

Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias

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

ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Volumen 28 n° 1 año 2008



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 28 n° 1, 2008

Publicación de la
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Autoridades

Decano

Dr. Edgardo Nosetto

Vicedecano

Bac. Reinaldo Fonrouge

Secretario Académico

Dra. Sara Williams

Secretario de Postgrado

Dr. Eduardo Mórtola

Secretario de Extensión Universitaria

Méd.Vet. Eduardo R. Pons

Secretario de Ciencia y Técnica

Dra. Cecilia Galosi

Secretario de Asuntos Estudiantiles

Méd.Vet. Fernando Marino

Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. María Gabriela Echeverría

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité Editorial

(Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi

Méd.Vet. Enrique Pennimpe

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

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

Evaluadores de trabajos de Analecta Veterinaria:

G. Antúnez Sánchez (Cuba), L Basso (Argentina), HA Brusco (Argentina), F Capano (Uruguay), A Conigliaro (Argentina), L Estol (Argentina), J Idiart (Argentina), RA Fernández (Argentina), J Lasta (Argentina), A Fernández Alosa (Brasil), H Tersolo (Argentina), J Zorzópulos (Argentina), E Gimeno (Argentina), C Schenk (Argentina), E Coppos (Argentina), LM Friche Passos (Brasil), JM Gutiérrez (Costa Rica), R Cacchione (Argentina), F Cortés Benavides (España), M Carballo (España), RM Dauder (España), R de Torres (Argentina), P Ostrosky-wegman (España), J Surralles Calonge (España), N Auza (Argentina), M Barrandeguy (Argentina), M Carballo (Argentina), JA Coppo (Argentina), C Corbellini (Argentina), F Costa (Argentina), C Eddi (Argentina), A Fosatti (Argentina), E Gentilini (Argentina), N Gómez (Argentina), S Gómez Cabrera (Argentina), C Gómez Dumm (Argentina), J González Tomé (Argentina), G. González (Argentina), A Guglielmone (Argentina), I von Landzewitsch (Argentina), N Leardini (Argentina), L León Vizcaino (España), C Lerena (Argentina), JC Lorente (Argentina), M Mariano (Argentina), H Molinuevo (Argentina), M Monina (Argentina), E Moras (Argentina), SJ de Oliveira (Brasil), A Parma (Argentina), J Pereira (Argentina), J Pistani (Argentina), B Ruksan (Argentina), B Rutter (Argentina), E Smitsaart (Argentina), J Troiano (Argentina), C Carfagnini (Argentina), J de Filippo (Argentina), C Machado (Argentina), I Sommerfelt (Argentina), P Soto (Argentina), E.Romero (Argentina), R Alberio (Argentina), A Soraci (Argentina).

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

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

ISSN 0365514-8 Versión Impresa

ISSN 1514-2590 Versión Electrónica

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

ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: CC 296 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

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

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

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

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

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

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

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

Revisión de estilo: Per. Eleonora Rolleri

Diseño

Prof.Dr. Nestor Oscar Stanchi

Diseño de Tapa

Andrea López Osornio (DCV)

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

(www.latindex.unam.mx),

Ulrich's International Periodicals Directory

(www.ulrichsweb.com)

Zoological Records

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

BIOSIS (<http://www.biosis.org>)

Infocyt <http://www.redhucyt.oas.org/infocyt/>

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

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

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

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

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

Impresión

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&

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



Foto de tapa: Facultad de Veterinaria (Ambulancia). Medios del siglo XX.

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

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

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

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

Impreso en papel libre de ácido

Printed in acid-free paper

Impreso en Argentina

Printed in Argentina



Artículos de Investigación

Research articles

- La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino.** Electron microscopy as a tool for canine semen evaluation. S Jurado, P Sarmiento, A Stornelli **7-14**
- Micotoxinas en alimentos: evaluación del daño cromosómico inducido por ocratoxina A en dos modelos experimentales *in vitro*.** Mycotoxins in Food: Assessment of Chromosomal Damage Induced by Ochratoxin A in Two In Vitro Experimental Models. JC De Luca, A Seoane **15-20**
- Estudio del comportamiento del pH en filetes de pejerrey de laguna (*Odonthestes bonariensis*), conservados con y sin vacío, utilizando distintos tratamientos y almacenados a temperaturas de 4, 0 y -1.5 °C.** Study of the behavior of pH in filets of lagoon's pejerrey (*Odonthestes bonariensis*), under aerobic and vacuum packaging conditions, using different treatments and stored at 4, 0 and- 1.5 °C. J Copes, K Pellicer, G del Hoyo, S Brocardo, L Gianuzzi **21-25**
- Criterios para la construcción de materiales curriculares y su evaluación en un curso de Biología Celular para estudiantes de Veterinaria.** Elaboration criteria for curricular materials and their evaluation in a Cell Biology course for Veterinary students. González NV, Flamini MA, Andrés Laube PF, Barbeito CG **26-37**

Comunicaciones breves

Short communications

- Multifocal Anaplastic Astrocytoma in the Lumbar-Sacral Spinal Cord of a 7 year-old Blood Hound.** Astrocitoma multifocal anaplásico en el segmento lumbosacro de la médula espinal en una perra Blood Hound de 7 años. NE Vecchio, TA Tobias **38-41**

Revisiones

Review

- Reconocimiento materno de la preñez e implantación del embrión: modelo bovino.** Maternal recognition of the pregnancy and embryo implantation: bovine model. López AP, Gómez LF, Ruiz Cortés ZT, Olivera M, Giraldo CA **42-47**
- Cianobacterias y cianotoxinas: rol de las microcistinas en la salud humana y animal y su detección en muestras de agua.** Cyanobacteria and Cyanotoxins: Role of Microcystins on Human and Animal Health and Their Detection In Water Samples DS Pérez, AL Soraci, MO Tapia **48-56**

LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA COMO HERRAMIENTA EN LA EVALUACIÓN DE SEMEN CANINO

S Jurado¹, P Sarmiento², A Stornelli³

¹Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. ²Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido. Facultad Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. ³Instituto de Teriogenología y Laboratorio Central, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: *La evaluación de semen canino puede brindar información importante relacionada con la capacidad fecundante del semen fresco o congelado. El estudio de la morfología espermática en el microscopio óptico provee información limitada sobre la estructura del espermatozoide. Sin embargo, el microscopio electrónico de barrido y el microscopio electrónico de transmisión pueden revelar más detalles de la estructura espermática. Es así que muchos espermatozoides considerados morfológicamente normales al microscopio óptico pueden presentar diferentes defectos al ser observados con un microscopio electrónico. El objetivo de este estudio fue describir defectos espermáticos observados en el semen canino fresco y los daños presentes en el semen canino luego del proceso de congelación. Se colectó la fracción espermática del semen de 8 caninos Ovejero Alemán. La misma fue diluida hasta una concentración espermática final de 100×10^6 /ml y envasada en pajuelas de 0,5 ml y congelada sobre vapores de nitrógeno líquido. Una alícuota de cada fracción espermática fue preparada inmediatamente después de la colección y la otra luego de la descongelación. Las mismas fueron observadas con microscopio electrónico de barrido y microscopio electrónico de transmisión. Se describieron las anomalías observadas en el semen fresco y los daños espermáticos ocurridos en el semen congelado.*

Palabras clave: semen- canino- ultraestructura- microscopía electrónica.

ELECTRON MICROSCOPY AS A TOOL FOR CANINE SEMEN EVALUATION

Abstract. *Canine semen evaluation can give important information related to the fresh or frozen-thawed semen fertilizing ability. However routine test can not predict accurately semen fertilizing ability. Assessment of sperm morphology at the light microscopy level can provide only limited information on the structure of the spermatozoa. Transmission electron microscope and scanning electron microscope can reveal more details of sperm structure. Many spermatozoa considered morphologically normal at light microscopic level could have many defects when observed with an electron microscope. The aims this study was described morphological defects in canine fresh semen and damage observed in frozen-thawed semen. The sperm fraction was collected from 8 dogs, each was diluted in a two step dilution to a final sperm concentration of 100×10^6 /ml and were packed in 0.5 ml straws. The straws were frozen in a Styrofoam box 4 cm above liquid nitrogen. One sample was prepared immediately after collection and the other samples were taken after freezing-thawing. Samples were observed with a transmission electron microscope and scanning electron microscope. Morphological defects and sperm damage were described in fresh and frozen-thawed semen.*

Key words: semen- canine- ultrastructure- electron microscopy

Fecha de recepción: 20/06/07

Fecha de aprobación: 03/11/07

Dirección para correspondencia: Susana Jurado, Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. CC 296 (B1900ABW) La Plata Telefax: 54-221-4211276 **E-mail:** sjurado@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La evaluación seminal rutinaria es un estudio que brinda información sobre la cantidad y calidad de los espermatozoides presentes en el eyaculado y es imprescindible para determinar tanto la producción espermática como la funcionalidad de las glándulas sexuales accesorias (1). Este método también permite evaluar la calidad de semen criopreservado al descongelado (2).

Los indicadores utilizados en el análisis del eyaculado son: volumen, color, aspecto, concentración de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides móviles, porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta, porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y tipo de morfoanomalía. Además, se evalúan las características fisicoquímicas del semen (pH, osmolalidad y viscosidad), la bioquímica seminal (fructuosa, ácido cítrico, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina), se realizan estudios inmunológicos (3) y microbiológicos (4, 5). También se investiga la presencia de células no espermáticas en el eyaculado (6).

A pesar de su utilidad, la evaluación de semen mediante pruebas de contrastación rutinarias no ofrece una información completa de la capacidad fecundante de un eyaculado o del semen criopreservado (7). Es necesario realizar otras pruebas (prueba de sobrevida espermática, capacitación espermática espontánea e inducida, pruebas de estrés oxidativo, prueba hiposmótica, etc.) que contribuyan a evaluar la capacidad fecundante del semen (8). De esta manera se puede obtener información adicional al espermograma básico y estimar con más certeza la capacidad fecundante del eyaculado, gracias a la combinación de las diferentes pruebas (9). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las pruebas *in vitro* nunca podrán predecir exactamente cual será la capacidad fecundante del eyaculado en el momento que éste sea depositado en el aparato genital femenino.

La motilidad y el número de los espermatozoides son dos de los tres pilares que sostienen la estructura diagnóstica del análisis del eyaculado. La morfología constituye el tercer pilar. La evaluación morfológica de semen comprende la diferenciación cuali y cuantitativa de espermatozoides normales y anormales, y la distinción de otras células no espermáticas. Entre éstas se incluyen las células epiteliales procedentes del tracto reproductivo, células de la línea seminal y leucocitos (colectivamente denominadas "células redondas") (6).

A pesar de su importancia, el rol de la morfología espermática en el estudio de la fertilidad del semen ha sido muy controversial. Sin embargo para la mayoría de los investigadores no hay dudas de su importancia en el diagnóstico

de la fertilidad en los animales y en el hombre (10, 11, 12). Es así que la morfología según criterio estricto (13) es un excelente indicador de funcionalidad/disfuncionalidad espermática global o parcial (14). Sin bien el impacto de las morfoanomalías sobre la fertilidad ha sido bien estudiado en bovinos, está poco estudiado en los animales de compañía.

Aunque la morfología espermática puede evaluarse con un microscopio de contraste de fase en las especies de producción, el principal método para diferenciar entre células normales y anormales en caninos y felinos es el uso de extendidos de semen teñido con coloraciones especiales como Spermac® (2, 15). El estudio morfológico permite detectar anomalías de la cabeza, pieza intermedia y cola, defectos acrosomales específicos o variaciones del tamaño de las cabezas. No obstante, este método está basado en criterios subjetivos, los cuales producen una gran variabilidad dentro y entre los laboratorios (16). El uso del sistema CASA provee mediciones más objetivas y confiables de la motilidad y morfología espermática (17). Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una calibración exacta (18).

La evaluación morfológica usando microscopía electrónica de transmisión o de barrido es muy valiosa porque provee información detallada a cerca de la morfología e integridad de la célula espermática que no es posible obtener por medio de otras metodologías. Esta información posibilita estimar la fertilidad del semen analizado con mayor exactitud que otras pruebas de análisis de semen *in vitro*. Los detalles ultraestructurales de cualquier alteración morfológica del semen o el grado de daño de membrana son mejor evaluados usando este tipo de microscopios de alta resolución (19, 20).

El microscopio electrónico de barrido permite examinar el espermatozoide completo a un nivel de magnificación elevado y con mayor poder de resolución que el microscopio óptico. Además, el secado por punto crítico empleado en este tipo de microscopía evita las deformaciones de las células espermáticas apreciándose mejor las estructuras superficiales (21, 22). Por otro lado, el microscopio electrónico de transmisión es una herramienta utilizada, principalmente, con finalidad diagnóstica ya que permite realizar la evaluación de las estructuras intracelulares e identificar numerosos defectos estructurales, tanto de la cabeza como de la cola, que interfieren en el proceso de la fecundación. Por lo tanto, la implementación de estudios ultraestructurales podría ser de gran utilidad en la clínica andrológica, sin embargo, no son aprovechados en su totalidad. Así mismo la ultramicroscopía podría ser sumamente beneficiosa en el área de la investigación.

Preservar la capacidad fecundante de los espermatozoides ha sido un punto crítico desde el momento en que se implementaron las técnicas de criopreservación de semen para la realización de inseminación artificial (23). Para establecer el grado de injuria asociado al proceso de congelado y descongelado del semen es necesario realizar una serie de estudios, de los cuales el examen morfológico estructural y ultraestructural es de vital importancia (24, 25).

El uso de las técnicas de microscopía electrónica de transmisión es sumamente útil en el diagnóstico de una alteración patológica del flagelo espermático conocida como disquinesia ciliar primaria o síndrome de Kartagener. Este síndrome está caracterizado por la disfunción parcial o total del flagelo por ausencia de uno o los dos brazos de dineína de los microtúbulos que constituyen el axonema, y se asocia a sinusitis, bronquiectasia y a esterilidad masculina (26). La falla en la concepción se debe a una astenozoospermia total, asociada a la disquinesia ciliar primaria, alteración observable únicamente mediante microscopía electrónica (27).

La evaluación morfológica de semen fresco mediante microscopía electrónica contribuye a valorar la funcionalidad testicular en relación al desarrollo seminal y el proceso de maduración epididimal. Se deben analizar los espermatozoides normales, los espermatozoides con anomalías primarias y los espermatozoides con anomalías secundarias. Las anomalías primarias incluyen defectos de formación del espermatozoide en el testículo, como por ejemplo, macrocefalia, microcefalia, bicefalia, acrosomas anormales o inexistentes, ausencia de porción intermedia, cola enroscada, o biflagelados; mientras que las anomalías secundarias incluyen defectos espermáticos relacionados con el manejo de la muestra o con la maduración espermática, tales como porciones intermedias dobladas, colas dobladas, o presencia de gotas citoplasmática distal (6). Por otra parte, la evaluación ultramicroscópica del semen criopreservado permite determinar el grado y localización de injuria celular causado por la criopreservación (28).

El objetivo de este trabajo fue utilizar la microscopía electrónica de transmisión y de barrido como parte de la evaluación morfológica del semen fresco y congelado-descongelado en caninos.

MATERIALES Y MÉTODOS ANIMALES Y RECOLECCIÓN DE SEMEN

Se utilizaron 8 caninos, ovejero alemán, de entre 2 y 5 años, en actividad sexual y con buena calidad seminal. Los animales fueron alojados en caniles con un régimen de luz natural y alimentados con alimento balanceado de calidad

Premium. Como criterio de aceptación de un macho como animal experimental se tomaron los siguientes parámetros seminales: 1) Concentración espermática total: $\geq 200 \times 10^6$, 2) Motilidad progresiva individual: $\geq 70 \%$, 3) Porcentaje de espermatozoides vivos: $\geq 80 \%$, 4) Porcentaje de malformaciones espermáticas primarias y secundarias: $<20 \%$, 5) Fosfatasa alcalina: ≥ 4000 U/L (6, 29, 30, 31, 32).

Se recolectó semen una vez por semana durante tres semanas. La fracción espermática del semen fue dividida en dos alícuotas, una de ellas fue procesada inmediatamente luego de la recolección para microscopía electrónica de barrido y transmisión. La otra alícuota de semen fue diluida con Tris base yema de huevo con el agregado de 5% de glicerol alcanzando una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml. El semen diluido fue envasado en pajuelas de 0,5 ml, congelado sobre vapores de nitrógeno líquido y almacenado hasta su evaluación (33).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Semen fresco:

La fracción espermática se diluyó en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4) y se fijó con glutaraldehído al 1 % durante 2 horas. La dilución se filtró a través de un filtro Millipore (5μ de diámetro) y los filtros se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (10 % a 100 %). Posteriormente, los espermatozoides depositados sobre los filtros fueron transferidos a acetato de amilo y sometidos al secado por punto crítico (Balzer CP 30) y finalmente se metalizaron con oro-paladio (Jeol Fine Coat 1100). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6360 LV.

Semen criopreservado

Las pajuelas de semen criopreservado fueron descongeladas a 37°C durante 1 minuto (34) y posteriormente procesadas como se describió en semen fresco.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Semen fresco:

El semen fresco se fijó en glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4). Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y el pellet obtenido permaneció en el fijador durante 2 horas a 4°C . La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1 % durante 1 hora a 4°C y posteriormente, el semen se deshidrató en una serie creciente de alcoholes y se incluyó en resina Epoxi. Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron examinados y fotografiados en

un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II

Semen criopreservado

Las pajuelas de semen criopreservado fueron descongeladas a 37 °C durante 1 minuto (34) y posteriormente procesadas como se describió en semen fresco.

CRITERIOS UTILIZADOS PARA LA EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE SEMEN

En cada una de las muestras analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido se estudiaron 100 espermatozoides. En las muestras de semen fresco se clasificaron los espermatozoides en células normales y células con morfoanomalías, clasificándolas según el tipo de anomalía. En las muestras de semen congelado-descongelado se clasificaron los espermatozoides en células normales y células dañadas, clasificándolas según el tipo y localización del daño observado.

RESULTADOS

Se observó que los espermatozoides caninos poseen los mismos componentes que otros espermatozoides eucariotas.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

En el semen fresco la mayoría de los espermatozoides mostraron una cabeza oval normal con una membrana homogénea e intacta. También el cuello y las diferentes partes de la cola fueron morfológicamente normales. Se observaron algunas alteraciones tales como gota citoplasmática distal (Figura 1) y cola enrollada. En las muestras congeladas-descongeladas, los espermatozoides mostraron daño acrosomal, cuellos rotos y colas desprendidas (Figura 2). También se observaron muchos espermatozoides con acrosomas intactos pero con colas rotas. Por otro lado, si bien se vieron muchas células intactas algunos espermatozoides exhibieron daño acrosomal y colas intactas.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

En el semen fresco los espermatozoides normales estuvieron compuestos por una cabeza y una cola. En la cabeza se observaron tres áreas claramente distintivas: 1) el acrosoma, cubriendo a modo de capucha más de la mitad del núcleo, 2) la región ecuatorial justo detrás del acrosoma y 3) la región pos-ecuatorial. En la cola se distinguieron las tres porciones: la pieza intermedia, la pieza principal y pieza terminal. La pieza intermedia estuvo conectada con la región pos-ecuatorial

de la cabeza por el cuello. Las mitocondrias, estuvieron contenidas en la pieza intermedia ordenadas en forma helicoidal en torno al axonema. Además, en la pieza principal se observó la vaina de refuerzo y en la pieza terminal se detectó la porción final del axonema. El axonema se observó a lo largo de todo el flagelo y estuvo formado por 9 pares de microtúbulos organizados en forma radial alrededor de 2 filamentos centrales.

En el semen fresco se identificaron espermatozoides con defectos acrosomales (lipping), macrocefalia y defecto de Dag (Figura 3). La pieza media mostró alteraciones tales como la pérdida del axonema y presencia de gotas citoplasmáticas. Las típicas desviaciones de la cola fueron fracturas o enrollamiento, combinación de una sección proximal y distal de la cola rodeada por una membrana común, colas dobles o triples. En algunos espermatozoides con flagelos morfológicamente normales observados en el microscopio óptico, fue posible identificar mediante el MET deficiencia, ausencia o alteraciones en los brazos de dineína, alteraciones en los microtúbulos, transposición de dobletes periféricos a posición central, presencia de dobletes o microtúbulos supernumerarios y ausencia de dobletes o microtúbulos.

En las muestras de semen sujetas a la congelación/descongelación algunos espermatozoides exhibieron pérdida o daño de la membrana plasmática sobre la región de la cabeza. En cortes sagitales a través de la cabeza, se observó que el plasmolema estaba desprendido en la región del acrosoma. En la mayoría de los casos la membrana plasmática permaneció intacta (Figura 4). La formación de grandes espacios entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa fue una alteración típica en los espermatozoides congelados/descongelados. Raramente se observaron quistes y desintegración del plasmolema sobre el acrosoma. También se observó la presencia de espacios entre la membrana acrosomal interna y el núcleo. Las alteraciones más comunes vistas en espermatozoides caninos congelados/descongelados fueron debidas al proceso de reacción acrosómica falsa. Como consecuencia de la reacción acrosómica falsa se observaron espermatozoides con vesiculación de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, tumefacción del acrosoma con formación de espacios irregulares entre la membrana acrosomal interna y externa y entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática. A nivel del flagelo, la membrana plasmática también sufrió alteraciones. En general, la membrana plasmática de la pieza media permaneció más intacta que la pieza principal y terminal después de la congelación-descongelación.

