que 55 pacientes hayan sido menores de un año (45 menores de 6 meses), de los cuales 39 fueron intervenidos. Si bien hubo 20 caninos con edades de 1 a 4 años (18 fueron operados satisfactoriamente), la recomendación es realizar la cirugía a la edad más

temprana posible. Por lo tanto, es fundamental remarcar la importancia de la evaluación clínica de los cachorros para descartar la existencia de una cardiopatía congénita en general y de la PCA en particular.

AGRADECIMIENTOS

A los colegas de la Unidad de Cardiología del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA por las evaluaciones de estos pacientes.

Al Dr. Víctor Castillo por el análisis estadístico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bellumori, TP.; Famula, TR.; Bannasch, DL.; Belanger, JM.; Oberbauer, AM. Prevalence of inherited disorders among mixed-breed and purebred dogs: 27,254 cases (1995-2010). *J Am Vet Med Assoc.* 2013 Jun 1;242(11):1549-55
2. Birchard, SJ.; Bonagura, JD.; Finland RB. Results of ligation of patent ductus arteriosus in dogs: 201 cases (1969-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1990;196:2011-2013.
3. Boon, JA. Evaluation of size, function, and hemodynamics. In: Boon, JA., editor. *Veterinary Echocardiography*, 2nd ed. Wiley-Blackwell; 2011:153-266.
4. Boutet, B.; Saunders, A.; Gordon, S. Clinical characteristics of adult dogs more than 5 years of age at presentation for patent ductus arteriosus. *J Vet Intern Med.*2017; 31: 685-690.
5. Buchanan JW. Patent ductus arteriosus morphology, pathogenesis, types and treatment. *J Vet Cardiol* 2001;3:7-16.
6. Buchanan, JW.; Patterson DF. Etiology of patent ductus arteriosus in dogs. *J Vet Intern Med.* 2003 Mar-Apr;17(2):167-71.
7. Bureau, S.; Monnet, E.; Orton, EC. Evaluation of survival rate and prognostic indicators for surgical treatment of left-to-right patent ductus arteriosus in dogs: 52 cases (1995-2003). *J Am Vet Med Assoc.* 2005 Dec 1; 227(11):1794-9.
8. Goodrich, KR.; Kyles, AE.; Kass, PH.; Campbell, F. Retrospective comparison of surgical ligation and transarterial catheter occlusion for treatment of patent ductus arteriosus in two hundred and four dogs (1993-2003). *Vet Surg.* 2007 Jan; 36(1):43-9.

9. Hamabe, L.; Kim, S.; Yoshiyuki, R.; Fukayama, T.; Nakata, TM.; Fukushima, R.; Tanaka, R. Echocardiographic evaluation of myocardial changes observed after closure of patent ductus arteriosus in dogs. *J Vet Intern Med.* 2015 Jan;29(1):126-31.
10. Hildebrandt, N.; Schneider, C.; Schweigl, T.; Schneider M. Long-term follow-up after transvenous single coil embolization of patent ductus arteriosus in dogs. *J Vet Intern Med.* 2010 Nov-Dec; 24(6):1400-6.
11. Miller, MW.; Gordon, SG.; Saunders, AB.; Arsenault, WG.; Meurs, KM.; Lehmkuhl, LB.; Bonagura, JD.; Fox, PR. Angiographic classification of patent ductus arteriosus morphology in the dog. *J Vet Cardiol.* 2006 Nov;8 (2):109-14.
12. Oliveira, P.; Domenech, O.; Silva, J.; Vannini, S.; Bussadori, R.; Bussadori, C. Retrospective review of congenital heart disease in 976 dogs. *J Vet Intern Med.* 2011 May-Jun;25(3):477-83.
13. Saunders, AB.; Gordon, SG.; Boggess, MM.; Miller, MW. Long-term outcome in dogs with patent ductus arteriosus: 520 cases (1994-2009). *J Vet Intern Med.* 2014 Mar-Apr; 28(2):401-10.
14. Saunders, AB.; Miller, MW.; Gordon, SG.; Bahr, A. Echocardiographic and angiographic comparison of ductal dimensions in dogs with patent ductus arteriosus. *J Vet Intern Med* 2007; 21:68-75.
15. Schroppe DP. Prevalence of congenital heart disease in 76,301 mixed-breed dogs and 57,025 mixed-breed cats. *J Vet Cardiol.* 2015 Sep;17(3):192-202.
16. Stauthammer, CD.; Tobias, AH.; Leeder, DB.; Krüger, MU. Structural and functional cardiovascular changes and their consequences following interventional patent ductus arteriosus occlusion in dogs: 24 cases (2000-2006). *J Am Vet Med Assoc.* 2013 Jun 15;242(12):1722-6.
17. Van Israel, N.; Dukes-McEwan, J.; French, AT. Long-term follow-up of dogs with patent ductus arteriosus. *J Small Anim Pract* 2003;44:480-490.
18. Van Israel; N.; French, AT.; Dukes-McEwan, J.; Corcoran, BM. Review of left-to-right shunting patent ductus arteriosus and short term outcome in 98 dogs. *J Small Anim Practice* 2002; 43:395-400.
19. Van Israel, N; French, AT; Dukes-McEwan, J; Welsh, EM. Patent ductus arteriosus in the older dog. *J Vet Cardiology* 2003;5; 13-21.

Punción submandibular con aguja de inyección en ratones: comparación de dos procedimientos

Submandibular puncture with injection needle in mice: comparison between two different procedures

FERNÁNDEZ, V.^{1,2}; DOMÍNGUEZ, P.²; GARCÍA, JP.³; ESTEIN, SM.^{1,2}

¹Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina. ²Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN) (UNCPBA-CICPBA-CONICET). ³Servicio de Diagnóstico Veterinario, FCV, UNCPBA, Tandil, Argentina

RESUMEN

La punción del plexo venoso a nivel submandibular en ratones es una técnica aceptada para la obtención de volúmenes de sangre adecuados para análisis de rutina. Si bien se recomienda el uso de lancetas comerciales, en Argentina no están disponibles, por lo tanto pueden sustituirse por agujas de inyección. El objetivo de este trabajo fue comparar el uso de agujas 21G x 1” utilizando dos procedimientos de punción submandibular en ratones BALB/c de 8 semanas de edad: G1) con capuchón cortado a 10 mm (restringiendo la profundidad de la punción) y G2) sin capuchón para determinar: a) volumen de sangre obtenido, b) datos hematológicos y glucemia y c) daño tisular. El volumen de sangre obtenido por la punción submandibular con aguja sin capuchón fue significativamente mayor que el colectado con capuchón. Los valores hematológicos y la glucemia fueron normales para ambos procedimientos. No se observaron daños histológicos en ninguno de los procedimientos empleados. En conclusión, se recomienda el uso de aguja como procedimiento de refinamiento para la obtención de sangre submandibular dado que es económico, práctico, permite obtener un volumen sanguíneo moderado sin provocar daño tisular y asegura la recuperación de los animales.

Palabras clave: (extracción submandibular), (ratones), (aguja con y sin capuchón).

Recibido: 17-07-19

Aceptado: 11-03-20

Correspondencia *e-mail*: Vanesa Fernández vanesaf@vet.unicen.edu.ar

SUMMARY

The puncture of the venous plexus in the submandibular region in mice is an accepted technique to obtain blood volumes suitable for routine clinical analysis. Although the use of commercial lancets is recommended, in Argentina they are not available and they could be replaced by injection needles. The aim of this study was to compare the use of 21G x 1” needles using two different submandibular puncture procedures in 8-week-old BALB/c mice: G1) with cap cut to 10 mm (restricting the depth of the puncture) and, G2) without cap to determine: a) blood volume obtained, b) hematological data and glycaemia and c) tissue damage. The blood volume obtained by submandibular needle puncture without cap was significantly higher than the one collected with cap. Hematological values and glycaemia were normal for both procedures. No histological damage was observed in any of the procedures used. In conclusion, it is recommended the use of needle without cap as a refining procedure to collect submandibular blood since it is cheapest, practical, allows to obtain moderate volumes no causing tissue damage and ensuring the animal recovery.