Cuando se compararon los porcentajes de células dañadas en el semen fresco versus

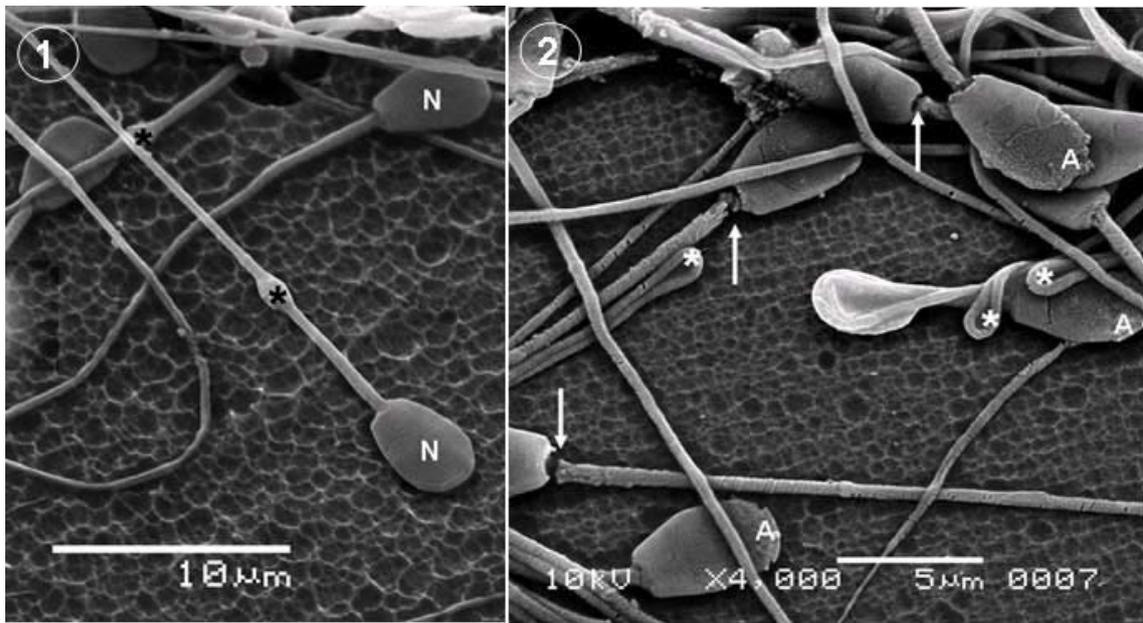


Figura 1- Semen fresco (MEB). Células espermáticas de perro. Se observan gotas citoplasmáticas (asteriscos). N: núcleo (Barra: 10 µm). **Figura 2- Semen congelado-descongelado (MEB).** Se observan colas desprendidas (flechas) y colas plegadas (asteriscos). Además se distingue daño acrosómico (A). (X 4000).

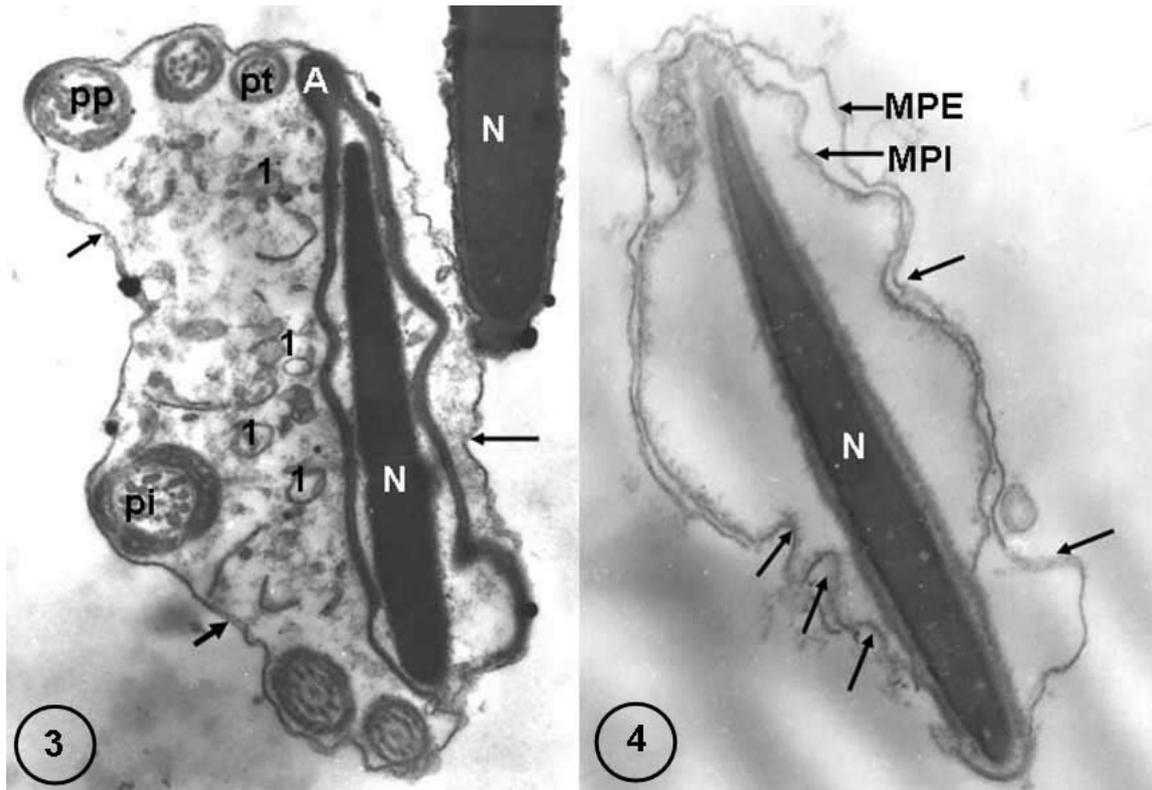


Figura 3 – Semen fresco (MET). Defecto de Dag: caracterizado por el enrollamiento de la cola alrededor de la cabeza envuelta por una membrana plasmática intacta (flechas). Se observa el acrosoma (A) desprendido y material membranoso (1) en el citoplasma. Se distinguen cortes transversales de la pieza intermedia (pi), pieza principal (pp) y pieza terminal (pt) con diferente grado de distorsión de la arquitectura normal del axonema. N: núcleo. (X 30000). **Figura 4- Semen congelado-descongelado (MET).** Espermatozoide con membrana plasmática intacta pero muy hinchada y con presencia de pliegues (flechas). MPE: membrana plasmática externa, MPI: membrana plasmática interna, N: núcleo (X 40000)

el porcentaje de espermatozoides dañados en el semen descongelado se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$), siendo mayor el porcentaje de células intactas en el semen fresco.

DISCUSIÓN

La ultramicroscopía ha permitido identificar diversas morfoanomalías espermáticas en semen canino. En nuestro estudio, las anomalías espermáticas observadas en el semen fresco mediante MET y MEB concuerdan con los hallazgos comunicados por Holt (32).

Las pruebas rutinarias de contrastación *in vitro*, si bien pueden estimar si los espermatozoides cuentan con diferentes atributos necesarios para llevar a cabo la fecundación, no pueden predecir exactamente la capacidad fecundante de los mismos *in vivo*. Sin embargo, la información obtenida en cada una de esas pruebas y la asociación de los resultados mejora el valor predictivo de la fertilidad potencial de un semen determinado (8, 35, 36). Es así que los datos obtenidos mediante microscopía electrónica podrían, no solo contribuir a establecer una mejor estimación de la capacidad fecundante del semen fresco y/o criopreservado analizado, sino también determinar el tipo y localización del daño ocurrido durante los procesos de criopreservación.

La morfología del flagelo espermático es un parámetro muy importante para diagnosticar trastornos de fertilidad. Los estudios ultraestructurales de las colas de espermatozoides de pacientes con disquinesia ciliar, revelaron que los flagelos poseen una desorganización completa de los microtúbulos con patrón no reconocible. También fue posible observar la ausencia total del axonema mediante microscopía electrónica de transmisión (37). En nuestro estudio, en el semen fresco de los perros analizados fue posible observar la ausencia total del axonema en algunos espermatozoides. Los perros estudiados eran fértiles y producían camadas normales en viabilidad y número de cachorros, probablemente relacionado con el escaso número de espermatozoides que presentaron la alteración descrita en el axonema.

Los espermatozoides están sometidos a diferentes tipos de estrés, durante los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación, pudiendo producir alteraciones celulares observables sobre la ultraestructura del espermatozoide. Los efectos deletéreos pueden observarse en forma inmediata al matar al espermatozoide o incapacitarlo para la fecundación por daño del acrosoma o de la membrana plasmática. Así mismo los procesos de congelación y descongelación podrían reducir la longevidad de la célula espermática por alteración de la estructura de la membrana plasmática (38), lo cual explicaría por qué la tasa de concepción obtenida con la

inseminación intrauterina es mejor que la obtenida por inseminación intravaginal al usar semen congelado/descongelado (39). Las alteraciones observadas en los espermatozoides congelados-descongelados, en nuestro trabajo, se corresponden con los comunicados previamente por otros autores (20; 39). Así mismo las diferencias observadas entre el porcentaje de espermatozoides dañados en el semen descongelado en comparación con el fresco se relacionarían con los diferentes tipos de estrés sufrido por las células durante la congelación/descongelación en concordancia con lo comunicado por Watson (40).

El espermatozoide es una célula altamente especializada con una membrana plasmática que no solamente ayuda a preservar la integridad celular, sino que también participa en los eventos de fusión de membrana asociados con la fecundación. En el caso del semen criopreservado, se considera que la membrana plasmática es el sitio en el cuál se inicia la injuria inducida por la congelación (41). Nuestras observaciones nos permitieron confirmar que los procesos de congelación/descongelación producen alteraciones importantes en la membrana plasmática y acrosómica así como en la distribución del contenido acrosomal. Los efectos deletéreos observados en las membranas de las cabezas de los espermatozoides posteriores a la dilución, congelación y descongelación podrían explicar por qué, generalmente, la fertilidad del semen congelado/descongelado es más baja que la del semen fresco (42).

Los daños que observamos mediante el MET en el semen congelado/descongelado se corresponden con los comunicados por Ström Host y col (43) quienes describieron que el principal tipo de daño que afecta al acrosoma durante la congelación/descongelación fue la alteración acrosómica, identificada mediante microscopía de luz como una distribución irregular del contenido acrosómico e hinchamiento. En nuestro estudio observamos alteraciones ultraestructurales en el semen criopreservado, tales como vesiculación de la membrana acrosomal externa, hinchamiento y pérdida de la homogeneidad y densidad del contenido acrosómico. La detección de estos cambios en el semen criopreservado no afectaría necesariamente la capacidad del espermatozoide para fecundar un oocito, pero podrían acortar la sobrevivencia de la célula espermática. En coincidencia con otros investigadores (20, 44) nuestros hallazgos de alteración morfológica en las membranas espermáticas indicarían que la criopreservación de semen induce la reacción acrosómica en una parte de la población de espermatozoides del semen criopreservado, acortando la sobrevivencia espermática y/o disminuyendo la capacidad fecundante tal como fue sugerido por Jones y Steward (45).

Barthelemy y col (46) establecieron que el efecto más llamativo durante la criopreservación de semen fue una declinación en el porcentaje de espermatozoides intactos a nivel del acrosoma. En nuestro estudio pudimos observar un porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto significativamente superior en el semen fresco. El MET permitió detectar daños acrosómicos de diferente tipo y magnitud.

Concluimos que la microscopía electrónica es un método que permite evaluar las características morfológicas ultraestructurales de semen fresco y semen congelado/descongelado de perro y que puede aplicarse en otras especies animales y el hombre. La evaluación morfológica de semen es un importante componente de la valoración de la calidad seminal del macho canino porque la integridad espermática se correlaciona con la capacidad fecundante del eyaculado. Por otra parte la identificación precisa de los defectos espermáticos y su correlación con la fertilidad tiene implicancias directas en los programas reproductivos en animales de pedigree.

AGRADECIMIENTOS

En la realización de este trabajo se contó con la colaboración del Ht. Silvio Igal del Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

BIBLIOGRAFÍA

1. Padrón Durán RS, Fernández López GM, Gallardo Ríos M. Interpretación del análisis seminal. *Rev Cubana Endocrinol* 1998; 9 (1): 81-90
2. Stornelli MC, Stornelli MA. Evaluación, criopreservación de semen e inseminación artificial en el gato doméstico. *Asociación Argentina de Medicina Felina, Anuario* 2002; p: 87-90
3. ESHRE Monographs: Manual on Basic Semen Analysis. Ed. Oxford University Press, 2002; p. 1-24
4. Levy R, Grattard F, Maubon I, Ros A, Pozzetto B. Bacterial risk and sperm cryopreservation. *Andrologia*, 2004; 36 (5): 282-285
5. Veznik Z, Pospisil L, Svecova D, Zajicova A, Unzeitig V. Chlamydiae in the ejaculate: their influence on the quality and morphology of sperm. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2004; 83 (7): 656-660
6. Johnston SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 1991; 21 (3): 545-551
7. Dunphy BC, M Neal L, Cooke ID. The clinical value of conventional semen analysis. *Fertil Steril*, 1989; 51 (2): 324-329
8. Montes JM, Cantú L, Cánepa ME, Alciaturi J, Machado MJ, Brüné MN. ¿Es posible obtener del estudio de semen mejores predictores de fertilidad?. *Reproducción Humana*, 2004; 4: 15-24
9. Ludwig G, Frick J. *Spermatology: Atlas and Manual*.

Ed: Springer-Verlag, 1989; p: 3-41

10. Schirren C, Eckhardt U, Jachczik R, Carstensen CA. Morphological differentiation of human spermatozoa with Testsimplets slides. *Andrologia*, 1977; 9 (2): 191-192
11. Swerdloff RS, Overstreet JW, Sokol RZ, Rajfer J. UCLA conference. Infertility in the male. *Ann Intern Med*, 1985; 103: 906-919
12. Pinatel MC. Semen evaluation: technique of study. *Ann Biol Clin*, 1985; 43(1): 49-53
13. Kruger TF, Acosta AA, Simmon KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1988; 49 (1): 112-117
14. Claassens OE, Menkveld R, Franken DR, Pretorius E, Swart Y, Lombard CJ, Kruger TF. The Acridine Orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod*, 1992; 7 (2): 242-7
15. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, de la Sota RL. Inseminación con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Veterinaria*, 2001, 21 (1): 58-66
16. Zaini A, Jennings MG, Baker HW. Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men?. *Int J Androl*, 1985; 8 (6): 427-435
17. Irvine S. Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment. *Hum Reprod*, 1995; 10 (Suppl 1): 53-59
18. Vestergren J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 2002; 57: 149-179
19. Oettlé EE, Soley JT. Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopy study. *Vet Med Rev*, 1988; 59: 28-70
20. Rodríguez-Martínez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1993; Suppl 47: 279-285
21. Liakatas J, Williams AE, Hargreave TB. Scoring sperm morphology using the scanning electron microscope. *Fertil Steril*, 1982; 38 (2): 227-232
22. Sterzik K, De Santo M, Uhlich S, Gagsteiger F, Strehler E. Glass wool filtration leads to a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes: an ultrastructural analysis. *Hum Reprod*, 1998; 13 (9): 2506-2511
23. Polge C, Smith A, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temp. *Nature* 164, 1949: p: 666
24. Hammerstedt R, Graham J, Nolan J. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl*, 1990; 11: 73-88
25. Parks J, Graham J. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 1992; 38: 209-222
26. Ceccaldi PF, Carre-Pigeon F, Youinou Y, Delepine

S. Jurado y col.

- B, Bryckaert PE, Harika G, Quereux C, Gaillard D. Kartagener's syndrome and infertility: observation, diagnosis and treatment. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2004; 33 (3): 192-194
27. Afzelius BA, Eliasson R, Johnse O, Lindholmer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Bio*, 1975; 66 (2): 225-232
28. Peña Martinez AI. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, 2004; 82-83: 209-224
29. Dott HM, Foster GC. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'life-dead' stain. *J Reprod Fertil*, 1972; 29 (3): 443-445
30. Pursel VG, Johnson LA. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1974; 1(2): 63-68
31. Fontbonne A, Badinand F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *J Reprod Fertil Suppl*, 1993; 47: 325-327
32. Holt WV, Morris GJ, Coulson G, North RD. Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J Exp Zool*, 1998; 246 (3): 305-314
33. Stornelli MA, Savignone C, Stornelli MC, Tittarelli CM, Jurado SB, Giménez F, de la Sota RL. Fertility and ultrastructural analysis of frozen-thawed dog spermatozoa with different concentrations of Equex STM Paste. *Theriogenology*, 2006; 66: 664-665
34. Morton DB, Bruce SG. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, 1989; 39: 311-316
35. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol*, 1991; 164 (2): 542-551
36. Catena M, Cabodevila J. Evaluación de semen bovino congelado. *Taurus*, 1999;1 (3): 18-31
37. Lungarella G, Fonzi L, Burrini AG. Ultrastructural abnormalities in respiratory cilia and sperm tails in a patient with Kartagener's syndrome. *Ultrastruct Pathol*, 1982; 3 (4): 319-323
38. Burgess CM, Bredt JC, Plummer JM, England GC. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cyopreservation. *J Reprod Fertil Suppl*, 2001; 57: 357-363
39. Ström Host B, Rota A, Andersen-Berg K, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H. Canine sperm head damage after freezing-thawing. Ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod Dom Anim*, 1998; 33: 77-82
40. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 2000; 60-61: 481-492
41. Morris G J. Effects of low temperature on biological membranes. Ed: Academic press (London), 1981; p: 241-262
42. Mahadevan MM, Trouson AO. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fertile Steril*, 1984; 41 (2): 287-293
43. Ström Host B, Rota A, Linde-Forsberg C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, 1997; 48: 247-256
44. Alvarenga MA, Landim Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J*, 2000; 32 (6): 541-545
45. Jones RC, Stewart DL. The effects of cooling to 5 degrees C and freezing and thawing on the ultrastructure of bull spermatozoa. *J Repro Fertil*, 1979; 56 (1): 233-238
46. Barthelemy C, Royere D, Hammah S, Lebos C, Tharanne MJ, Lansac J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Arch Androl*, 1984; 25 (1): 29-40

MICOTOXINAS EN ALIMENTOS: EVALUACIÓN DEL DAÑO CROMOSÓMICO INDUCIDO POR OCHRATOXINA A EN DOS MODELOS EXPERIMENTALES *IN VITRO*

JC De Luca, A Seoane

Instituto de Genética Veterinaria IGEVET-CCT-La Plata-
CONICET-UNLP "Ing. Fernando Noel Dulout"
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: El objetivo del presente estudio consistió en evaluar la inducción de alteraciones cromosómicas por la micotoxina Ocratoxina A (OTA). Se analizó la inducción de Aberraciones Cromosómicas Estructurales (ACE) e Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH) en linfocitos de cerdo, así como la inducción de aneuploidía mediante el ensayo anafase-telofase en células CHO (Chinese Hamster Ovary Cells). Se ensayaron tres dosis de esta sustancia: 0,25; 0,50; 1,00 µg/ml. El análisis citogenético reveló un aumento significativo en la frecuencia de fracturas de monocromátida ($p < 0.01$) respecto del control. En el caso de los ICH no se observaron diferencias significativas respecto del control ($p > 0.05$). La frecuencia de cromosomas y fragmentos rezagados inducidos por las tres dosis de ocratoxina A no se incrementó en forma significativa ($p > 0.05$), mientras que la frecuencia de puentes de cromatina se incrementó levemente, encontrándose en el límite de significancia. Por otra parte, la acción citotóxica de la OTA resultó tan importante como la genotóxica en el rango de dosis utilizadas. En base a los antecedentes antes mencionados y los resultados obtenidos, podría sugerirse que la acción carcinogénica de esta sustancia se debería más a mecanismos epigenéticos que genéticos.

Palabras clave: micotoxinas, ocratoxina A, aberraciones cromosómicas, linfocitos de cerdo, ensayos *in vitro*

MYCOTOXINS IN FOOD: ASSESSMENT OF CHROMOSOMAL DAMAGE INDUCED BY OCHRATOXIN A IN TWO *IN VITRO* EXPERIMENTAL MODELS

ABSTRACT: The objective of the present study was to analyze the induction of chromosome aberrations by the mycotoxin ochratoxin A (OTA). The frequency of structural chromosome aberrations (SCA) and sister chromatid exchanges (SCE) in pig lymphocytes, as well as the induction of aneuploidy by means of the anaphase-telophase test in CHO (Chinese Hamster Ovary Cells) cells was evaluated. Three doses of OTA were tested: 0,25; 0,50; 1,00 µg/ml. The cytogenetic analysis of pig lymphocytes showed only a significant increase in the frequency of monochromatid breaks in relation with control group ($p < 0.01$). On the other hand no significant differences for SCE were observed ($p > 0.05$). The frequencies of lagging chromosomes and fragments induced by the three tested doses of OTA were not increased in significant form respect to the controls ($p > 0,05$), and the frequency of chromatin bridges was increased slightly, being in the significance limit. In addition, the based on the above background and the results obtained could suggest that the carcinogenic action of OTA should be more epigenetic mechanisms than genetic.