Keywords: (submandibular bleeding), (mice), (needle with and without cap).

INTRODUCCIÓN

El ratón (*Mus musculus*) continúa siendo un modelo experimental debido a sus características biológicas, genéticas, pequeño tamaño, fácil manejo y prolificidad¹. Existen varios procedimientos para la extracción de sangre en esta especie y la elección de la técnica depende de la cepa, edad del animal y del volumen sanguíneo requerido según el tipo de análisis o estudio en cuestión. En ocasiones, se requiere la extracción de un mayor volumen de sangre y la hipovolemia subsiguiente imposibilita que los animales se recuperen^{3,4}.

Por otra parte, se ha demostrado que tanto el sitio como el procedimiento para la colecta de la sangre pueden alterar los parámetros clínicos y bioquímicos¹. En este sentido, la punción por la vía submandibular es una técnica de implementación sencilla que permite obtener un volumen de sangre de 0,2 ml cada 2 semanas (ratón de 22 g), sin el uso de anestesia y asegurando una pronta recuperación de la volemia tras sucesivas extracciones^{2,3}.

En el 2005, Golde *et al.*, recomendaron la técnica de punción submandibular con lancetas Medipoint® para la obtención de sangre de ratones². Posteriormente, en su reemplazo se utilizaron agujas 21 y 23 G. Los resultados que se obtuvieron fueron similares y no se registraron

signos de dolor ni lesiones aparentes cuando se hicieron sangrados repetidos³. Sin embargo, estos últimos autores confirmaron que el empleo de la lanceta permitía controlar mejor la profundidad de la punción².

En Argentina, el costo elevado y el tiempo de importación necesario para disponer de lancetas comerciales, nos motivó a ensayar el uso de agujas 21 y 23 G para efectuar este procedimiento. El objetivo de este trabajo fue comparar el uso de agujas 21G x 1” utilizando dos procedimientos para la punción submandibular en ratones BALB/c de 8 semanas de edad: G1) con capuchón cortado a 10 mm y G2) sin capuchón para determinar: a) volumen de sangre obtenido, b) datos hematológicos y glucemia y c) daño tisular en extracciones sanguíneas repetidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 36 ratones BALB/c de 8-10 semanas de edad. Estos permanecieron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.C.P.B.A., recibiendo agua y alimento “*ad libitum*”, alojados en un armario ventilado, con condiciones de luz, temperatura y humedad controlados, respetando las normas de cuidado y bienestar establecidas por la Comisión

de Bioética y Bioseguridad de la Facultad. Los procedimientos y protocolos de manejo animal fueron aprobados por el Comité de Ética de acuerdo con la Política de Bienestar Animal (Ley 087/02) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, //www.vet.unicen.edu.ar). Realizados de acuerdo con las directrices internacionalmente aceptadas en materia de bienestar animal.

Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos experimentales: G1) con capuchón y G2) sin capuchón. La obtención de sangre con anticoagulante (Wiener Lab.) se realizó por punción submandibular con aguja hipodérmica descartable 21-gauge (21G x 1”; 25x8 mm) (NEOJET®) con y sin su respectivo capuchón en tubos Eppendorf (Figura 1). Las extracciones se practicaron en 3 oportunidades con un intervalo de 11 días (D0, D11 y D22).

Posteriormente, se presionó en el sitio de la punción con una compresa embebida en agua oxigenada para prevenir un posible sangrado prolongado.

El volumen obtenido por cada animal se calculó teniendo en cuenta el número de gotas, por un volumen estimado de 0,15 ml/gota.