Key words: Mycotoxins, Ochratoxin A, Chromosome Aberrations, Pig Lymphocytes, *In Vitro* tests.

Fecha de recepción: 29/08/07

Fecha de aprobación: 29/12/07

Dirección para correspondencia: Julio Cesar De Luca. Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET) CONICET-UNLP "Ing. Fernando Noel Dulout". Facultad de Ciencias Veterinarias. CC 296 B1900AVW La Plata, Argentina.
E-mail: jdeluca@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Existen varios tipos de hongos que bajo determinadas condiciones de temperatura y humedad pueden crecer en los ambientes de almacenamiento, transporte o procesamiento de los granos provocando su contaminación con toxinas (1). Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos que no son indispensables para su crecimiento y desarrollo. Son compuestos de bajo peso molecular que presentan una variada estructura química y propiedades biológicas (1). Pueden ocasionar cambios patológicos tanto en el hombre como en diferentes especies animales, por ejemplo: inmunotoxicidad, mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, toxicidad renal y neurotoxicidad entre otras (2). Los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* son los tres más importantes productores de micotoxinas que afectan tanto a la salud humana como a la animal (3).

Dado que se ha encontrado un gran número de estos metabolitos como contaminantes de productos agrícolas, las micotoxinas han sido objeto de diferentes tipos de estudios debido no sólo a su impacto en la salud humana sino además en la producción animal y en la comercialización de productos alimenticios. En los últimos años se han publicado revisiones acerca de los efectos fisiológicos de las micotoxinas en diferentes especies de animales domésticos (4 y 5). Así también se ha estimado que el impacto de las micotoxinas en la industria alimenticia y ganadera provoca pérdidas económicas importantes. Por ejemplo, en el caso de Estados Unidos y Canadá estas pérdidas alcanzaron unos 5 billones de dólares (6).

La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina clorofenólica frecuente en alimentos (Figura I). Si bien su aislamiento se produjo a partir del hongo *Aspergillus ochraceus* (7), el principal productor de Ocratoxina A (OTA) en los países templados es *Penicillium verrucosum*, mientras que *Aspergillus spp.*, lo es en los países cálidos y tropicales (8-9). Si bien se atribuye a esta micotoxina ser al agente causal de la nefropatía endémica de los Balcanes (10), íntimamente relacionada con la nefropatía porcina, ha sido considerada como no genotóxica durante mucho tiempo debido a la obtención de resultados negativos o levemente positivos en los ensayos estándar que emplean organismos procariotas (11-12). Más recientemente se ha demostrado su potencial mutagénico en células de mamífero (13) y ha sido clasificada como un posible carcinógeno (categoría 2B por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, IARC) (14). El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la inducción de alteraciones cromosómicas por Ocratoxina A (OTA) empleando dos modelos experimentales diferentes: a) inducción de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) e intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en

linfocitos de cerdo y b) inducción de aneuploidía mediante el ensayo anafase-telofase en células CHO (Chinese Hamster Ovary Cells).

MATERIALES Y MÉTODOS

COMPUESTO A ENSAYAR

Para la realización de los experimentos se utilizó Ocratoxina A (OTA) de máxima pureza (Sigma, St. Louis, MO, USA). Previo al análisis de la inducción de alteraciones cromosómicas, se evaluó el efecto citotóxico de la micotoxina. Para tal fin se ensayaron 6 dosis diferentes del compuesto: 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 y 10,00 µg/ml. Al mismo tiempo un cultivo al cual no se le agregó ocratoxina A se utilizó como control. Se eligieron las tres dosis más bajas debido a que a partir de 1 µg/ml la toxicidad del compuesto impidió el análisis de un número adecuado de células en división.

INDUCCIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN LINFOCITOS DE CERDOS

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de cerdo provenientes de un matadero, las mismas se recogieron en frascos estériles con 1 ml de heparina. Los linfocitos se cultivaron con medio de cultivo Ham F10 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (Laboratorios Notocor, Córdoba, Argentina) y antibióticos (penicilina 50 UI y estreptomycin 50 µg/ml) (Bagó, Buenos Aires, Argentina). Como mitógeno se utilizó fitohemaglutinina (1 µg/ml) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA).

Se analizaron dos tipos de aberraciones cromosómicas: a) aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) y b) intercambios de cromátidas hermanas (ICH). En el primer caso, las muestras se cultivaron en estufa a 37 °C durante 48 h. Para el análisis de ICH, el medio de cultivo fue suplementado con 5-bromodeoxiuridina y las muestras se cultivaron en estufa a 37 °C durante 72 h. En ambos casos los cultivos se realizaron siempre en presencia de OTA. La elección del tiempo para el análisis de ICH se realizó en base un estudio previo en el que se estableció la aparición de la mayor frecuencia de células en segunda división, etapa en la cual se estudia este tipo de alteración. Las preparaciones cromosómicas se realizaron de acuerdo con la técnica de secado al aire. Las mismas se tiñeron con el colorante de Giemsa al 5 %. El análisis citogenético se hizo a ciegas y fue realizado por un solo investigador. Para el conteo de ACE se realizaron tres repeticiones con sangre proveniente de diferentes animales y se contabilizaron 100 metafases por cada una de ellos y por cada dosis estudiada, es decir, un total de 300 células por punto experimental, excepto en los casos en los que el grado de cito toxicidad no lo permitió. El análisis estadístico se llevó a cabo

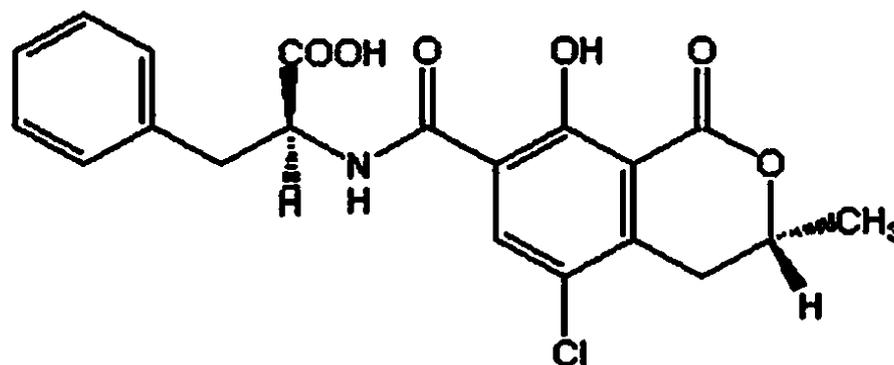


Figura I. Estructura química de la Ocratoxina A
Figure I. Chemical structure of Ochratoxin A

Tabla 1. Aberraciones cromosómicas estructurales inducidas por OTA en linfocitos de cerdos
Table 1. OTA induced chromosomal aberrations in pig lymphocytes

Tratamiento	Células		Alteraciones cromosómicas (%)				
	analizadas	normales	LA	B'	B''	Dic	FR
Control	300	294	1,00	0,33	0,33	0,00	0,33
0,25 µg/ml	306	283	0,98	2,29	0,98	1,63	1,63
0,50 µg/ml	293	273	0,00	3,41	1,71	1,37	0,34
1,00 µg/ml	206	191	0,49	3,88	0,49	0,97	1,46

LA: lesiones acromáticas; B': fracturas de monocromátida; B'': fracturas de isocromátida; Dic: cromosomas dicéntricos; FR: fragmentos cromosómicos

mediante la prueba de χ^2 con ajuste de Yates. Para el caso de ICH se analizaron entre 25 y 50 metafases en segunda división por animal y dosis estudiada. En este caso, el análisis estadístico se hizo mediante la prueba "U" de Mann-Whitney.

INDUCCIÓN DE ALTERACIONES EN ANAFASE-TELOFASE DE CÉLULAS CHO

Para llevar a cabo este estudio se emplearon fibroblastos procedentes de una línea celular establecida (CHO) originaria de hamster chino (*Cricetulus griseus*). Las células se cultivaron en monocapa sobre cubreobjetos de 24 x 36 mm, en cápsulas de Petri de 37 °C, con una atmósfera con 5 % de CO₂ durante 28-30 h. El medio de cultivo empleado fue Ham F10, suplementado con 10 % de suero bovino fetal. El agregado de la droga se realizó cuando las células estaban en fase logarítmica de crecimiento, 8 horas antes del sacrificio. Una vez cumplido el tiempo de cultivo, las células se sometieron a una fijación gradual con alcohol metílico-ácido acético en proporción 3:1, de acuerdo con el siguiente procedimiento: 5 ml de fijador + 5 ml de medio de cultivo durante 10 min, descarte de la mezcla y agregado de 10

ml de fijador fresco durante 10 min y conservación a 4°C durante 24 h. Las células se tiñeron con carbol fucsina, previo pasaje por una batería de alcohol etílico (100% - 70% - 70% - agua). Finalmente las preparaciones se montaron sobre portaobjetos y se analizaron en microscopio óptico (siempre por un solo investigador y a ciegas).

Se analizaron 300 células en el estadio de anafase-telofase por cada dosis estudiada, excepto para la dosis más alta en la que sólo se pudieron contabilizar 22 células en el estadio antes mencionado. La prueba estadística utilizada fue G de Sokal y Rohlf.

RESULTADOS

La Tabla 1 resume los resultados obtenidos con respecto a la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales. En un primer análisis se comparó el total de ACE inducidas por cada tratamiento con respecto al control, comprobándose que todos los tratamientos incrementaron de forma significativa la frecuencia de ACE ($p < 0.01$). Posteriormente se realizó el análisis estadístico individual de cada una de las aberraciones cromosómicas analizadas. En este caso se observó que sólo la frecuencia de fracturas de monocromátida se incrementó significativamente respecto

Tabla 2. Intercambios de cromátidas hermanas (ICH) inducidos por OTA en linfocitos de cerdos
Table 2. OTA induced sister chromatid exchanges (SCE) in pig lymphocytes

Tratamiento	Células analizadas	Total ICH	ICH/Cel. ± SD
Control	127	634	4,99 ± 1,62
0,25 µg/ml	150	549	3,66 ± 1,76
0,50 µg/ml	150	648	4,32 ± 1,75
1,00 µg/ml	125	647	5,17 ± 2,87

Total ICH: Total de intercambios de cromátidas hermanas observados; ICH/Cel. ± SD: Promedio de intercambios de cromátidas hermanas por cada célula ± el desvío standard.

Tabla 3. Alteraciones cromosómicas en anafase-telofase inducidas por OTA en células CHO
Table 3. OTA induced anaphase-telophase alterations in CHO cells

Tratamiento	Alteraciones cromosómicas (%)			Células analizadas	Índice mitótico
	P	CR	FR		
Control	0,33	0,67	0,67	300	35
0,25 µg/ml	1,00	1,00	0,33	300	22
0,50 µg/ml	0,33	1,00	0,33	300	13
1,00 µg/ml	9,09	4,55	4,55	22	6

P: células con puentes; CR: células con cromosomas rezagados; FR: células con fragmentos

del control ($p < 0.01$). La frecuencia de cromosomas dicéntricos, mostró diferencias levemente significativas ($p < 0.05$) respecto del control con las tres dosis utilizadas.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos con respecto a la inducción de ICH. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el grupo control y las tres dosis ensayadas.

La Tabla 3 resume los resultados obtenidos a partir del ensayo de anafase-telofase en células CHO. La prueba estadística utilizada reveló que las frecuencias de cromosomas y fragmentos rezagados inducidos por las tres dosis de Ocratoxina A ensayadas no se incrementaron en forma significativa respecto de los controles ($p > 0.05$). Por otra parte la frecuencia de puentes de cromatina se incrementó levemente, encontrándose en el límite de significancia.

DISCUSIÓN

A pesar que la IARC ha clasificado a la OTA como un posible carcinógeno humano (grupo 2B) (14), la evidencia existente con respecto a su capacidad genotóxica es todavía polémica, lo cual hace difícil justificar las restricciones de esta sustancia.

Algunos investigadores han encontrado resultados negativos acerca de la capacidad genotóxica de este compuesto y argumentan que la misma no puede ser la causa de la acción carcinogénica observada en roedores. En este sentido se ha reportado que la formación de aductos en el ADN no es clara, ya que no se han encontrado uniones OTA-ADN (15-16). Por otra parte otros

estudios revelaron la capacidad de la OTA de generar aductos en la molécula del ADN, así como también la inducción de daño oxidativo, lo cual revelaría la capacidad genotóxica y carcinogénica de esta toxina (17). Además se ha podido comprobar la capacidad de este compuesto de inducir intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos humanos y en células epiteliales porcinas (18-19) y aberraciones cromosómicas estructurales en linfocitos de bovinos (20) y humanos (21-22). Los resultados obtenidos en el presente trabajo revelan una escasa capacidad clastogénica de la OTA en linfocitos de cerdo, ya que sólo se observaron aumentos significativos en lo que respecta a la inducción de fracturas de monocromátida. No se comprobaron aumentos significativos en la frecuencia de cromosomas dicéntricos ni de ICH.

El ensayo de anafase-telofase en células CHO, puede ser considerado válido para el estudio de aneuploidía, presentando la ventaja de ser muy sencillo y rápido ya que no requiere un recuento cromosómico (23). Del mismo modo que el análisis de aberraciones cromosómicas en linfocitos reveló una escasa capacidad clastogénica de la OTA, los resultados obtenidos a partir del ensayo de anafase-telofase revelaron una escasa capacidad clastogénica de esta sustancia en células CHO y no revelaron la existencia de efecto aneugénico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Knasmüller y colaboradores (24) quienes comprobaron la capacidad de OTA de inducir micronúcleos en células HepG2 que se originarían a partir de roturas cromosómicas y no de cambios numéricos. Es importante destacar

que en los modelos experimentales utilizados la dosis más alta (1 µg/ml) mostró un claro efecto citotóxico. Este hecho se pone de manifiesto en la disminución del número de células analizadas y permitiría sugerir que la acción citotóxica de OTA sería tan importante como la genotóxica en el rango de dosis utilizadas.

Por lo tanto en base a los antecedentes antes mencionados y los resultados obtenidos, podría sugerirse que la acción carcinogénica de esta sustancia se debería más a mecanismos epigenéticos que genéticos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a los siguientes subsidios: PICT 14329 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PIP 5583 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), proyecto 11-V138 de la Universidad Nacional de La Plata. Los autores son miembros de la Carrera de Investigador del CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

- Haschek WM, Voss KA, Beasley VR. Selected mycotoxins affecting animal and human health, in *Handbook of Toxicologic Pathology*, 2nd ed.; Haschek, W. M., Rousseau, C.G., Wallig, M. A., Eds., Academic Press: New York, 2002; p. 645-698.
- O'Brien E and Dietrich D. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Rev in Toxicol* 2005; 35: 33-60.
- Moss MO. Mycotoxic fungi. In *Microbial Food Poisoning*, 2nd ed., Eley, A. R., Ed.; Chapman and Hall: New York, 1996; p. 75-93.
- Puschner B. Mycotoxins. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002; 32: 409-419.
- Rumbeih W. Mycotoxins may cause clinical symptoms in pets. *Feedstuffs* 2002; 29: 14-15.
- Food and Agriculture Organization of the United Nation/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA). Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control, in *Food and Nutrition Paper; Food and Nutrition Division*, FAO: Rome, Italy, 2001; Vol. 73, p. 7-13.
- Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 1965; 205: 1112-1113.
- Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Cabañes FJ. Current importance of ochratoxin A producing *Aspergillus* spp. *J Food Prot* 2001; 64: 903-6.
- Serra R, Abrunhosa L, Kozakiewicz Z, Venâncio A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int J Food Microb* 2003; 88: 63-68.
- Tanchev Y and Dorossiev D. The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later. *IARC Sci Publ* 1991; (115): 21-28.
- Kuczuk MH, Benson PM, Health H, Hayes W. Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 1978; 53: 11-20.
- Krogh, P. Ochratoxin A in Food, Academic Press, New York 1987; p. 97-121.
- Lebrun S, Follmann W. Detection of ochratoxin A induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Arch Toxicol* 2002; 75: 734-741.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France: IARC 1993; 56:489-521.
- Gautier J, Richoz J, Welti DH, Markovic J, Germaud E, Guengerich FP and Turesky RJ. Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 34-45.
- Schlatter C, Studer-Rohr J, Rasonyi T. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Addit Contam* 1996; 13 Suppl: 43-44.
- Pfohl-Leszkiwicz A, Manderville RA. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 61-99.
- Hennig A, Fink-Gremmels J, Leistner L. Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation, in: Castegnaro, Plestina, Dirheimer, Chernozemsky and Bartsch (Eds.). *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*. IARC Scientific Publications No. 115, 1991, Lyon, France, p. 255 -260.
- Föllmann W, Hillebrand LE, Creppy EE and Bold HM. Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated by OTA and alpha OTA. *Arch Toxicol* 1995; 69: 280-286.
- Lioi MB, Santoro A, Barbieri R, Salzano S and Ursini MV. Ochratoxin A and zearalenone: A comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutat Res* 2004; 557: 19-27.
- Manolova Y, Manolov G, Parvanova L, Petkova-Bocharova T. Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly x-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutat Res* 1990; 231: 143 -149.
- Manolov G, Manolova Y, Castegnaro M and Chernozemsky IN. 1991 Chromosomal alterations in lymphocytes of patients with Balkan endemic nephropathy and of healthy individuals after incubation in vitro with ochratoxin A, in Castegnaro, Plestina, Dirheimer, Chernozemsky and Bartsch (Eds.). *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC Scientific Publications No. 115, Lyon, France, p. 267 -272.
- Seoane AI, Dulout FN. Use of the anaphase-telephase test to detect aneuploidic compounds: effects of

J. De Luca y col.

propionaldehyde and cadmium chloride. Bull Environ Contam Toxicol 1994; 53: 924-929.

24. Knasmüller S, Cavin C, Chakraborty A, Darroudi F, Majer BJ, Huber WW, Ehrlich BA. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human-derived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. Nutr Cancer 2004; 50: 190-197.

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL PH EN FILETES DE PEJERREY DE LAGUNA (ODONTHESTES BONARIENSIS), CONSERVADOS CON Y SIN VACÍO, UTILIZANDO DISTINTOS TRATAMIENTOS Y ALMACENADOS A TEMPERATURAS DE 4, 0 Y -1.5 °C.

J Copes¹, K Pellicer¹, G del Hoyo¹, S Brocardo^{1,2}, L Gianuzzi³

¹ Cátedra de tecnología y Sanidad de los Alimentos. ² Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

³ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA).

RESUMEN: En la industria pesquera, la medición del pH es una variable que reviste gran importancia al momento de juzgar la frescura de los productos derivados de la pesca. El objetivo de este trabajo fue estudiar el comportamiento del pH a partir de filetes de pejerrey de laguna (*Odonthestes bonariensis*), conservados con y sin vacío, tratados con agua clorada y agua clorada con ácidos cítrico y ascórbico, almacenadas a 4, 0 y -1.5 °C. Se obtuvieron diferencias significativas entre los filetes de pejerrey, según temperatura de almacenamiento, tipo de tratamiento (tratamiento 1: solución de cloro en agua 0,08 ppm y tratamiento 2: solución de cloro en agua 0,08 ppm más ácido cítrico al 0,25% y ácido ascórbico al 0,1% durante 2 minutos), tiempo de almacenamiento y permeabilidad de la película de envase. La comparación de a pares indicó que los valores de pH presentan diferencias significativas a 4, 0 y -1.5 °C. Concluimos que la evaluación del pH no sería determinante en la valoración de frescura para los productos estudiados.

Palabras claves: pH, pejerrey, permeabilidad gaseosa, vacío, *Odonthestes bonariensis*

STUDY OF THE BEHAVIOR OF PH IN FILETS OF LAGOON'S PEJERREY (ODONTHESTES BONARIENSIS), UNDER AEROBIC AND VACUUM PACKAGING CONDITIONS, USING DIFFERENT TREATMENTS AND STORED AT 4, 0 AND- 1.5 °C.

ABSTRACT: In the fishing industry, pH is a great importance variable for value the freshness of fishing products. The aim of this work was to study the behavior of pH in filets of lagoon's pejerrey (*Odonthestes bonariensis*), under aerobic and vacuum packaging conditions, using chlorinated water and chlorinated water with citric and ascorbic acids, stored at 4, 0 and -1.5 °C. Significant differences were obtained, according to storage temperature, treatment (treatment 1: chlorinated water 0,08 ppm and treatment 2: chlorinated water 0,08 ppm with citric acid 0,25 % and ascorbic acid 0,1 % for 2 minutes), time of storage and film package permeability. Comparison of two by two indicated that the pH values present significant differences at 4, 0 and -1.5 °C. We conclude that the evaluation of pH would not be determinant in the valuation of freshness for these products.

Key words: pH, pejerrey, gaseous permeability, vacuum, *Odonthestes bonariensis*.

Fecha de recepción: 18/08/07

Fecha de aprobación: 13/03/08

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

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

INTRODUCCION

En la industria pesquera, una variable que reviste gran importancia al momento de juzgar la frescura de los productos, es la medición del pH. Esto es debido a que en las etapas posteriores al período post mortem, el músculo del pescado es ligeramente ácido (1) acentuándose en el rigor mortis. Después de esta etapa, comienza el deterioro que es mucho más rápido que en otro tipo de carnes (2). Este proceso de degradación es llevado a cabo en una primera etapa, por enzimas propias del músculo del pescado y posteriormente por la acción de los microorganismos que ingresan al músculo generando principalmente aminas como la trimetilamina (TMA) (1, 3).

Estos cambios bioquímicos que experimenta el pescado, dan lugar a diferentes grados de frescura. Los cuales se presentarán a distinta velocidad, y dependerán de la especie, tamaño, estado fisiológico, alimentación, método de captura, temperatura de conservación, etc (4).

En diferentes estudios realizados en distintas especies de agua dulce, (5, 6, 7), los valores de pH no presentaron prácticamente cambios en los primeros 12 días, después de los cuales, el aumento del pH fue significativo. En otro caso, Botta y Shaw (8), informaron que los cambios de pH registrados en el almacenamiento de la especie "Roundnose granadier", desde el día 0 (valor promedio de 6.82) alcanzó el valor de 7.38 a los 18 días de almacenamiento en hielo. Con referencia al pejerrey de laguna (*Odonthestes bonariensis*), Agüeria (9) registró valores de 7,07 en pescados eviscerados conservados a 4 °C durante 72 horas, y 7,24 en piezas no evisceradas utilizando el mismo método de conservación. Con referencia a los ácidos cítrico y ascórbico, fueron utilizados debido a que poseen propiedades tales como efectos antimicrobianos (cítrico) e inhibidores del pardeamiento enzimático (cítrico y ascórbico), son reconocidos como seguros (GRAS: generally recognized as safe) y su ingesta no está limitada. Son utilizados como preservadores para productos de la pesca y otros.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el comportamiento del pH a partir de filetes de pejerrey de laguna, conservados con y sin vacío, con tratamientos 1 y 2, y a las temperaturas de 4, 0 y -1.5 °C.

MATERIALES Y METODOS CAPTURA DE PEJERREYES

La captura de pejerreyes (*Odonthestes bonariensis*) se realizó con trasmallos comerciales en lagunas de la Provincia de Buenos Aires durante los meses de febrero, marzo, abril y mayo. Las piezas (35 cm de largo) se refrigeraron rápidamente con hielo en escamas durante 20 horas.

PROCESO:

Se realizó el lavado de las piezas enteras (con agua de planta), posteriormente fueron descamadas, fileteadas y despinadas, obteniéndose filetes de pejerrey con cuero y sin espinas.

TRATAMIENTOS:

-Tratamiento 1: inmersión en agua de planta con cloro 0,8 ppm durante 1 minuto.

-Tratamiento 2: inmersión en agua de planta más la adición de ácido cítrico al 0,25% y ácido ascórbico al 0,1% (11) durante 2 minutos.

Luego de aplicado cada tratamiento los filetes fueron escurridos durante 10 minutos y envasados en dos tipos de películas de envase:

Bolsas de polietileno de baja densidad de 80 micrones; permeabilidad al oxígeno de 5000 cm³ m⁻² día⁻¹ atm⁻¹ a 23 °C, autorizadas para uso primario por el Ministerio de Salud de la Nación. Cerradas mediante sellado térmico.

-Bolsas de EVA SARAN EVA (ESE) de 90 micrones; permeabilidad al oxígeno de 50 cm³ m⁻² día⁻¹ atm⁻¹ a 23 °C, autorizadas para uso primario por el Ministerio de Salud de la Nación. Se le realizó vacío y termosellado mecánico.

Una vez envasados las muestras fueron almacenadas en cámaras de temperatura controlada a 4, 0 y -1.5 °C.

DISEÑO FACTORIAL DEL EXPERIMENTO

Se aplicó un diseño factorial de las variables empleando los dos tipos de lavado, tratamiento 1 y 2; dos tipos de películas de envase (películas de alta y de baja permeabilidad al oxígeno) y 3 temperaturas de almacenamiento (4, 0 y -1.5 °C). Total 12 condiciones de estudio.

DETERMINACIÓN DEL PH

Se llevó a cabo con pHmetro (Hanna instruments HI8424) a partir de 25 gr de músculo de pescado con 75 ml de agua destilada pH 7 (11).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA) y el test de comparación de a pares, Fisher LSD, con niveles de significación de 0,05 y 0,01. Se utilizó un paquete estadístico para computadoras (SYSTAT Inc.1990, versión 5.0, USA).

RESULTADOS

El valor promedio obtenido en la medición de pH en un homogenato de músculo de pejerrey luego de 20 horas de captura, fue de 6,8.

En el Figura 1, se graficaron los valores de pH, obtenidos a partir de filetes de pejerrey conservados con y sin vacío, con diferentes tratamientos y a la temperatura de 4 °C. Se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) según el tipo de tratamiento, tiempo de almacenamiento y la película de envase utilizada. La diferencia más importante se observó en los filetes con tratamiento 1, sin vacío, obteniendo el mayor

valor (pH: 7,82), a los 12 días de almacenamiento. Los restantes tratamientos no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$).

A 0°C (Figura 2), se pudo observar claramente que con el tratamiento 1 sin vacío, se registraron los valores más altos (pH: 7,61). Los productos sometidos al tratamiento 2 (cloro más ácido cítrico y ascórbico) y vacío, mostraron valores más bajos, durante todo el periodo de almacenamiento. El análisis estadístico realizado indicó que el tiempo de almacenamiento, el tipo de tratamiento y la película de envase produjeron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los valores de pH.

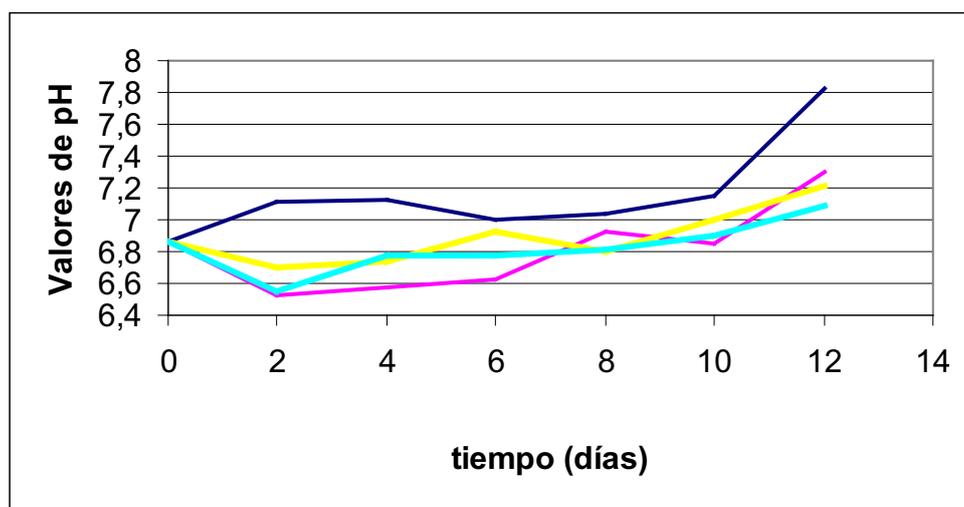


Fig. 1: Modificación en los valores de pH durante el almacenamiento a 4 °C. — tratamiento 1 sin vacío, — tratamiento 2 sin vacío, — tratamiento 1 con vacío, — tratamiento 2 con vacío.

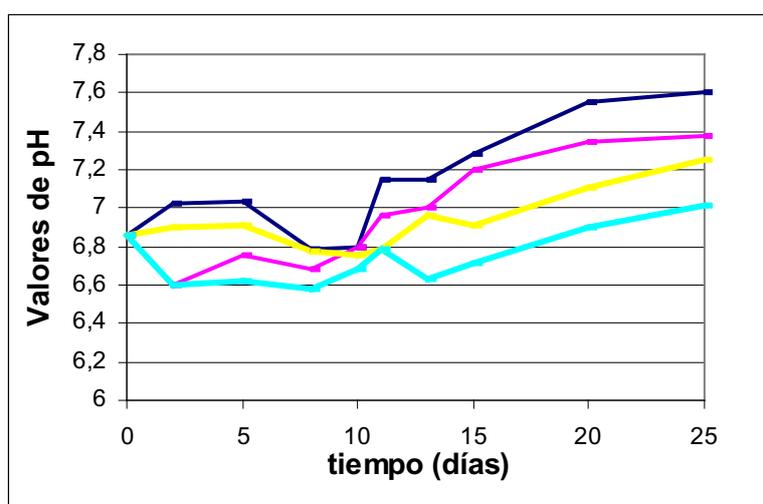


Fig. 2: Valores de pH con respecto a tiempo de conservación a 0 °C. — Tratamiento 1 sin vacío, — tratamiento 2 sin vacío, — tratamiento 1 con vacío, — tratamiento 2 con vacío.

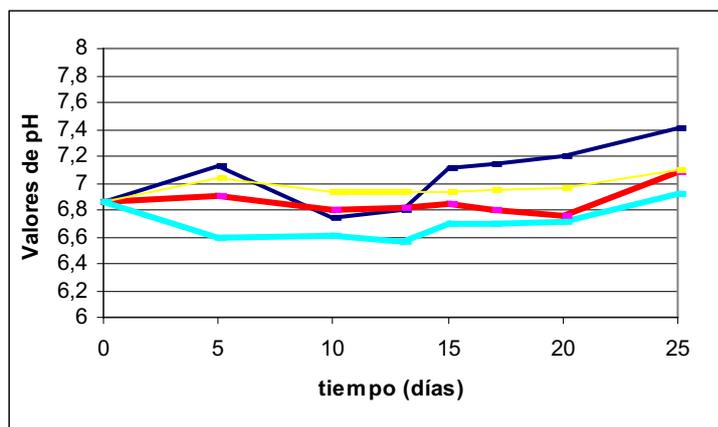


Fig. 3. Valores de pH con respecto a tiempo de conservación a $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 — tratamiento 1 sin vacío, — tratamiento 2 sin vacío, — tratamiento 1 con vacío, — tratamiento 2 con vacío.

A $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, la muestra sometida al tratamiento 1 sin vacío fue la que arrojó los valores de pH superiores a los tres grupos restantes (pH: 7,41). Las muestras sometidas a los dos tratamientos y vacío, no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), al final de la conservación (20 días), la diferencia entre ellas superó el valor de la unidad. Las muestras con tratamiento 2 con vacío, mostraron los valores más bajos de todas las mediciones. El análisis estadístico indicó que el tiempo de almacenamiento, el tipo de tratamiento y la película de envase produjeron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de pH.

Se observaron diferencias significativas en los valores de pH debido al efecto de los tratamientos utilizados (1 y 2), de la película de envase y de la temperatura y tiempo de almacenamiento. La comparación de a pares indicó que los valores de pH presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) a 4, 0 y $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DISCUSION

Los valores de pH obtenidos a partir de piezas refrigeradas con hielo en escamas durante 20 horas (pH: 6,8), fueron similares con los obtenidos por Agüeria (9) en pescados recién capturados. Esto indicaría que aplicando un buen proceso operativo de enfriamiento, los cambios de pH se retrasan, lo cual es favorable para la conservación del producto.

Con referencia a los productos que fueron conservados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, los valores de pH fueron los más elevados, los cuales se obtuvieron en un tiempo de conservación más corto en relación a las otras temperaturas utilizadas. La utilización del tratamiento 2 y vacío, el pH no alcanzó el valor de 7 hasta los 11 días (Fig. 1). Estos resultados fueron muy diferentes a los obtenidos en pescados eviscerados y llenos, ya que a las 72

horas el pH había superado el valor de 7 (9, 18, 19). Por lo expuesto, sería lógico considerar que a esta temperatura ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) los cambios endógenos y exógenos se presentan con mayor velocidad (4, 10). También, es sabido que el uso de esta temperatura ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) no es la recomendada para la conservación por los entes fiscalizadores oficiales de la Republica Argentina (16, 17).

En los filetes conservados en temperaturas por debajo de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, los cambios de pH se produjeron muy lentamente (10, 13, 14, 15), esto coincidió con los datos obtenidos de los productos conservados a 0 y $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, principalmente en los productos en los que se utilizó vacío y tratamiento 2 (11). Esto indicaría que la utilización de la temperatura de $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ podría ser una opción a tener en cuenta para aumentar la vida útil en este tipo de producto.

El Código Alimentario Argentino establece que los productos derivados de la pesca que superen el valor de pH 7,5 (16, 17) no son aptos para el consumo. En este estudio se obtuvieron valores por debajo al 7,5 cuando los filetes mostraban condiciones organolépticas y recuentos microbianos que indicaban que su vida útil había caducado. Según los datos obtenidos en este trabajo, es posible asegurar que la medición del pH y teniendo como parámetro el valor asignado por el CAA, no sería una herramienta de gran utilidad para valorar la aptitud para el consumo en este tipo de productos.

La utilización de las metodologías descriptas, mostraron valores de pH bajos, que se mantuvieron por periodos de tiempo prolongados.

La intensidad en el cambio de pH dependió de la temperatura de conservación del producto, lo que se evidenció con el almacenamiento a $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los productos con tratamiento 2 y vacío arrojaron los valores de pH más bajos, acentúan-

dose en la fase inicial de conservación.

Según los resultados obtenidos, el uso de esta variable para evaluar la frescura de los filetes de pejerrey, no sería de gran utilidad.

BIBLIOGRAFIA

1. Bello R, Rivas W. Evaluación y aprovechamiento de la cachama cultivada, como fuente de alimento. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB494S/AB494S00.htm>. 1992.
2. Jay J. Microbiología Moderna de los Alimentos. Ed. Acibia. España 1994.
3. Gelman A, Glatman V, Drabkin A, Harpaz S. Effect of storage temperature and preservative treatment on shelf life of the pond raised freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus*). J. Food Protection 2001; 64:1584-1591.
4. Ovallos M. "Efectos de la refrigeración sobre el retardo de la descomposición de la curvinata de río" Trabajo Especial de grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 1980.
5. Castellanos A. "Estudio del comprotamiento de la Curvinata de Río (*Plagiscion squamosissimus*) en refrigeración con hielo y almacenamiento a 10 °C después de congelar". Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 1980.
6. Aguilar N. "Estudio sobre el salado de pescado en la zona del Río Orinoco". Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. 1982.
7. Botta J, Shaw D. "Chemical and Sensory analysis of Roundnose Grenadier (*Coriphanooides rupestris*) storage in ice. J. Food Sci. 1976; 41:1258.
8. FAO Documento Técnico de Pesca 348. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Editado por H.H. Huss. Laboratorio Tecnológico Ministerio de Pesca. Dinamarca. <http://www.fao.org/docrep/V7180S/v7180s00.htm#Contents>. 1998.
9. Agüeria D, Grosman F, Tabera A, Sanzano P, Porta R. Valoración de la calidad de carne de Pejerrey *Odonesthes Bonariensis*. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=182>. 2004.
10. Sikorski Z. Tecnología de los Productos de Mar: Recursos, composición nutritiva y conservación. Ed. Acibia. España. 1994.
11. Sigolfo (Sistema de Investigación del Golfo de Méjico). Uso de algunos conservadores en la elaboración de hielo para prolongar la vida de anaquel del pescado fresco. Dr. Krzysztof, N.; Waliszewski C. www.ecologia.edu.mx/sigolfo/usode.htm. 2003.
12. Hozbor M. Correlación de parámetros microbiológicos y físico-químicos en el salmón de mar, *Pseudoperca semifasciata*, almacenado a 0 °C. Tesis de grado. 2001.
13. Stroud G, Early J, Peters M. Chemical and sensory changes in iced *Nephops norvergicus* as incides of spoilage. J. Food. Technol. 1982; 17:541-549.
14. Sivertsvik M, Rosnes J, Kleiberg H. Effect of modified atmosphere packaging and superchilled storage on the microbial and sensory quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fillets. J of Food Sci. 2003; 68 (4):1467-1472.
15. Bilinski E, Jonas R, Peters M. Factors controlling the deterioration of the spiny dogfish *Squalus acanthias* durin iced storage. J. Food. Sci. 1983; 48: 808-812.
16. Código Alimentario Argentino Ley 18.284 Artículo 272 y actualizaciones. 1969.
17. Decreto N° 4.238. Reglamento de Inspección de productos, subproductos y derivados de origen animal. Capitulo XXIII Productos de la pesca. 1968 y actualizaciones.
18. Boskou G, Debevere J. Shelf-life extension of cod fillets with an acetate buffer spray to packaging under modified atmospheres. Food Addit Contam. 1999; 17(1):17-25.
19. Gonzalez-Rodriguez M, Sanz J, Santos J, Otero A, Garcia-Lopez M. Bacteriological quality of aquacultured freshwater fish portions in prepackaged trays stored at 3 degrees C. J Food Prot. 2001; 64(9):1399-404.

CRITERIOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE MATERIALES CURRICULARES Y SU EVALUACIÓN EN UN CURSO DE BIOLOGÍA CELULAR PARA ESTUDIANTES DE VETERINARIA

González NV, Flamini MA, Andrés Laube PF, Barbeito CG

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias

RESUMEN: *Biología Celular es un curso obligatorio del primer cuatrimestre de la carrera de Medicina Veterinaria, dictado por primera vez en 2006. Debido a su carácter innovador se diseñaron un documento de circulación general y cuadernillos de trabajo específicos. En este trabajo presentamos los criterios empleados en su elaboración y su evaluación por los docentes y los estudiantes. Los formatos adoptados para las mismas fueron diversos: completamiento de esquemas y textos, preguntas de respuesta breve y de selección múltiple, lectura y discusión grupal de textos. Estas ejercitaciones se vinculan con el procesamiento, retención y recuperación de datos y conceptos. Para propiciar el desarrollo de habilidades y estrategias de aprendizaje, se sumaron la interpretación de imágenes, la producción de textos cortos y la resolución de situaciones problemáticas sencillas. La evaluación de los cuadernillos fue realizada mediante un cuestionario a los estudiantes (n=184) y la autoevaluación de los docentes (n=11). La valoración de los estudiantes sobre los materiales curriculares elaborados coincidió de manera general con la de los docentes, tanto en los aspectos positivos como en los negativos. Nuestra satisfacción por la evaluación general favorable de los materiales, que se refleja en muchos comentarios de los estudiantes, nos estimula a continuar nuestras tareas de enseñanza.*

Palabras clave: Biología celular - estrategias de enseñanza y aprendizaje -materiales curriculares - reforma curricular

ELABORATION CRITERIA FOR CURRICULAR MATERIALS AND THEIR EVALUATION IN A CELL BIOLOGY COURSE FOR VETERINARY STUDENTS

ABSTRACT: *Cell Biology is first year Veterinary Sciences career obligatory course. It was first dictated in 2006; due to its innovating character exercise booklets were specially designed. In this work we present the criteria employed in their elaboration and their evaluation by professors and students. The formats adopted for exercises were diverse; mainly: schemes and texts filling; short answer; multiple choice and true or false questions; discussion of scientific texts. This group of activities is related to data and concepts processing, retention and retrieval. For the development of learning strategies and abilities, other tasks were included: images interpretation to facilitate the appropriation of highly theoretical contents, short text writing, mainly paragraphs dealing with scientific terms and low complexity problem solving situations related to the veterinary professional labor. The booklets evaluation was performed by a students' questionnaire and a professors' self-evaluation. 184 students answered the questionnaire. The self-evaluation was filled-in by 11 professors. The students' appreciation on the booklets was overall satisfactory as well as the professors' opinions. They also agreed about the booklets negative aspects. Our satisfaction for the favorable general valuation of the booklets is reflected many of the students' comments and this stimulates us to continue our teaching tasks.*

Key words: Cell Biology - teaching and learning strategies - curricular materials - curricular reform

Fecha de recepción: 29/10/07

Fecha de aprobación: 07/03/08

Dirección para correspondencia: Norma González. Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata 60 y 120 (1900) La Plata. Argentina. e-mail: nvgonzal@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata puso en marcha, en el año 2006, un nuevo plan de estudios para la carrera de Medicina Veterinaria. Este plan contempla una carrera de 5 años y medio de duración, y está organizado en 50 cursos obligatorios de formación básica, general y profesional a los que se agregan 3 cursos optativos, prácticas pre-profesionales en diferentes áreas y la acreditación de conocimientos básicos de inglés e informática (1).

Con anterioridad a la reforma curricular, los contenidos de biología celular se desarrollaban en el curso de grado dictado por la cátedra de Histología y Embriología, principalmente a través de clases teóricas y seminarios y eran evaluados mediante un examen parcial escrito. En el marco del nuevo plan de estudios, Biología Celular es un curso obligatorio que cuenta con una carga horaria de 56 horas, pertenece al primer año de estudios, junto a Bioestadística, Biofísica, Bioquímica, Embriología, Anatomía I, Histología y Microbiología y se dicta en el primer cuatrimestre (1).

La enseñanza de la biología celular plantea hoy una serie de dificultades especialmente cuando se trabaja con cursos numerosos (2). La profusión de conocimientos sobre la célula, particularmente los datos ultraestructurales y bioquímicos, nos puede hacer olvidar el tratar los aspectos elementales y básicos relacionados con su funcionalidad (3). El gran desarrollo de los contenidos potencialmente enseñables –hechos, conceptos, principios y procedimientos– determina que su selección, organización y nivel de profundización estén subordinados a metas más generales como el logro de capacidades (4).