Se realizaron las siguientes determinaciones: Hemoglobina (g/dl), Hematocrito (%), Eritrocitos/mm³, Volumen Corpuscular Medio

(fl), Hemoglobina Corpuscular Media (%) y Glucemia (mg/dl) (esta última como referencia del estado metabólico de los ratones).

Dos horas después del último día de sangrado (D22), todos los animales se sacrificaron utilizando anestesia intraperitoneal con ketamina (80 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) y dislocación cervical. La elección de ambos métodos se realizó teniendo en cuenta que el dolor no se experimenta si el animal está anestesiado o inconsciente y no recupera la conciencia previa al momento de la muerte. Luego, se obtuvo una muestra de tejido submandibular de 1 cm de diámetro para la evaluación del daño tisular en todos los animales. Para dicha muestra se utilizó un bisturí en el sitio de punción submandibular desde el ángulo de la mandíbula (cabello táctil) con una profundidad suficiente que incluyó el hueso mandibular. Las muestras se fijaron en Solución Bouin (formol, ácidos pícrico y acético). Posteriormente, se deshidrataron por inmersión en soluciones de etanol en concentraciones crecientes, luego en alcohol butílico y finalmente se incluyeron en una combinación refinada de parafina altamente purificada con polímeros plásticos (Paraplast). Se realizaron cortes de 4 a 5 µm que se montaron en portaobjetos, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron al microscopio óptico (Leica DM500).

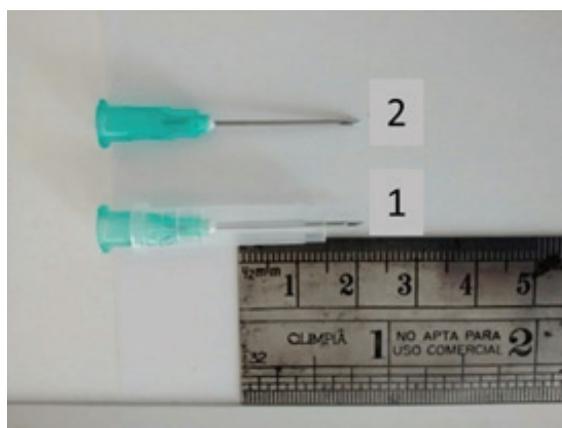


Figura 1. Agujas 21Gx1” con capuchón cortado a 10 mm desde la punta (1) y sin capuchón (2), utilizadas para la obtención de sangre por punción submandibular en ratones G1 y G2, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos de volumen de sangre obtenidos se compararon estadísticamente mediante ANOVA, seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias con $p \leq 0,05$ se consideraron significativas.

RESULTADOS

No se observaron cambios en el comportamiento de los animales o en sus hábitos alimenticios.

El volumen de sangre total obtenido en el G2 fue significativamente mayor ($p \leq 0,05$) que el obtenido en el G1 (Gráfico 1).

En ambos grupos, las muestras estuvieron libres de hemólisis y los valores hematológicos se mantuvieron dentro de los considerados de referencia durante el primer intervalo de colecta de sangre (D0 y D11, respectivamente). Se observó que el Hematocrito y los Eritrocitos/mm³ disminuyeron entre la segunda y la tercera extracción, aunque siempre se mantuvieron dentro de los valores normales (D11 y D22, respectivamente) (Tabla 1). Por otro lado, los valores de glucosa se mantuvieron en el rango de referencia en ambos

grupos (Tabla 1).

No se registraron cambios en la coloración del pelaje ni lesiones macroscópicas relevantes en la región submandibular punzada en ninguno de los ratones de ambos grupos.

La histopatología de los tejidos en el punto de punción reveló la presencia de edema en el tejido conectivo sin evidencia de inflamación aguda, crónica o necrosis ni alteración de las glándulas salivares parótida y mandibular.