Desde una perspectiva de participación, promovida desde los estamentos directivos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, el Profesor a cargo elevó una propuesta para este curso en la cual constaban su estructuración en 15 actividades presenciales obligatorias (APOs), las expectativas de logro, los objetivos, contenidos, metodología de clases y evaluación que fue discutida y consensuada en el Departamento de Ciencias Básicas y posteriormente aprobada por el Honorable Consejo Académico de la Facultad.

Partiendo de este panorama general, apoyado en nuestras experiencias previas (5, 6, 7) y ante la necesidad de generar herramientas para la planificación, el desarrollo y la evaluación del curso, el equipo docente elaboró materiales curriculares destinados específicamente a estas nuevas instancias de enseñanza y de aprendizaje.

En este sentido, y siguiendo a Gimeno Sacristán (8), entendemos por materiales curriculares a “*los instrumentos u objetos que puedan servir como recurso para que mediante su manipulación, observación o lectura se ofrezcan oportunidades de aprender algo, o bien con su uso se intervenga en el desarrollo de alguna función de enseñanza*” (p.10). La consideración

de Gimeno Sacristán sobre los materiales curriculares es coincidente con la de Parcerisa Arán (9) quien destaca que no debe identificarse exclusivamente como material curricular al que emplean los alumnos sino que el concepto puede referirse al material utilizado por los docentes: “*material curricular puede ser todo material que ayude al profesorado a dar respuesta a los problemas y cuestiones que se le planteen en su tarea de planificación, ejecución y evaluación curricular*” (p.27).

Así definidos, los materiales curriculares incluyen, además de los que son para uso del alumnado, propuestas tanto para la elaboración de proyectos educativos como las relativas a la enseñanza en determinadas materias o áreas, descripciones de experiencias de innovación curricular; materiales para el desarrollo de unidades didácticas; evaluaciones de experiencias y de los propios materiales curriculares, etc. (10). En suma, una diversidad de materiales de importancia central para la toma de decisiones educativas y por ende, de alta incidencia en los procesos de enseñanza y de aprendizaje.

De acuerdo a lo planteado anteriormente con referencia a los tipos de materiales curriculares, y en la línea de explicitar y compartir nuestra experiencia con la comunidad universitaria, en este trabajo exponemos los criterios seguidos en la elaboración de los materiales curriculares para el curso de Biología Celular y presentamos los resultados de su evaluación por parte de los docentes y los propios alumnos.

LOS MATERIALES CURRICULARES DEL CURSO BIOLOGÍA CELULAR: DESCRIPCIÓN Y CRITERIOS EMPLEADOS EN SU ELABORACIÓN

La propuesta del Profesor a cargo se constituyó en el primer documento que guió y orientó las siguientes decisiones curriculares para la ejecución del curso de Biología Celular, contemplando los lineamientos establecidos por la Comisión Permanente de Reforma del Plan de Estudios y el Honorable Consejo Académico de la Facultad. Se elaboraron dos tipos de materiales adecuados al nuevo plan de estudios y destinados al curso: un documento curricular y cuadernillos de trabajo para las actividades presenciales obligatorias.

El documento curricular, de circulación general, sirvió al propósito de comunicar a los docentes y los alumnos la organización del curso. Fue publicado bajo el título “Curso de Biología Celular. Temario, planificación, organigrama y cronograma”. Dividido en varias secciones, este documento de 13 páginas contiene una introducción que sitúa a la biología celular dentro del contexto de las ciencias y al curso de Biología Celular dentro de la carrera de Ciencias Veterinarias, señalando además su vinculación con otros cursos. A la introducción le siguen la enunciación de las

expectativas de logro, los objetivos, las estrategias didácticas seleccionadas y la implementación del curso. En este último apartado se especifica la carga horaria, su distribución semanal y se describen las modalidades de las actividades a desarrollar. Una sección destinada a la evaluación y acreditación informa sobre el tipo de evaluación, incluye modelos de preguntas y explicita los requisitos para la acreditación del curso y el régimen de promoción de los alumnos. En la siguiente sección se presenta el organigrama donde para cada actividad presencial obligatoria se detallan los objetivos y los contenidos a desarrollar, acompañados por la bibliografía seleccionada para el curso, discriminada en textos fundamentales y complementarios. El documento finaliza con un cronograma que establece las fechas de cada actividad como también los días asignados al examen parcial y sus recuperatorios.

Las actividades presenciales obligatorias comprenden el desarrollo de aspectos teóricos y prácticos. Para cada una de ellas se elaboraron cuadernillos de trabajo que contienen las actividades áulicas a realizar con los estudiantes. Concebidos como material básico, en ellos se incluyeron los objetivos y los contenidos junto a una selección de ejercitaciones. Los formatos adoptados para las mismas fueron diversos, entre ellos:

- completamiento de esquemas y textos,
- preguntas de respuesta breve,
- ejercicios de selección múltiple,
- lectura y discusión grupal de textos de divulgación científica,
- asignación del carácter falso o verdadero de enunciados y fundamentación de los mismos.

Este primer grupo de ejercitaciones se vincula con la información conceptual: el procesamiento, retención y recuperación de datos y conceptos. A este conjunto, y con la finalidad de propiciar el desarrollo de habilidades y estrategias de aprendizaje, se sumaron contenidos de tipo procedimental: la interpretación de imágenes como medio de apropiación de contenidos de alta carga teórica, la producción de textos cortos, mayoritariamente la redacción de párrafos cortos en los que se solicitaba la inclusión de términos científicos y la resolución de situaciones problemáticas sencillas vinculadas con el quehacer profesional del médico veterinario. Las razones de la selección de estos contenidos procedimentales se encuentran, respecto de las actividades centradas en torno a las imágenes, en el conocimiento de la necesidad de una alfabetización gráfica tal como Dondis (11) y Postigo y Pozo (12) lo reclaman y que el equipo docente reconoce desde sus propias prácticas pedagógicas como una de las carencias de sus alumnos. En lo referente a la escritura, se la concibió como un modo de alfabetización académica (13) y de inte-

gración del alumno de primer año a una nueva cultura y, en particular, a la cultura específica de la biología celular. Al mismo tiempo se pretendieron modificar los aprendizajes superficiales o poco relevantes y el desinterés de los alumnos que, en muchos casos llevan al fracaso de los estudiantes o aun a su deserción del sistema educativo universitario (14). La resolución de situaciones problemáticas en el contexto de la práctica veterinaria introduce a los alumnos en el extenso proceso de aprendizaje de saberes teóricos y prácticos especializados demandados por la sociedad a la vez que resulta un elemento motivador que pone en juego además valores y normas (contenidos actitudinales).

Los cuadernillos de trabajo totalizaron 143 páginas, impresas en blanco y negro, en hoja tamaño A4 y con tipografía Georgia 11. El número promedio de ejercitaciones por APO fue de 8,74, registrándose un máximo de 12 y un mínimo de 5 ejercicios. Se incorporaron 128 imágenes, lo que arroja un promedio de 1,18 imágenes por página. Los tipos de imágenes empleados fueron mayoritariamente esquemas (94%) referidos a moléculas, componentes y procesos celulares; también se hizo uso de microfotografías (4%) y micrografías electrónicas (2%) (7).

Para la elaboración de los materiales en conjunto se tomaron como ejes de orientación a los siguientes criterios:

responden al modelo de enseñanza de procesamiento de la información (15) en el marco del cual se desarrollan prácticas de orientación a la obtención y organización de la información así como a la elaboración de conceptos y de un lenguaje para transmitirlos;

se señala explícitamente la preocupación por el desarrollo de habilidades y estrategias en los alumnos, asumiendo el perfil del alumno ingresante a la Universidad y el carácter propedéutico del curso de Biología Celular dentro de la carrera de Medicina Veterinaria,

los contenidos se abordan a través de actividades orientadas a la adquisición de esas habilidades y estrategias;

estos materiales se rigen por patrones de calidad técnica (diagramación adecuada, composición equilibrada en la relación imagen-texto; estilo de redacción adecuado al nivel de los estudiantes; impresión atractiva y clara), pedagógica (imágenes, textos y vocabulario acordes al nivel de los estudiantes, claridad en las consignas, nivel de complejidad de la ejercitación apropiado) y científica (contenidos actualizados, científicamente completos, equilibrados en sus partes);

los docentes responsables de la elaboración de los cuadernillos deben garantizar la pertinencia y coherencia de los materiales con los enfoques y estrategias que componen al modelo educativo de procesamiento de la información al

tiempo que todos los materiales logren conectar con las lógicas de sus usuarios más que con las lógicas de sus autores.

EVALUACIÓN DE LOS MATERIALES CURRICULARES DEL CURSO DE BIOLOGÍA CELULAR

El documento curricular y los cuadernillos de trabajo diseñados en la implementación del curso de Biología Celular constituyeron algunos de los instrumentos centrales de la innovación pedagógica. Adscribimos a las perspectivas de Parcerisa Arán (9) y Méndez Garrido (16) sobre el papel de la evaluación de tales materiales: contribuye no solo a relevar sus aspectos positivos y aquellos a mejorar sino que forma parte de la reflexión sobre las propias prácticas. Por tratarse de materiales de elaboración propia, su evaluación toma aun más sentido para conocer si lo diseñado es útil en relación con sus finalidades.

Para el curso 2006 la evaluación fue realizada en una primera instancia, en la etapa activa de la enseñanza y del aprendizaje. Este tipo de evaluación continua, efectuada mediante la consulta permanente a los docentes-usuarios de ambos documentos, permitió realizar ajustes en los cuadernillos de trabajo a medida que se avanzaba en su publicación y prever correcciones del documento general publicado como primer material.

Al finalizar el dictado del curso, se practicó una segunda instancia de evaluación, de carácter sumativo. Para indagar la valoración de los materiales curriculares del curso de Biología Celular los instrumentos aplicados fueron un cuestionario destinado a los alumnos y otro dedicado a la autoevaluación docente, como medio para recoger información en un tiempo relativamente breve. El primero de los cuestionarios contiene preguntas acerca de la organización del curso de Biología Celular, el proceso de enseñanza y de aprendizaje, los materiales didácticos empleados en el curso y la evaluación. La autoevaluación docente contempla los siguientes aspectos: capacidad y disposición para la tarea pedagógica, responsabilidad laboral, relaciones interpersonales con los diferentes agentes educativos, resultados de su labor educativa y materiales didácticos utilizados en el curso. En ambos instrumentos se indaga específicamente sobre los mejores y peores aspectos de los cuadernillos de trabajo. Todas las preguntas se contestan con respuestas alternativas en una escala ordinal según la cuestión abordada a excepción de las dos preguntas relativas a los mejores y peores aspectos de los cuadernillos de trabajo para las cuales la respuesta es abierta.

De la descripción anterior se desprende que estos instrumentos presentan en común la evaluación de los materiales curriculares del

curso mediante ítems similares para cada grupo encuestado. En la presentación de los resultados de sendos cuestionarios y en concordancia con el objetivo de este trabajo, se ponen en relieve aquellos aspectos que se relacionan de manera más estrecha con los materiales curriculares. Los ítems de referencia han sido extractados de los instrumentos empleados y se presentan en los anexos 1 y 2 (encuesta a los alumnos y autoevaluación docente, respectivamente). Los resultados obtenidos se expresan como frecuencia porcentual (ítems 1 a 10 del cuestionario para los alumnos e ítems 1 a 9 de la autoevaluación docente). Para los ítems de respuesta abierta se realizó un análisis cualitativo (17).

RESULTADOS ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el cuestionario empleado para indagar la valoración del material curricular por parte de los alumnos. Respondieron este cuestionario 184 estudiantes.

En lo referente al uso del cronograma y la opinión de los estudiantes sobre este documento se relevó una posición favorable tanto en la frecuencia de consulta (Fig. 1) como en la valoración sobre su contenido (Fig. 2).

La ejercitación de la actividad práctica fue apreciada por los alumnos como de dificultad media (Fig. 3), de una muy alta o alta relación con los contenidos teóricos (Fig. 4) y facilitadores para la comprensión de los contenidos (Fig. 5). Las consignas de las ejercitaciones resultaron claras para la mayoría del estudiantado (Fig. 6). La cantidad de ejercicios incluida en cada actividad resultó mayoritariamente adecuada (Fig. 7). En relación a las apreciaciones favorables anteriores, una alta proporción de los alumnos concurrió a clase con las ejercitaciones resueltas en respuesta a la propuesta de los docentes (Fig. 8).

El interés de los contenidos incluidos en los ejercicios fue calificado mayoritariamente como muy interesante e interesante (Fig. 9).

El trabajo con imágenes en las actividades prácticas, vinculado a la comprensión de los contenidos, recibió una valoración altamente favorable (Fig. 10).

La encuesta de autoevaluación fue contestada por 11 docentes. Los detalles de los resultados relevados se presentan en la tabla 1. En general se encontró un importante grado de conformidad con el cronograma y los cuadernillos de trabajo.

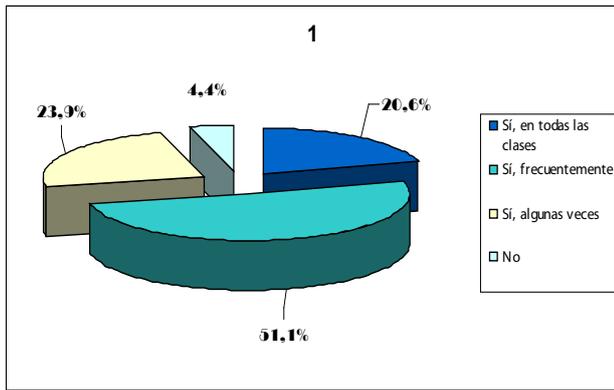


Figura 1: frecuencia de consulta del cronograma realizada por los alumnos.

Figure 1: Students' chronogram consults frequencies

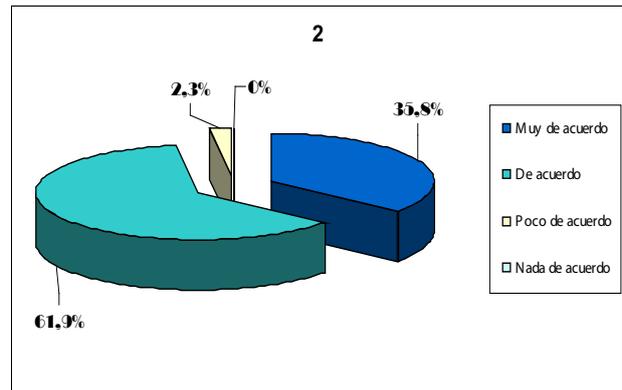


Figura 2: valoración sobre el contenido del cronograma realizada por los alumnos.

Figure 2: Students' appreciation on the chronogram content.

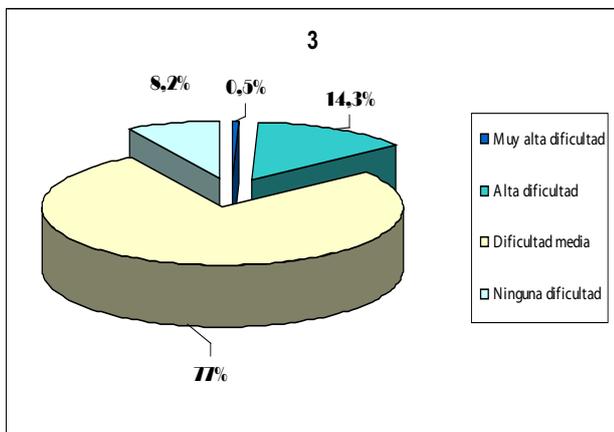


Figura 3: valoración sobre el grado de dificultad de las ejercitaciones realizada por los alumnos.

Figure 3: Students' appreciation on the exercises' level of difficulty.

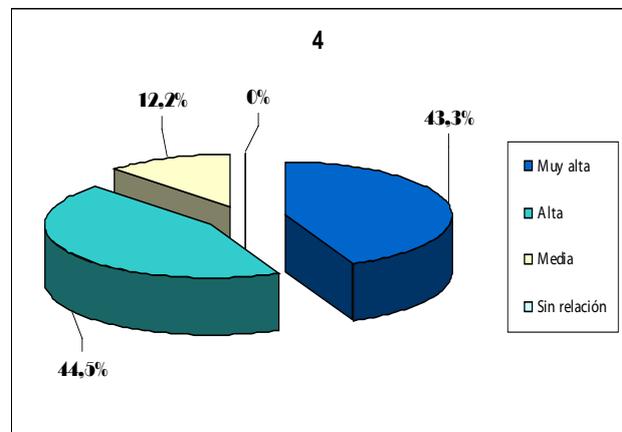


Figura 4: grado de relación entre los ejercicios de las actividades prácticas con los contenidos teóricos abordados.

Figure 4: Students' appreciation on the relation between practical activities exercises contents and theoretical contents.

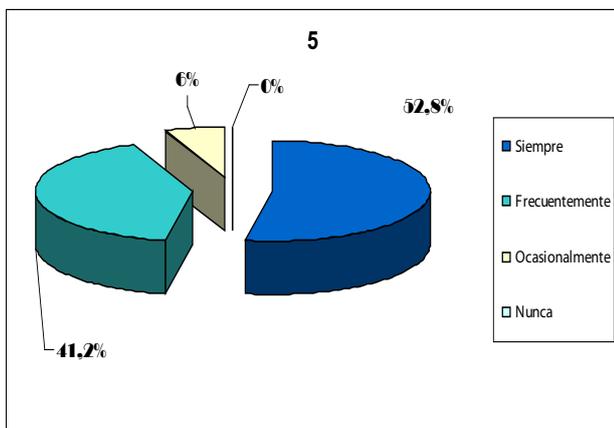


Figura 5: frecuencia con que los ejercicios prácticos resultaron facilitadores para la comprensión de los contenidos abordados.

Figure 5: frequencies of the practical activities exercises as facilitators for the content comprehension.

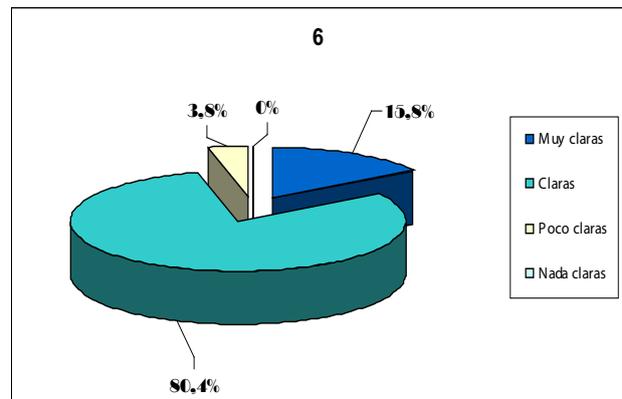


Figura 6: grado de claridad de las consignas de los ejercicios de las actividades prácticas.

Figure 6: Students' appreciation on the clarity of the practical activities exercises instructions.

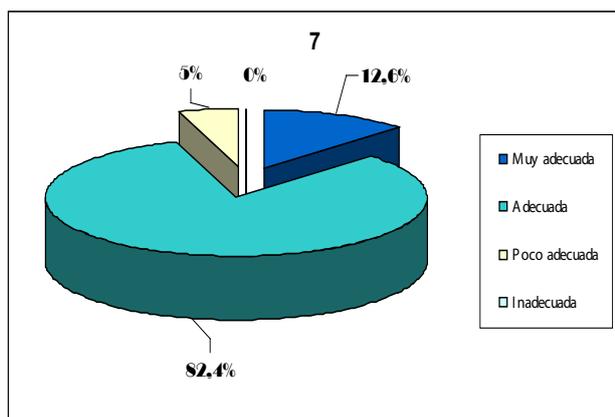


Figura 7: valoración sobre el número de ejercicios incluidos en las actividades prácticas.
Figure 7: Students' appreciation on the number of exercises included in the practical activities.

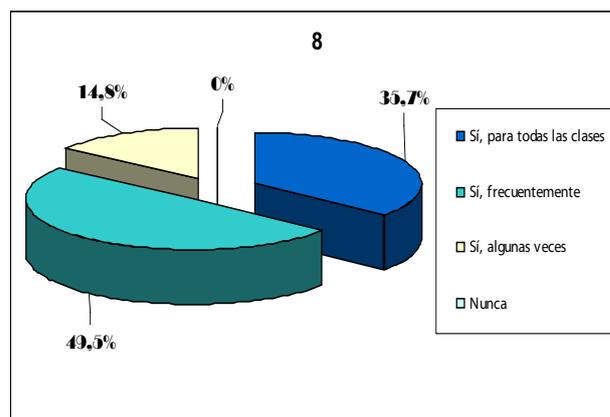


Figura 8: grado de claridad de las consignas de los ejercicios de las actividades prácticas.
Figure 8: Students' appreciation on the clarity of the practical activities exercises instructions.

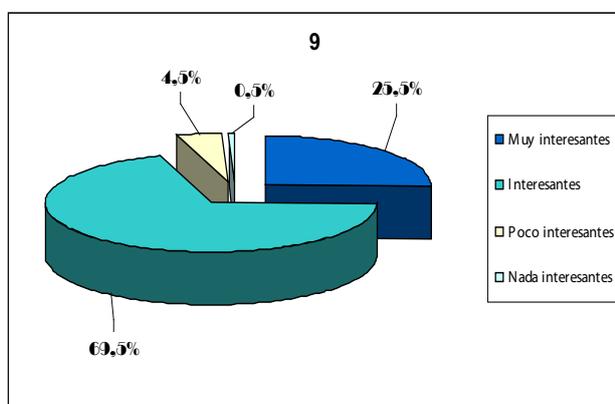


Figura 9: grado de interés de los contenidos incluidos en los ejercicios.
Figure 9: Students' appreciation on the interest of contents included in the practical activities exercises.