En la Figura 1 se observan las lesiones microscópicas observadas en ratones G1 (a) y G2 (b), 2 h después de la última extracción de sangre (D22). a) Las fibras de colágeno del tejido conectivo (3) entre las glándulas salivales (1) y los músculos mandibulares (2) están separadas por espacios claros (edema). b) Las fibras de colágeno del tejido conectivo (3) entre las glándulas salivales (1), los músculos mandibulares (4) y los vasos linfáticos (2) están separados por espacios claros (edema) (tinción: hematoxilina-eosina 4X).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo comparamos el uso de las agujas de inyección 21 G con el capuchón

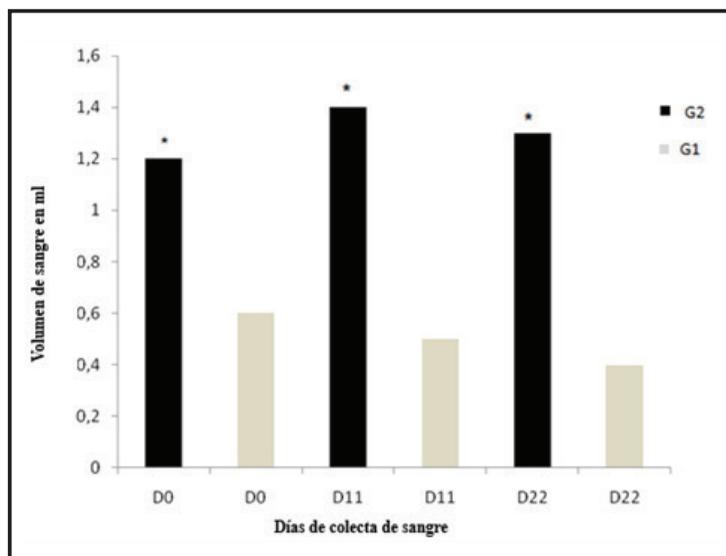
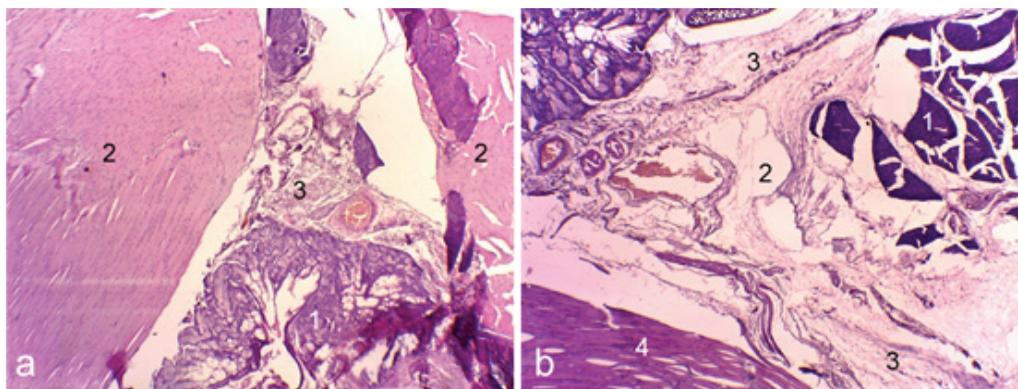


Gráfico 1. Volumen de sangre total (ml) obtenido de los ratones de cada uno de los grupos experimentales (G1 y G2) en tres oportunidades cada 11 días.

Tabla 1. Datos hematológicos y de glucemia obtenidos mediante la extracción de sangre por punción submandibular en los 3 muestreos cada 11 días de intervalo (D0, D11, D22) con y sin capuchón.