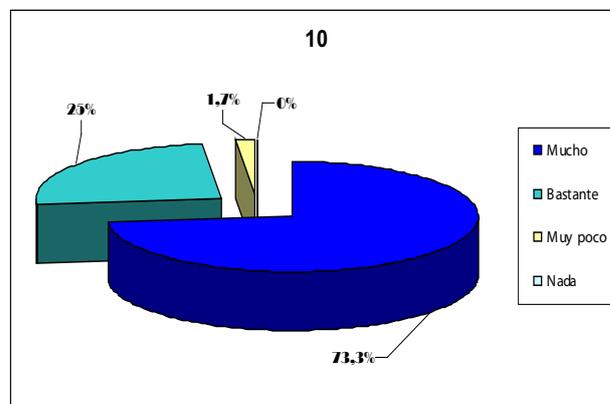


Figura 10: valoración del trabajo con imágenes.
Figure 10: Students' appreciation on the images included in the exercises.

ANÁLISIS CUALITATIVO DE LAS PREGUNTAS ACERCA DE LOS MEJORES Y PEORES ASPECTOS DE LOS CUADERNILLOS DE TRABAJO

Las preguntas sobre los mejores y peores aspectos de los cuadernillos de trabajo dirigidas tanto a los alumnos como a los docentes son de respuesta abierta y se analizaron cualitativamente en torno a dos categorías: los materiales gráficos y los materiales escritos.

Estas preguntas fueron contestadas por un menor número de alumnos, registrándose para estos ítems omisiones del 21,42 y 27,14% para los mejores y peores aspectos, respectivamente.

Los mejores aspectos destacados por los estudiantes, en relación a los materiales gráficos fueron la cantidad de imágenes y la variedad de sus formatos:

Estudiante N° 7: "La cantidad de imágenes que tenían las APOs"

Estudiante N° 106: "Imágenes y esquemas

a completar"

Estudiante N° 107: "También tenía bastantes gráficos y material adjunto"

Estudiante N° 117: "Me gustaron mucho las imágenes."

Muy especialmente se señaló su utilidad para facilitar el recuerdo, la comprensión de los temas, la clarificación de conceptos y el situar los temas en contextos adecuados.

Estudiante N° 1: "Ayudan a ubicarnos más"

Estudiante N° 126: "Las imágenes ayudan mucho a entender"

Estudiante N° 154: "Sobre todo los dibujos me ayudaron mucho a entender."

Respecto de los materiales escritos los alumnos explicitaron su valor como facilitador en la comprensión de los temas y en la organización del estudio. Algunos de los comentarios más representativos realizados por los alumnos encuestados se presentan a continuación:

Tabla 1: resultados de la autoevaluación de los docentes del curso de Biología Celular (2006)

Table 1: Cell Biology course professors' self-evaluation results (2006)

Ítem	Respuestas	Porcentaje
1. ¿Durante su práctica docente consultó el cronograma del curso?	Si, en todas las clases	27,3
	Si, frecuentemente	45,4
	Si, algunas veces	27,3
	No	0
2. El cronograma del curso contiene una amplia información detallada (expectativas de logro, objetivos, metodología de clase, contenidos, criterios de evaluación, bibliografía).	Muy de acuerdo	45,4
	De acuerdo	54,6
	Poco de acuerdo	0
	Nada de acuerdo	0
3. ¿Qué calificación general merecen los ejercicios incluidos en las actividades prácticas?	De muy alta dificultad	0
	De alta dificultad	9,1
	De dificultad media	90,9
	De ninguna dificultad	0
4. ¿Qué relación encontró entre los ejercicios de las actividades prácticas con los contenidos teóricos tratados?	Muy alta	36,3
	Alta	54,6
	Media	9,1
	No se relacionan en absoluto	0
5. ¿Contribuyeron los ejercicios de las actividades prácticas a aclarar dudas y resolver dificultades de los alumnos en la comprensión de los contenidos?	Siempre	90,9
	Frecuentemente	9,1
	Ocasionalmente	0
	Nunca	0
6. ¿Cómo evalúa, en general, las consignas de los ejercicios en las actividades prácticas?	Muy claras	0
	Claras	100
	Poco claras	0
	Nada claras	0
7. Trabajar con imágenes le ayudó en su tarea práctica:	Mucho	81,8
	Bastante	18,2
	Poco	0
	Nada	0
8. El interés de los contenidos incluidos en los ejercicios de las actividades prácticas fue:	Muy interesantes	9,1
	Interesantes	90,9
	Poco interesantes	0
	Nada interesantes	0
9. La cantidad de ejercicios incluidos en cada actividad práctica le resultó:	Muy adecuada	18,2
	Adecuada	81,8
	Poco adecuada	0
	Inadecuada	0

Estudiante N° 9: "Me ayudaban a sacar algunas dudas que me quedaron en el teórico"

Estudiante N° 15: "Breve pero completo"

Estudiante 45: "Didáctico"

Estudiante N° 132: "Traerlas hechas y sacarse las dudas en la práctica sirve mucho para aprender"

Estudiante N° 147: "Muy buenos, como para resaltar aspectos importantes de los diferentes temas y para llevar la materia al día"

Las opiniones vertidas por los alumnos sobre los peores aspectos de los materiales gráficos recayeron principalmente sobre la calidad en las imágenes al hacer referencia a su escasa definición y su pobre impresión:

Estudiante N° 11: "Las figuras se veían mal"

Estudiante N° 20: "Fotocopias: los dibujos salen a veces muy oscuros y no se comprenden"

Estudiante N° 46: "Algunos esquemas estaban medio borrosos"

Asimismo los estudiantes mencionaron errores en la diagramación y en las referencias de las imágenes.

Estudiante N° 27: "Tienen que tener cuidado con los errores de tipeo"

En lo referente a los materiales escritos, las cuestiones comentadas por los alumnos se centraron particularmente en torno a las ejercitaciones que solicitaban la redacción de textos, valoradas como poco productivas:

Estudiante N° 53: "Fueron molestas e innecesarias las preguntas o ítems de las APOs que pedían largas redacciones y lo único que había que hacer era repetir lo que estaba en el material teórico"

Estudiante N° 112: "La producción de textos"

Si bien en menor grado, también se señalaron como aspectos desfavorables una escasa claridad de algunas consignas, una alta dificultad de las ejercitaciones y la extensión excesiva de algunas actividades prácticas (ítem 9, tabla 1).

Estudiante N° 12: "Los cuadros o preguntas largas"

Estudiante N° 81: "Enunciados mal formulados haciendo no entendibles las tareas"

Estudiante N° 48: "Algunos ejercicios eran"

de mucha complejidad y solo se podían resolver con la guía de un profesor, por eso a veces llevaba las APOs incompletas.

Estudiante N° 71: *“Algunos puntos eran poco claros y nos atrasaban en la resolución del resto pero esto pasó pocas veces.”*

Estudiante N° 105: *“Las preguntas en las que hay que desarrollar mucho.”*

Un apartado especial merece dos menciones minoritarias: el costo de los materiales y el corto plazo de que disponían los alumnos entre que los materiales estaban disponibles para su adquisición y el momento de las actividades prácticas. La primera de ellas es una cuestión aislada pero no por ello de menor relevancia, en tanto que la segunda recibió la consideración por parte de cinco alumnos. Comentaremos sobre ellas en la discusión.

Los docentes mostraron, en general, acuerdo con lo expresado por los alumnos tanto en los aspectos favorables como desfavorables de los materiales:

Docente N° 6: *“La diversidad de ejercicios, algunos muy ingeniosos y la variedad de imágenes, muchas de ellas facilitaron la explicación de algunos contenidos difíciles de entender.”*

Docente N° 2: *“El lado negativo es que, en algunas oportunidades, las imágenes eran poco claras.”*

Algunos comentarios de los docentes hicieron referencia a otros aspectos, entre ellos la diagramación de las páginas y la prolongación de las actividades prácticas hasta fuera del horario estipulado motivado por la extensión de los ejercicios o la ambigüedad de las consignas.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados constituyen parte de un estudio exploratorio que brinda información referente a la apreciación de los alumnos-usuarios y docentes-usuarios sobre los materiales elaborados para el curso de Biología Celular. Dado el mencionado carácter exploratorio en el análisis se ha privilegiado la comprensión y la interpretación de los resultados, sin perseguir fines cuantitativos que señalen tendencias (18).

La construcción de los materiales para el curso se inició con el análisis de las necesidades, realizado desde el conocimiento reflexivo de la actividad docente. El documento referido por sus usuarios como cronograma tuvo una recepción favorable y resultó un material de referencia. Concebido como medio no solo para comunicar los criterios organizativos básicos, la selección y secuenciación de contenidos sino también la significación ideológica del curso, el cronograma contribuyó además a la integración de los docentes al cambio curricular. Asimismo, como parte del proyecto global del curso, el cronograma incluyó otro tipo de materiales curriculares a

través de la selección bibliográfica.

La elaboración de los cuadernillos de trabajo tomó como referente la noción, sostenida por Zabala (10), de que en diferentes contextos educativos concretos, los materiales curriculares por muy específicos que sean, nunca desarrollan un solo tipo de contenidos: aunque no se expliciten, integran contenidos conceptuales, procedimentales y actitudinales. En el caso del curso de Biología Celular, las APOs elaboradas incluyen explícitamente contenidos conceptuales y procedimentales. Los contenidos referidos a datos y a conceptos, entendidos estos como *“una información que afirma o declara algo sobre el mundo”* y *“relaciones de los datos dentro de una red de significados”* (19, pp. 85-86) han recibido un tratamiento exhaustivo mediante materiales gráficos y escritos. Numerosos ejercicios que incluyen imágenes o textos a completar brindaron oportunidades para el aprendizaje de datos en tanto que los conceptos fueron abordados en general a través de preguntas de respuesta corta en el contexto de situaciones experimentales sencillas.

Estas actividades, entendidas como problemas de lápiz y papel, son una actividad habitual y de valor reconocido en la enseñanza de las ciencias biológicas (20), por otra parte el uso de imágenes constituye un medio ampliamente extendido para la presentación de contenidos científicos, tanto en sus fases de divulgación y comunicación como en las de enseñanza y aprendizaje (21). La resolución de problemas es una estrategia utilizada para la enseñanza de la biología celular en sistemas educativos tan diferentes como el del Massachusetts Institute of Technology MIT, EE.UU.) (22) y el de la Facultad de Ciencias Médicas de La Habana, Cuba (23).

Los contenidos procedimentales incluidos de forma manifiesta -la redacción de textos cortos y la resolución de situaciones problemáticas sencillas vinculadas con el quehacer profesional del médico veterinario- se presentaron en un menor número de oportunidades. En el caso de la producción de textos, los formatos de estas ejercitaciones atendieron a las recomendaciones de Ballesta Pagán (24) quien indica que deben ser ejercicios concretos, de algún modo repetitivos y secuenciados de manera conveniente y progresiva para adquirir su dominio. A la luz de nuestros resultados, los alumnos consideraron que las actividades eran de una complejidad media por lo que resulta notable que encontraran a este tipo de ejercitaciones como tareas poco atractivas según se detectó en la encuesta dentro de los peores aspectos de los cuadernillos de trabajo. Los motivos de esta situación pueden deberse a la mayor demanda cognitiva puesta en juego en la redacción y a cierto grado de resistencia generada, al verse los alumnos enfrentados a entrar a una cultura

nueva –la cultura académica–: “Escribir, para los estudiantes, es un acto de cruzar fronteras –o de pararse en el umbral tratando de imaginar cómo cruzar.” (13, p. 161). Por el contrario, la resolución de situaciones problemáticas relacionadas con la actividad profesional fue destacada como un rasgo positivo de los cuadernillos de trabajo. Es un hecho reconocido que los alumnos consiguen un mayor aprendizaje si participan activamente en la adquisición del conocimiento y la resolución de problemas es una forma de alcanzarlo (2). Coincidiendo con Durfort (3) nuestro objetivo fue promover en los alumnos el hábito de escuchar, mirar, leer y deducir; hábitos que lamentablemente no siempre son previos a la entrada en la Universidad.

Desde la perspectiva de los alumnos-usuarios resultaron funciones principales de los cuadernillos el permitir aclarar dudas; organizar, reforzar y repasar contenidos; destacar los aspectos más relevantes de los temas y orientar respecto de la evaluación y aun “llevar la materia al día”. Esto último se vincula con el comentario de los alumnos que manifestaron, con una alta frecuencia, haber resuelto las ejercitaciones antes de concurrir a clase. La incidencia de estos cuadernillos en las tareas docentes resultó clave al proveer pautas y criterios para la intervención en el aula.

Las facetas de los cuadernillos de trabajo que resultaron desfavorables en diferente grado aportan información valiosa sobre los aspectos a mejorar en aras de incrementar su potencialidad didáctica. Específicamente, en el momento de redactar este trabajo, los cuadernillos de trabajo han sido sometidos a un proceso de revisión, adaptación y reelaboración en lo referente a la claridad de las consignas, la extensión de las actividades presenciales obligatorias y la adecuación de la producción de textos a fin de potenciar sus aspectos favorables. El cronograma fue íntegramente revisado, ajustado y corregido. Estas tareas se destinaron además a reducir el costo de los materiales para los alumnos como también a superar los problemas técnicos y de edición que redujeron la calidad de impresión.

La evaluación realizada se centró en la práctica áulica y se destinó a su comprensión y a su mejora. Los materiales curriculares constituyen una de las variables que interactúa, junto a otras, en el complejo proceso de la enseñanza y el aprendizaje. Así, el análisis realizado constituye una primera aproximación que deseamos profundizar incorporando las restantes cuestiones incluidas los cuestionarios, como forma de adecuar de mejor modo nuestra tarea a las demandas actuales de la ciencia, por una parte y a los estudiantes, que se inician en la carrera de Médico Veterinario, por otra. En este sentido, adherimos a la expresión de Rodríguez Palmero y

Marrero Acosta (25, p.1) quienes sostienen que a los docentes de esta disciplina: “...se nos reclama hacer una reflexión sobre el contenido celular que transmitimos y ofrecemos al alumnado, se nos pide una revisión sobre la cultura académica que desde la Biología como asignatura se está presentando a los estudiantes, se nos demanda una recreación de esa cultura escolar de modo que replanteemos su naturaleza y su sentido.” Así los materiales producidos para este curso de Biología Celular, han recibido una valoración favorable por parte de los alumnos y docentes, en particular en lo que respecta al uso intensivo de imágenes.

La enseñanza es una práctica orientada a los estudiantes que a la vez enriquece el bagaje personal de los docentes. En este sentido resulta motivador y estimulante el siguiente comentario, recogido de la encuesta N° 179, al abordar los mejores aspectos de los cuadernillos: “Me parecieron muy didácticos y destaco el tiempo que dedican los docentes en hacerlos”.

BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.fcv.unlp.edu.ar/secretarias/asuntos-academicos/svnpn/general.php>
2. Klionsky DJ Talking Biology: Learning Outside the Book—and the Lecture. Disponible en <http://www.cellbioed.org/vol3no4/article.cfm?articleID=120#2>
3. Durfort M Consideraciones en torno a la enseñanza de la biología celular en el umbral del siglo XXI. *Alambique Didáctica de las Ciencias Experimentales* 1998; 16:93-108
4. Pozo JI La crisis de la educación científica ¿volver a lo básico o volver al constructivismo? *Alambique Didáctica de las Ciencias Experimentales* 1997; 14:91-104
5. Rossi AM, González NV El diseño de materiales curriculares como herramienta de comunicación y reflexión. *Resúmenes del Sexto Encuentro de Docentes de la Universidad Nacional de La Plata* 2001; p.48-51
6. González NV Las imágenes en los textos de Histología utilizados en el Nivel Universitario de Educación. *Revista de Educación en Biología* 2006; 9 (1):55-58
7. González NV, Flamini MA, Andrés Laube PF, Zanuzzi CN, Alvarado Pinedo MF, Barbeito CG Valoración de los recursos didácticos utilizados en la enseñanza de biología celular: los materiales gráficos. *Actas del VIII Congreso y 5^{tas} Jornadas de Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata*. Formato CD: 2006: 51-53
8. Gimeno Sacristán J Los materiales y la enseñanza. *Cuadernos de Pedagogía*. 1991; 194:10-15
9. Parcerisa Arán A Materiales curriculares Cómo elaborarlos, seleccionarlos y usarlos Ed Graó. Barcelona (España), 1996
10. Zabala A Materiales curriculares. En: Mauri T., Solé L. y Zabala A. *El Currículum en el Centro Educativo*; p. 125-167. ICE/Horsori. Barcelona (España), 1993
11. Dondis DA *Sintaxis de la imagen*. Ed Gustavo Gili.

Barcelona (España), 1990

12. Postigo Y, Pozo JI Hacia una nueva alfabetización: el aprendizaje de información gráfica. En: J.I Pozo y C Monereo (coord.) El aprendizaje estratégico. Santillana. Madrid (España), 1999

13. Carlino P Escribir, leer y aprender en la universidad. Una introducción a la alfabetización académica. Fondo de Cultura Económica Bs. As. (Argentina), 2005

14. Etcheverry GJ La tragedia educativa. Fondo de Cultura Económica. Bs. As (Argentina), 1999

15. Joyce B y Weil M Modelos de enseñanza. Gedisa. Barcelona (España), 2002

16. Méndez Garrido JM Pautas y criterios para el análisis y evaluación de materiales curriculares. Disponible en: <http://www2.uhu.es/agora/digital/numeros/02/02-articulos/monografico/mendez.PDF>

17. Bardin L El análisis de contenido. Akal. Madrid (España), 1996

18. Hernández Sampieri R Fernández Collado C Baptista L. Metodología de la Investigación. Mc. Graw-Hill. México (México), 1998

19. Pozo JI y Gómez Crespo MA Aprender y enseñar ciencia. Morata. Madrid, (España), 1998

20. Martínez Losada C, García Barros S, Mondelo Alonso M, Vega Marcote P. Los problemas de lápiz y papel en la formación de profesores. Enseñanza de las Ciencias. Revista de Investigación y Experiencias Didácticas 17 (2):211-225.

21. González NV. Las imágenes en los textos de Historia utilizados en el Nivel Universitario de Educación. Tesis de maestría inédita. Universidad de Alcalá, España. 2003

22. Lodish HF y Rodríguez RK A Combination of Lectures, Problem Sets, and Recitation Sections Is an Excellent Way to Teach Undergraduate Cell Biology at a High Level. Disponible en <http://www.cellbioed.org/vol3no4/article.cfm?articleID=120#1>

23. Valdés Moreno J, Arencibia Flores L, Cruz González, J Evaluación y desarrollo de habilidades logicointelectuales en estudiantes de Medicina. Rev Cubana Educ Med Super. 2005;19 (1) Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21412005000100006&lng=es&nrm=iso

24. Ballesta Pagán J Función didáctica de los materiales curriculares. Disponible en <http://www.sav.us.es/pixelbit/articulos/n5/n5art/art53.htm>

25. Rodríguez Palmero ML y Marrero Acosta J Un análisis y una organización del contenido de biología celular. Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias. 2003, 2 (1): 1-20. Disponible en: <http://www.saum.uvigo.es/reec/volumenes/volumen2/Numero1/Art5.pdf>

Anexo 1

Extracto de la encuesta contestada por los alumnos del curso de Biología Celular 2006

Materiales didácticos empleados en el curso de Biología Celular

1. ¿Consultó el cronograma del curso?

- Si, lo usé en todas las clases. Si, frecuentemente. Si, algunas veces No.

Conteste el siguiente ítem solo si consultó el cronograma.

2. El cronograma del curso contiene una amplia información detallada (expectativas de logro, objetivos, metodología de clase, contenidos, criterios de evaluación, bibliografía).

- Muy de acuerdo De acuerdo Poco de acuerdo Nada de acuerdo

3.3. ¿Qué calificación general merecen los ejercicios incluidos en la actividades prácticas?

- De muy alta dificultad de alta dificultad de dificultad media de ninguna dificultad

3.4. ¿Qué relación encontró entre los ejercicios de las actividades prácticas con los contenidos teóricos tratados?

- Muy alta Alta Media No se relacionan en absoluto

3.5. ¿Contribuyeron los ejercicios de las actividades prácticas a aclarar dudas y resolver dificultades en la comprensión de los contenidos?

- Mucho En algo En nada

3.6 ¿Cómo evalúa, en general, las consignas de los ejercicios que resolvió en las actividades prácticas?

- Muy claras claras poco claras nada claras

3.7 Trabajar con imágenes en los ejercicios le ayudó a la comprender los contenidos del curso:

- Mucho En algo En nada

3.8. El interés de los contenidos incluidos en los ejercicios de las actividades prácticas fue:

- Muy interesante interesante poco interesante nada interesante

3.9. La cantidad de ejercicios incluidos en cada actividad práctica le resultó:

- Muy adecuada adecuada poco adecuada inadecuada

3.10 ¿Resolvió los ejercicios antes de concurrir a la actividad?

- Si, para todas las clases. Si, frecuentemente. Si, algunas veces Nunca.

3.11 Señale **en los siguientes espacios**:

Los **mejores** aspectos de los materiales impresos (APOs)

Los **peores** aspectos de los materiales impresos (APOs)

Anexo 2

Extracto de la autoevaluación contestada por los docentes del curso de Biología Celular

Materiales didácticos empleados en el curso de Biología Celular

1. ¿Durante su práctica docente consultó el cronograma del curso?

- Sí, en todas las clases. Sí, frecuentemente. Sí, algunas veces No.

Conteste el siguiente ítem solo si consultó el cronograma.

2. El **cronograma** del curso contiene una amplia información detallada (expectativas de logro, objetivos, metodología de clase, contenidos, criterios de evaluación, bibliografía).

- Muy de acuerdo De acuerdo Poco de acuerdo Nada de acuerdo

3. ¿Qué calificación general merecen los ejercicios incluidos en las actividades prácticas?

- De muy alta dificultad de alta dificultad
 de dificultad media de ninguna dificultad

4. ¿Qué relación encontró entre los ejercicios de las actividades prácticas con los contenidos teóricos tratados?

- Muy alta Alta Media No se relacionan en absoluto

5. ¿Contribuyeron los ejercicios de las actividades prácticas a aclarar dudas y resolver dificultades de los alumnos en la comprensión de los contenidos?

- Mucho En algo En nada

6. ¿Cómo evalúa, en general, las consignas de los ejercicios en las actividades prácticas?

- Muy claras claras poco claras nada claras

7 Trabajar con imágenes le ayudó en su tarea práctica:

- Mucho En algo En nada

8. El interés de los contenidos incluidos en los ejercicios de las actividades prácticas fue:

- Muy interesante interesante poco interesante nada interesante

9. La cantidad de ejercicios incluidos en cada actividad práctica le resultó:

- Muy adecuada adecuada poco adecuada inadecuada

10. Señale **en los siguientes espacios:**

Los **mejores** aspectos de los materiales impresos (APOs)

Los **peores** aspectos de los materiales impresos (APOs)

MULTIFOCAL ANAPLASTIC ASTROCYTOMA IN THE LUMBAR-SACRAL SPINAL CORD OF A 7 YEAR-OLD BLOOD HOUND

NE Vecchio, TA Tobias

MedVet Memphis Specialty Hospital, Memphis, TN, USA

Abstract: *Anaplastic astrocytomas are extremely uncommon tumors of the spinal cord in dogs. A 7 year old, female spayed Blood Hound dog was presented for evaluation of mild right rear leg lameness. The lameness was strictly unilateral with no other significant abnormalities in the physical and neuro-orthopedic examinations. The severity of the lameness progressed rapidly to be non-weight bearing with severe conscious proprioceptive deficits and muscle atrophy. The dog was euthanized at the owner's request. Post-mortem examination and histopathological analysis revealed a multifocal anaplastic astrocytoma arising from the lumbar-sacral segments of the spinal cord.*

Key Words: astrocytoma, spinal cord, dog

ASTROCITOMA MULTIFOCAL ANAPLÁSICO EN EL SEGMENTO LUMBOSACRO DE LA MÉDULA ESPINAL EN UNA PERRA BLOOD HOUND DE 7 AÑOS

Resumen: *Los astrocitomas anaplásicos son tumores muy raramente reconocidos en la médula espinal en caninos. Una perra Blood Hound, castrada, de 7 años de edad fue presentada para evaluación de una leve claudicación del miembro pelviano derecho. Ningún otro hallazgo significativo fue notado en el examen físico como así tampoco en el neuro-ortopédico. La severidad de la claudicación progresó rápidamente al punto de que el animal no podía soportar peso sobre la pierna afectada. Severas deficiencias neurológicas y atrofia muscular fueron observadas. La perra fue sacrificada a pedido de los dueños. La evaluación post-mortem y estudios histopatológicos revelaron dos tumores en los segmentos lumbar y sacro de la médula espinal. Los tumores fueron diagnosticados como atrocitomas anaplásicos.*

Palabras clave: astrocitoma, médula espinal, canino

Fecha de recepción: 30/05/07

Fecha de aprobación: 07/03/08

Dirección para correspondencia: Nicolas Vecchio, Nicolás Vecchio, MedVet Memphis Specialty Hospital 830 North Germantown Parkway, Suite #105, Memphis, TN, USA - 38018 Phone: 001-901-624-9002 - Fax: 001-901-624-9014 **E-mail:** nicovecchio@yahoo.com

INTRODUCTION

Anaplastic astrocytomas have been rarely described as primary tumors of the spinal cord in dogs and cats. Spinal canal tumors are divided into three types according to their relationship with respect to the spinal cord and dura (1, 2, 3, 4): extradural, outside of the spinal cord (50%) (4); intradural extramedullary, within the dura but not invading the neural substance of the spinal cord (35%) (4); and intramedullary, growing within the substance of the cord (15%) (4). Most canine spinal cord tumors are found extradurally, whereas primary intradural tumors are less likely (2, 9). Previous studies have shown that only 3% of canine patients with spinal cord tumors were diagnosed with astrocytomas (2, 6) and there is only one reported case of anaplastic astrocytoma (10). Most affected dogs are middle age 8 and large breeds 9 and brachicephalic dogs seem to be overrepresented (3, 8). Both sexes are affected equally. To the authors' knowledge, there is no previous report of a multifocal anaplastic astrocytoma in the spinal cord of a dog.

CASE DESCRIPTION

A 7 year-old spayed female Blood Hound was presented with an acute onset of progressively worsening strictly unilateral lameness of the rear right leg. Orthopedic and neurological examinations were performed. The dog was initially treated nonspecifically with a NSAID (meloxicam 0.1 mg/kg PO once a day) and, seven days later, with an intravenous injection of 30 mg of dexamethasone. Radiographs of lower back, hips, and knee were taken and submitted to a board-certified radiologist. Necropsy was performed and the spinal cord and muscle samples of lumbar epiaxial muscles, biceps femoralis, and quadriceps were sent for histopathological study to Colorado State College of Veterinary Medicine. Standard preparation for histopathological analysis was used.

RESULTS

The animal progressively worsened and seven days after the first consultation, the patient had lost significant motor function to its rear right leg, but was still able to bear weight. Severe neurological deficits and mild muscle atrophy were noticed at this time. An intravenous injection of 30 mg of dexamethasone had no beneficial effect. Two weeks after initial presentation the patient was unable to bear weight on the affected right rear limb. Neuro-orthopedic examination revealed absence of paw positioning, patellar reflex, and withdrawal in the right rear limb. In the left rear limb, hyper-reflexia of the patellar reflex was noted.

Neuroanatomically, the problem localized

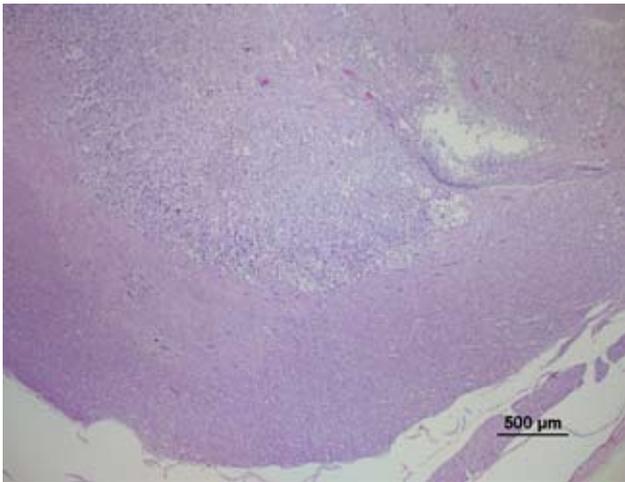
to L4-S1 spinal segments (worse L4-L6), but remained strictly right sided. No significant spinal pain was observed. The radiologist described degenerative changes of the lumbar spine, but no other abnormalities. Computed tomography and/or magnetic resonance imaging studies were declined by the dog's owner. Because of its rapidly deteriorating condition despite supportive therapy, the animal was euthanized 5 weeks after the manifestation of the signs. Severe decoloration of the affected musculature was evident at necropsy. No macroscopic evidence of tumor was noted in the spinal cord in the post-mortem examination.

The histopathological report of the muscle samples revealed severe muscle atrophy. Two anaplastic tumors were described in the spinal cord. One mass involved L4-L5 spinal cord segments, and the second involved S1-S2 spinal cord segments. The masses were described as large tumors which were replacing three-quarters of the parenchyma. They consisted of spindle cells forming bundles that intersected at various angles forming swirls and whorls (Figure 1). The abnormal cell population was characterized by highly pleomorphic, round nuclei with prominent nucleoli. Mitoses were numerous and atypical and giant nuclear forms and anaplastic cells were present (Figure 2). There was slight fibrous stroma and material resembling irregular nervous tissue throughout. Sections of the spinal cord proximal to the lesion consisted of areas of Wallerian degeneration with vacuolization of the white matter. The tumors were identified as anaplastic astrocytomas.

DISCUSSION

A recent study shows that canine astrocytomas are mostly diagnosed in the brain (85%), less commonly in the brain stem (10%), and least frequently in the spinal cord (3%). In previously reported cases, neoplasms were found in the thoracic portion of the cord (6). Different types of astrocytomas can be found according to the histological classification provided by the World Health Organization for tumors of the nervous system (10). We have found only one report of an anaplastic astrocytoma in the spinal cord of a dog (11), but we have not found any documentation of a multicentric astrocytoma of any kind in the canine spinal cord.

Signs seen in association with spinal cord tumors usually reflect the location of the neoplasm and are often indistinguishable from the signs caused by other transverse myelopathies at the same location (4). In this particular case, the unilateral nature of the problem suggested involvement of the central gray matter rather than of the peripheral white matter of the cord. This was supported by the absence of back pain over



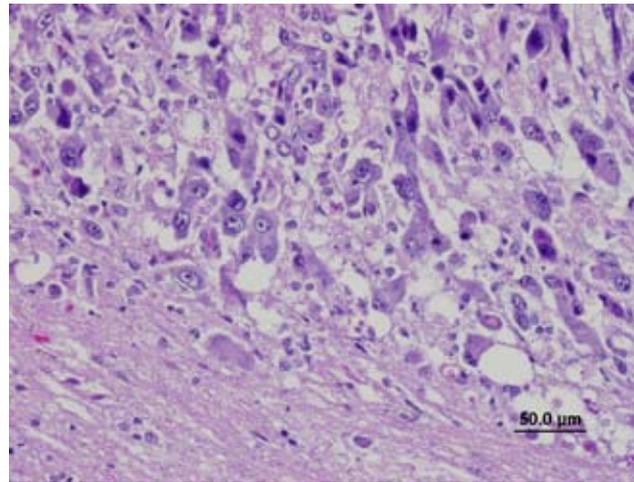
The masses were described as large tumors which were replacing three-quarters of the parenchyma.

Los tumores remplazaban tres cuartas partes del parenquima medular.

the compromised spinal segments. Even though this is a characteristic shared with spinal cord infarcts, dogs with spinal cord infarcts rarely worsen and usually show signs of recovery within 10 days (1). Further, the histopathological findings explain the lower motoneuron signs of the right side due to the destructive nature of the neoplasm arising from the gray matter and the upper motoneuron findings of the contralateral leg due, most likely, to compression of the left lateral tracts by the expanding intramedullary tumor. Plain radiographic abnormalities are uncommon with primary nervous system neoplasms (4), but some studies in human medicine have identified abnormalities, such as spondylosis or bone destruction, on plain radiographs in 20% of the patients in study (7). Advanced imaging would have been helpful in localizing the masses, specially the MRI which would have shown the architecture of the spinal cord. Contrast CT and/or myelography would have potentially shown compression at the tumor site if the expansion of the tumor was sufficient to prevent contrast distribution in the subdural space.

More common neoplasms of the spinal cord include meningiomas and oligodendrogliomas, as primary tumors, and hemangiosarcomas, as metastatic tumors. The proliferation of spiculated pleomorphic cells and the expansive nature of the tumors in this case along with the reactive glial cells were important in making the diagnosis. To further classify the nature and origin of these tumors, special immunostainings such as GFAP would have been not only interesting but also very helpful.

Although not very common, anaplastic astrocytomas, as well as other more common neoplasias should be considered as differential diagnosis in dogs with clinical signs similar to



Highly pleomorphic cells with round nuclei with prominent nucleoli. Numerous mitoses and atypical and giant nuclear forms and anaplastic cells were present.

Las celulas presentan alto grado de pleomorfismo con nucleos redondeados y nucleolo prominente. Numerosas y atipicas mitosis con celulas anaplasticas y nucleos gigantes.

those reported in this case. In the above described dog the particular neurological dysfunction and clinical progression were well correlated with the anatomical location of this uncommon tumor.

ACKNOWLEDGEMENTS

Barbara Powers, DVM, PhD, Diplomate American College of Veterinary Pathologists.

REFERENCES

- 1 Farnbach, GC. Spinal Cord Tumors, Spinal Cord Infarcts, and Degenerative Myelopathy. In: Newton CD (ed). Textbook of Small Animal Orthopedics. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, NY, 1985.
- 2 Mamom T, Meyer-Lindenberg M, Hewicker-Trautwein M, Baumgartner W. Oligodendroglioma in the Cervical Spinal Cord of a Dog. *Vet Pathol* 2004 (41):524-526
- 3 Braund KG. Neoplasia of the Nervous System. In: Clinical Neurology in Small Animals – Location, Diagnosis and Treatment. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, NY, 2003.
- 4 LeCouteur RA. Tumors of the Nervous System. In: Withrow S, MacEwen E (ed). Small Animal Clinical Oncology. Third Edition. W.B. Saunders Company. 2001; pp 514-521
- 5 Forterre F, Kaiser S, Matiasek K, Schmahl W, Brunberg L. Spinal cord canal tumor in dogs: 33 cases (retrospective study). *Kleintierpraxis*. 2002 (47):357-364
- 6 Stoica G, Kim H-T, Hall DG, Coated JR. Morphology, Immunohistochemistry, and Genetic Alterations in Dog Astrocytomas. *Vet Pathol* 2004 (41):10-19
- 7 Hausmann ON, Kirsch EC, Tolnay M, Gratzl O. Intramedullary spinal cord tumors: a clinical outcome and radiological follow-up study. *Swiss Med Wkly* 2001 (131):582-587

8 Bagley RS, Kornegay JN, Page RL, Thrall DE. Central Nervous System. In: Thrall DE (ed). Textbook of Small Animal Surgery. Second Edition, Volume 2. W.B. Saunders Company, 1993; pp 2137-2167

9 LeCouteur RA, Grandy JL. Diseases of the spinal cord. In: Ettinger S (ed) Textbook of Veterinary Internal Medicine. Fifth Edition, Volume 1. W.B. Saunders Company, 2000; pp 608-657

10 Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. In: World Health Organization International Histological Classification of Tumours, 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin, 1993; pp. 1-105

11 Zaki FA, Prata RG, Hurvitz AI, Kay WJ. Primary tumors of the spinal cord and meninges in six dogs. J Am Vet Med Assoc , 1975; 166 (5):511-517

RECONOCIMIENTO MATERNO DE LA PREÑEZ E IMPLANTACIÓN DEL EMBRIÓN: MODELO BOVINO

López AP¹, Gómez LF², Ruiz Cortés ZT¹, Olivera M¹, Giraldo CA¹

¹ Grupo Fisiología y Biotecnología de la Reproducción

² Grupo de Investigación Centauro

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia

Resumen: El reconocimiento materno de la preñez es el proceso fisiológico en el cual el embrión, mediante señales moleculares como la secreción de interferón tau (IFN-t), anuncia su presencia en el tracto reproductivo materno, con el fin de evitar que se desencadene el mecanismo luteolítico ejercido por la prostaglandina F2a (PGF2a) sobre el cuerpo lúteo, prolongando la vida de éste y garantizando la producción de progesterona para el mantenimiento de la preñez. Los eventos que influyen en este proceso fisiológico son una interacción de diferentes órganos como ovario, útero y embrión. Aunque se considera al IFN-t como la señal primordial para que se dé el reconocimiento materno de la preñez, es importante tener en cuenta el papel que cumplen los estrógenos, progesterona, y prostaglandinas en los procesos de señalización molecular que ocurren durante la ventana de implantación.

Palabras clave: Reconocimiento materno de la preñez - Embrión bovino - IFN-t.

MATERNAL RECOGNITION OF THE PREGNANCY AND EMBRYO IMPLANTATION: BOVINE MODEL

Abstract: The maternal recognition of pregnancy is a physiological process in which the embryo announces his presence in the maternal reproductive tract by molecular signs interferon tau (IFN-t) secretion. Luteolitic mechanism trigger by the prostaglandin F2a (PGF2a) on the corpus luteum (CL) blockage, and lifespan and CL-progesterone production prolongation pregnancy. The events that influence this phenomenon imply the interaction of different structures as ovary, uterus and embryo. Although the IFN-t is considered to be the basic signal to the maternal recognition of the pregnancy, it is important to keep in mind the role that estrogens, progesterone, and prostaglandin have in the processes of molecular pathways signalling that happen during the implantation window.

Key word: Maternal recognition of pregnancy – Bovine embryo – IFN-t.

Fecha de recepción: 24/04/07

Fecha de aprobación: 26/10/07

Dirección para correspondencia: Carrera 75 # 65-87 Ciudadela Robledo Universidad de Antioquia Medellín-Colombia Apartado Aéreo 1226

E-mail: angeladir7@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Reconocer los procesos fisiológicos que ocurren alrededor de la implantación es importante para tratar de explicar algunos problemas que disminuyen la eficiencia reproductiva en los hatos. Uno de los problemas reproductivos más frecuentes en ganadería es el de las “vacas repetidoras”, al cual se le atribuyen diferentes causas como: desbalance nutricional y hormonal, enfermedades infecciosas y muerte embrionaria. Esta última representa del 25% al 35% del problema en general y esta asociada al día 16 posestro[7], día en que ocurre el reconocimiento materno de la preñez.

Se conoce como reconocimiento materno de la preñez o reconocimiento materno embrionario, el proceso fisiológico en el cual el embrión mediante señales moleculares como la secreción de interferón *tau* (IFN-*t*) anuncia su presencia en el tracto reproductivo materno, con el fin de evitar que se desencadene el mecanismo lúteolítico ejercido por la prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) sobre el cuerpo lúteo, prolongando la vida de éste y garantizando la producción de progesterona[20].

La interacción del embrión, el tracto reproductivo materno, y las diferentes hormonas que actúan en este proceso, se tratan en el presente artículo. Inicialmente se describe la función de las diferentes hormonas implicadas en el reconocimiento y cuál es su acción en el tracto reproductivo dependiendo de si hay o no gestación. Seguidamente se describe como se forma el embrión y como este interactúa con el tracto reproductivo para señalar su presencia mediante el IFN-*t*. Finalmente se presenta un modelo de este conjunto de interacciones que llamamos “reconocimiento materno de la preñez”

PRODUCCIÓN DE HORMONAS Y FUNCIÓN

ESTRÓGENOS (E_2)

Los niveles de estrógenos varían durante todo el ciclo dependiendo de la actividad ovárica, son basales después de la ovulación y comienzan a aumentar con la emergencia de una nueva onda folicular, alcanzando altos niveles séricos durante la dominancia folicular[9]. (Figura 1-A y 1-B, E_2). El endometrio presenta un receptor para estrógenos a nivel de núcleo el cual se conoce como receptor alfa de estrógenos ($RE_2\alpha$)[21]

Los E_2 producidos en los folículos ováricos ejercen diferentes funciones dentro del reconocimiento materno de la preñez, una de ellas es regular cuando se puede dar o no la implantación. En el epitelio endometrial, compuesto de *células epiteliales luminales* con microvellosidades y algunas con cilios y *células epiteliales glandulares* con microvellosidades[17], los estrógenos regulan la expresión y producción de una proteína conocida como el MUC-1 o mucina[12]. Esta glicoproteína

de 120-220 KDa que se encuentra en la superficie apical, especialmente en microvellosidades y cilios de ambos tipos celulares (Figura 1-C, endometrio) posee un dominio extracelular de gran tamaño que con la glicosilación puede aumentar su peso a 400 KDa [22]. El gran tamaño y peso de esta glicoproteína, sumado a la presencia de azúcares dentro de su estructura, la hacen una molécula de antiadhesión que impide el contacto entre el embrión y el endometrio materno evitando que se de una implantación en el momento inadecuado[12]

Otra función importante que cumplen los estrógenos es servir como estímulo para la liberación de hormonas gonadotrópicas.