PARÁMETROS	GRUPO 1 CON CAPUCHÓN		GRUPO 2 SIN CAPUCHÓN			VALORES DE REFERENCIA	
	D0	D11	D22	D0	D11		D22
Hemoglobina g/dl	13,6	15,2	12,8	13,7	14,4	13,2	12,0-19,0
Hto %	44	47	36	46	44	36	35,0- 55,0
Eritrocitos /mm ³	6.890.000	7.150.000	6.740.000	7.050.000	6.850.000	6.510.000	5.500.000-8.500.000
VCM fl	66	70	82	68	68	77	60,0-77,0
HbCM %	19,4	19,7	17,2	19,6	20,1	17,8	17,0-24,5
Glucemia mg/dl	102	-	89	73	-	81	55,0-120,0

**Figura 2.** Lesiones microscópicas observadas en ratones G1 (a) y G2 (b) 2 h después de la última extracción de sangre (D22).

cortado y sin capuchón como alternativas de reemplazo a las lancetas comerciales para la extracción de sangre por punción submandibular. Partimos de la hipótesis de que el dolor ocasionado por el uso de la lanceta o la aguja con capuchón eran semejantes, mientras que la aguja sin capuchón ocasionaría más dolor y trauma por no tener un límite en la profundidad de la punción. Sin embargo, los animales de ambos grupos no mostraron diferencias a nivel macroscópico y el análisis histopatológico reveló sólo la presencia de edema. Por otro lado, la punción mediante la aguja sin capuchón permitió obtener un mayor volumen de sangre en cada muestreo sin sobrepasar el 10% del volumen sanguíneo permitiendo la pronta recuperación de los animales.

Es importante que una técnica de venopunción sea de implementación sencilla, rápida y de bajo costo que permita la obtención de muestras de calidad y la recuperación del animal^{3,4,5}. Por tales motivos, recomendamos para operadores con experiencia en la técnica y en el manejo de los animales la punción submandibular con el empleo de las agujas 21G sin capuchón para los estudios que requieran un volumen máximo aceptable de sangre, el cual corresponde al 10% de su volumen sanguíneo, pero resulta necesario aclarar que para los operadores con poca experiencia recomendamos que utilicen las agujas 21G con capuchón recortado o lanceta ya que tener un límite de profundidad en la punción es fundamental para no cometer posibles errores al momento

de realizarla y provocar alguna lesión o daño tisular, permitiendo asegurar de esta manera la óptima recuperación de los animales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández, I., Peña, A., Del Teso, N., Pérez, V. y Rodríguez-Cuesta, J. Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010; 49(2):202-206.
2. Golde, W.T., Gollobin, P. y Rodriguez, L.L. Un método rápido, simple y humano para el sangrado submandibular de ratones usando una lanceta. *Lab Animal.* 2005; 34 (9):39-43.
3. Peña, M., Ríos, M.A., Díez, I., Cano, M.J., García, M.B., Del Ángel, J. y Pérez, C.C. Obtención de sangre por punción mandibular en el ratón: nuestra experiencia. *Revista Española de Investigaciones Quirúrgicas.* 2008; XI (1):3-7.
4. Regan, R. D., Fenyk-Melody, J. E., Tran, S.M., Chen, G. y Stocking K.L. Comparación de la extracción de sangre submental con los métodos retroorbital y submandibular en ratones (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2016; 55(5):570-576.
5. Sadler, A.M. y Bailey, S.J. Validation of a refined technique for taking repeated blood samples from juvenile and adult mice. *Lab Anim.* 2013;47(4):316-319.

Índice de autores

Aguirre, F. 323
Allasia, M. 323
Barbeito, CG 313
Bökenhans, RJ 337
Cattaneo, L. 323
Cicuttin, GL. 331
Clazure, M 313
Domínguez, P. 347
Estein, S.M. 347
Fernández, V. 347
García, J.P. 347
Guglielmo, AA. 331
Gutman, D. 323
Koncurat, MA 313
Moroni, C. 323
Nava, S. 331
Pérez, MA. 331
Rollón, N. 323
Ruiz, MF. 323
Vélez, CL 313
Wiemeyer, G. 331
Williamson, DM 313

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 corresponsal.

González, G¹., Pérez, HI.²

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 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

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@fvvet.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, G¹., PÉREZ, HI.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 reabsortivas 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, HI.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.