GONADOTROPINAS

La GnRH (Hormona Liberadora de Gonadotropinas) es una hormona proteica producida por el hipotálamo y cuya función es inducir la liberación de FSH (hormona foliculo estimulante) y LH (hormona luteinizante) en la adenohipófisis [2]. La liberación de estas hormonas depende de dos centros que se encuentran en el hipotálamo controlando la liberación de GnRH, uno es el centro de pulsos que funciona tanto para LH como FSH, y responde a concentraciones bajas de E_2 séricos aumentando la liberación de FSH para estimular el crecimiento folicular en las etapas de reclutamiento y divergencia (Figura 1-A y 1-B, FSH) [14]. El otro es el centro de pico que permite la liberación de LH que actúa en la etapa de divergencia a dominancia con la maduración del folículo dominante permitiendo que se de la ovulación y posteriormente en la formación del cuerpo lúteo, este centro se ve estimulado por gran cantidad de E_2 provenientes del folículo dominante y esta inhibido por la progesterona proveniente del cuerpo lúteo funcional (Figura 1-B, LH y P_4)[14]. Con la estimulación de este último centro, se da el pico preovulatorio de LH previo al estro (día 0), que desencadena la ovulación del folículo dominante 8-12 horas posestro ó 24 horas presentado el pico, liberando un ovocito maduro listo para ser fecundado [15] (Figura 1-A). La secreción de LH continúa para permitir la formación del cuerpo lúteo y asegurar la producción de progesterona importante para la gestación (Figura 1-A y 1-B, LH)

PROGESTERONA (P_4)

Con el proceso de luteinización se inhibe la vía de aromatización y se comienza a producir P_4 desde niveles no detectables, hasta el día 2 posestro donde se registran niveles séricos mayores a 1ng/mL, y en el día 5 posestro se registra niveles mayores a 5ng/mL, considerando al cuerpo lúteo como funcional [18]. La producción se mantiene en el tiempo si un embrión logra el reconocimiento por parte de la madre o puede

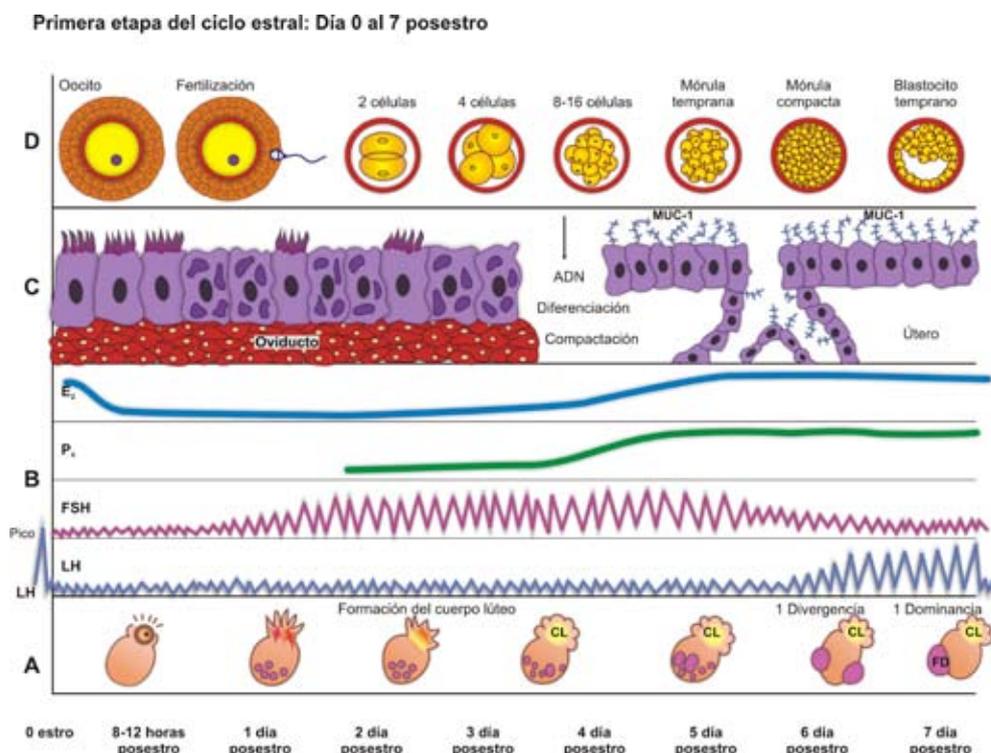


Figura 1: Primera etapa del ciclo estral día 0 al 7 pos-estro, A; ovario, B; hormonas C; tracto reproductivo y D; desarrollo embrionario.
 Figure 1: First stage of the cycle estral day 0 to 7 pos-estrus, A; ovary, B; hormones C; reproductive tract and D; embryonic development.

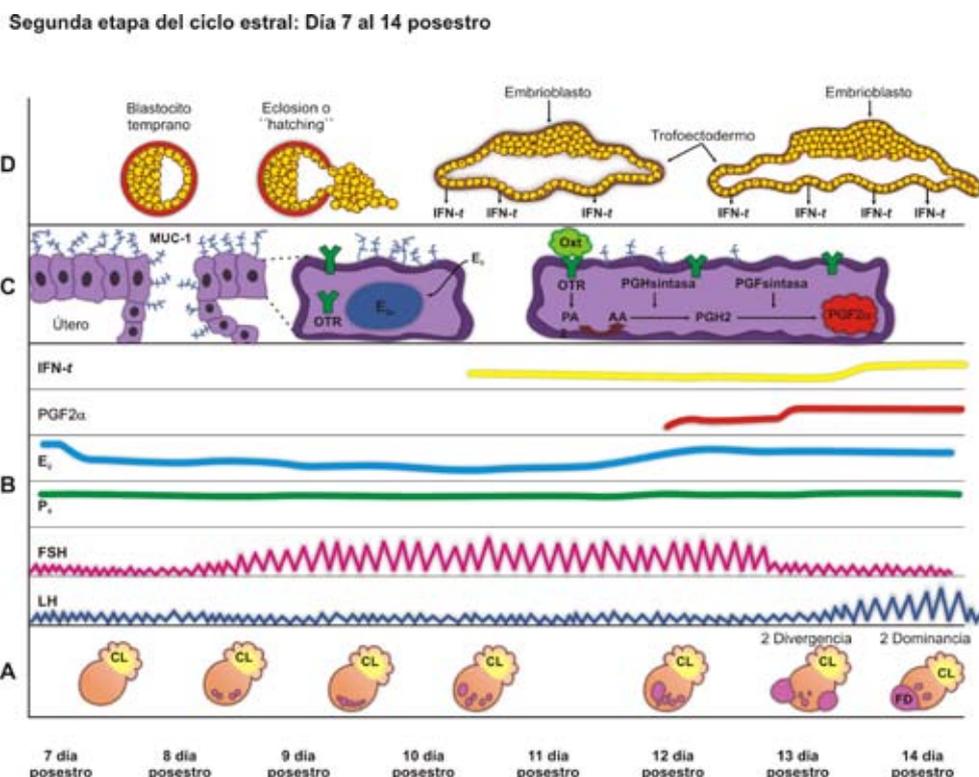


Figura 2: Segunda etapa del ciclo estral día 7 al 14 pos-estro, A; ovario, B; hormonas C; tracto reproductivo y D; desarrollo embrionario.
 Figure 2: Second stage of the cycle estral day 7 to 14 pos-estrus, A; ovary, B; hormones C; reproductive tract and D; embryonic development.

finalizar con el mecanismo de luteólisis si no hay preñez. (Figura 1-B, P₄).

La P₄ mantiene en óptimas condiciones el micro-ambiente en el cual se desarrollará el em-

brión, ya que, su presencia en el tracto materno tiene acción sobre las secreciones uterinas que mejoran el desarrollo embrionario temprano y por tanto favorece la producción de IFN- τ , molécula

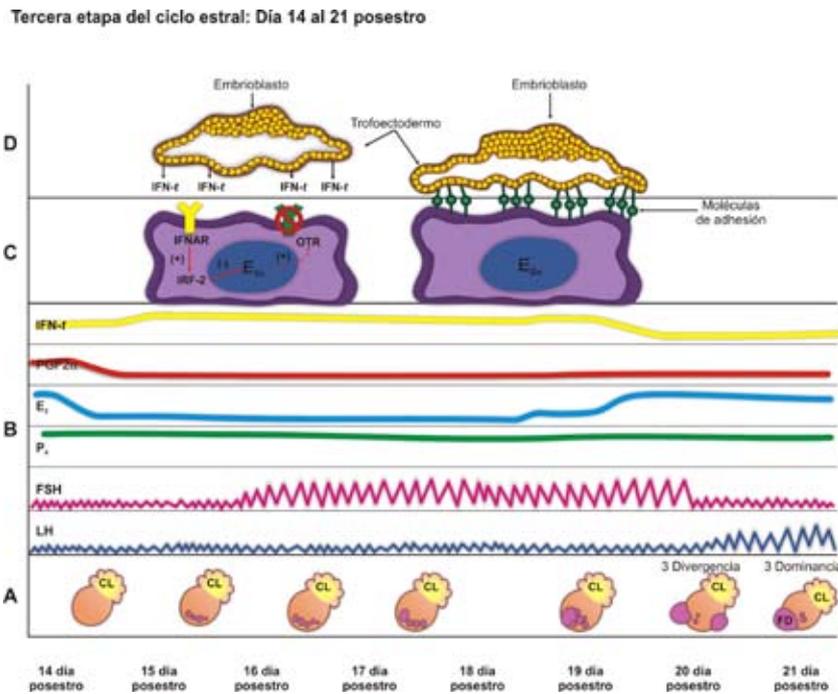


Figura 3: Tercera etapa del ciclo estral día 14 al 21 pos-estro, A; ovario, B; hormonas C; tracto reproductivo y D; desarrollo embrionario.

Figure 3: Third stage of the cycle estral day 14 to 21 pos-estrus, A; ovary, B; hormones C; reproductive tract and D; embryonic development.

importante en el reconocimiento materno embrionario [11].

La P₄ producida durante los primeros 10 días pos-estro inhibe el mecanismo luteolítico, debido a la comodulación existente entre el receptor RE₂ α y el receptor de P₄ (RP) en el núcleo de las células endometriales [21]. La unión de la P₄ a su receptor, inhibe a RE₂ α impidiendo que la unión de E₂ a su receptor sirva como factor de transcripción para la síntesis de receptores de oxitocina (OTR) [4], necesarios en el mecanismo de producción de PGF_{2 α} ; pero una exposición continua de P₄ sobre el endometrio resulta en una saturación de los receptores RP entre los días 11-12 pos-estro deprimiendo su función [21]

LUTEÓLISIS

CÉLULA ENDOMETRIAL, EXPRESIÓN DE OTR Y PRODUCCIÓN DE PROSTAGLANDINA (PGF_{2A})

La expresión de OTR en la célula endometrial es el paso previo para que se de el mecanismo luteolítico. Los estrógenos provenientes de los folículos en crecimiento actúan sobre el RE₂ α ; el complejo hormona-receptor se comporta como un factor de transcripción a nivel de núcleo [21], para la síntesis de OTR que se instalan en membrana citoplasmática basal a espera del estímulo de oxitocina [23], (Figura 2-C).

La oxitocina es producida por el hipotálamo ó en las células grandes luteales [19], es liberada

al torrente sanguíneo y llega hasta útero, donde se acopla al OTR en la célula endometrial, activando la fosfolipasa A2 cuya función es clivar el ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana. Sobre el ácido araquidónico actúa un complejo bifuncional compuesto por la COX-2 y una peroxidasa que lo convierten en PGH2, precursor de prostaglandina. Sobre el PGH2 ejerce su acción la enzima PGF-sintasa, convirtiéndolo en PGF_{2 α} . (Figura 2-C). La PGF_{2 α} llega hasta el cuerpo lúteo mediante un mecanismo de contracorriente entre la vena uterina y la arteria ovárica, causando pérdida de función y apoptosis de las células luteales. La luteólisis permite la continuidad de la ciclicidad ovárica del animal, ya que, sin la presencia de P₄ se retira el bloqueo a nivel hipotalámico y el pico preovulatorio de LH puede darse de nuevo.

La producción de PGF_{2 α} en forma pulsátil comienza a ser de importancia desde el día 12 pos-estro (Figura 2-B, PGF_{2 α}) cuando existen receptores membranales en las células luteales que permitan realizar su función [3].

FECUNDACIÓN Y DESARROLLO EMBRIONARIO

El oocito liberado en la ovulación es captado por el infundíbulo del oviducto, desciende hasta la unión istmo-ampular en donde aproximadamente 250.000 espermatozoides capacitados, rodean la zona pelúcida y uno de ellos fecunda [13] (Figura 1-D); posterior a la formación de los pronúcleos femenino y masculino ocurre la

singamia dando origen al comienzo del clivaje. El oocito, y posteriormente el embrión, tienen contacto con dos tipos de células en el oviducto: *células ciliadas* las cuales se encargarán del transporte hacia el útero y *células secretoras* dotadas de gránulos productores de sustancias que ayudan a la maduración de los gametos, capacitación de los espermatozoides y al desarrollo embrionario temprano [10]. Existe un tercer tipo de células, las basales que sirven de sostén tanto a ciliadas como secretoras [10].

Luego de la fecundación, comienza el desarrollo embrionario con el clivaje o serie de divisiones mitóticas; el día 2 postestro el embrión es de 2 células, al día 3 se encuentra en estadio de 4 células y el día 4 en estadio de 8-16 células, durante este estadio se da la activación del genoma embrionario [6] y el comienzo de la diferenciación celular (Figura 1-D) en dos poblaciones, el embrioblasto (células que darán origen al embrión) y el trofoectodermo, (células encargadas del reconocimiento materno y de la placentación). En esta etapa, se da la mayor pérdida embrionaria [5], ya que, una falla en la expresión del genoma podría afectar la diferenciación y eventos subsiguientes como: reconocimiento, implantación, placentación y desarrollo fetal [16]. El embrión permanece en el oviducto hasta el día 4 postestro, día en el que pasa al útero para continuar su desarrollo (Figura 1-C, oviducto).

Después de superar el estadio de 8-16 células el embrión se instala en la parte apical del cuerno ipsilateral al cuerpo lúteo, y continúa con su desarrollo a mórula temprana (MT) en el día 5, mórula compacta (MC) en el día 6 y el día 7, con la formación del blastocele se le denomina blastocito temprano (BT) (Figura 1-D), el día 8 postestro continúa su desarrollo a blastocito expandido (BEx) (Figura 2-D).

ETAPAS PREIMPLANTATORIAS Y RECONOCIMIENTO DE LA PREÑEZ

En el día 9 postestro el embrión abandona la zona pelúcida, evento conocido como *eclosión* o "*hatching*", (Figura 2-D, eclosión). Comienza entonces la etapa de *elongación*, en donde se alarga y aumenta de tamaño durante los días 10 a 13 postestro. En este periodo se da la secreción de interferón *tau* (IFN-*t*) [8] (Figura 2-D, elongación).

El IFN-*t* es una proteína perteneciente a la familia de los interferones tipo 1 [13], producida en embriones rumiantes por las células mononucleares del trofoectodermo, se ha determinado su secreción hacia el lumen uterino entre los días 10 y 21 del ciclo (Figura 2-B, IFN-*t*) con una producción máxima entre los días 14 y 16 postestro [21]. En los días de mayor producción de IFN-*t* el embrión se encuentra en la fase de *precontacto*, caracterizada por la diferenciación

de las células del trofoectodermo en columnares y sincitiales [22], en esta etapa no hay contacto entre el embrión y la madre en espera que el IFN-*t* realice su función antiluteolítica.

MECANISMO DE SEÑALIZACIÓN POR INTERFERÓN-TAU EN LA CÉLULA ENDOMETRIAL.

¿Como actúa el IFN-*t* como factor antiluteolítico? Inicialmente se creía que el efecto del IFN-*t* se daba sobre la expresión de la COX-2, enzima importante en la vía de producción de la PGF_{2α}, sin embargo estudios posteriores han demostrado que la inhibición se da en otra parte de la vía propiamente en la síntesis de receptores para oxitocina (OTR).

Las células endometriales poseen un receptor membranal para los interferones tipo 1 llamado IFNAR; el IFN-*t* se acopla a este receptor para inducir una señal intracelular que genera la producción de proteínas tales como como el IRF-1 (Factor Regulador de Interferón 1), el IRF-2 (Factor Regulador de Interferón 2), proteína Mx, β2 microglobulina entre otras [13]. El IRF-2 actúa como un inhibidor del receptor de estrógenos (RE_{2α}) en la célula endometrial, evitando la unión hormona-receptor necesaria para la síntesis de OTR, así no habrá receptor que reciba el estímulo para la producción de PGF_{2α} [4], (Figura 3-C).

Mediante este mecanismo de señalización por IFN-*t* se mantiene la producción de P₄ por el cuerpo lúteo, mientras el embrión continúa con la fase de *aposisión* en los días 18 a 19 postestro, donde existe contacto célula a célula. El embrión se inmoviliza en el útero por medio de la interdigitación de las células diferenciadas del trofoectodermo embrionario con las microvellosidades del epitelio endometrial [22] (Figura 2-D, precontacto y aposición). Finalmente se da la fase de *adhesión* caracterizada por la fusión de membranas trofoblásticas con membranas de las células endometriales. La adhesión se da gracias a un número de moléculas de adhesión expresadas tanto por las células del trofoectodermo como por las células endometriales, que permite la unión célula a célula [1].

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión presentes en membrana celular permiten la unión entre células y median procesos como la embriogénesis, la remodelación de tejidos, la cicatrización y la migración de células. Estas moléculas se clasifican dependiendo del tipo de unión si es célula a célula como las caderinas e inmunoglobulinas o célula a matriz extracelular como integrinas [1].

La producción de moléculas de adhesión en la implantación de embriones bovinos se da tanto en las células del trofoectodermo como en las cé-

lulas endometriales, (Figura 3-C). Las integrinas α y β y L-selectina, son algunas de las moléculas implicadas en el proceso de implantación, se unen a componentes de matriz extracelular como el GlyCAM-1 (Molécula de adhesión celular glicosilada 1), galactin-15 y osteopontina que son secretadas por las células del endometrio [22]. Las moléculas de adhesión se activan dependiendo de diferentes factores como la P_4 y el IFN- t , también pueden ser activadas por otras moléculas como la unión de L-selectinas a GlyCAM-1 que activan las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ [22].

El entendimiento de los mecanismos involucrados en el reconocimiento materno embrionario en los bovinos, permite comprender desde la fisiología, fenómenos que comprometen la eficiencia reproductiva del ganado, como las reabsorciones embrionarias tempranas. El estudio de este tema debe hacerse desde la comprensión de un todo ya que en el proceso se da la interacción entre hormonas, el aparato reproductivo materno y el embrión que se regulan y modulan entre sí. También se hace necesario el estudio desde la biología molecular que permite identificar grandes funciones realizadas por moléculas pequeñas como el IFN- τ y que son de vital importancia para dar continuidad a un proceso de gestación. De la misma manera, a partir de este conocimiento se pueden plantear estrategias de manejo hormonal, control del ciclo estral, o la motivación a nuevas investigaciones desde la biología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod* 1997; 2: p. 84-93.
2. Clarke IJ and Pompolo S. Synthesis and secretion of GnRH. *Anim Reprod Sci* 2005; 88: p. 29-55.
3. Davis JS, May JV, and Keel BA. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996; 45: p. 1351-1380.
4. Demmers KJ, Derecka K, and Flint A. Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* 2001; 121: p. 41-9.
5. Fabian D, Koppel J, and Maddox-Hyttel P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 2005; 64: p. 221-31.
6. Gjørret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larson LI, and Maddox-Hyttel P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 2003; 69: p. 1193-200.
7. Grajales L H OHM, *Aspectos relacionados con la problemática "hembra repetidora de celo"*. Congreso internacional de Reproducción Bovina INTERVET. 2005, Bogotá. 64-66.
8. Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, and Spencer TE. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. *Reproduction* 2002; 124: p. 289-300.
9. Inskeep EK. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 2004; 82 E-Suppl: p. E24-39.
10. Joshi MS. Isolation, cell culture, and characterization of oviduct epithelial cells of the cow. *Microsc Res Tech* 1995; 31: p. 507-18.
11. Mann GE and Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 2001; 121: p. 175-80.
12. Meseguer M, Pellicer A, and Simon C. MUC1 and endometrial receptivity. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: p. 1089-98.
13. Olivera Martha, Ruiz Tatiana, Tarazona Ariel, Giraldo Carlos. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec Vol.* 19:4, 2006
14. Ott TL, *Interferones*. Encyclopedia of Reproduction. Vol. Volumen 2. 1998. Pawson AJ and McNeilly AS. The pituitary effects of GnRH. *Anim Reprod Sci* 2005; 88: p. 75-94.
15. Peters AR. Veterinary clinical application of GnRH-questions of efficacy. *Anim Reprod Sci* 2005; 88: p. 155-67.
16. Roberts RM, Cross JC, and Leaman DW. Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr Rev* 1992; 13: p. 432-52.
17. Russe I, *Weiblicher Sexualzyklus*. Lehrbuch der Embryologie der Haustiere, ed. I.R.F. Sinowatz. 93-96.
18. Serrano Cesar OAM. Caracterización de la función luteal durante el primer ciclo posparto inducido por medio de un progestágeno en vacas cebú brahman en amamantamiento. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 1997; v.10, n.1.; p. p.29 - 37.
19. Sherwood DO FP, *Corpus Luteum Peptides*. Encyclopedia of Reproduction. Vol. Volumen 2. 1998.
20. Spencer TE, *Pregnancy, Maternal Recognition of*. Encyclopedia of Reproduction, ed. K. Ernst. Vol. Volumen 3. 1998. 1006-1015.
21. Spencer TE and Bazer FW. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: p. 49.
22. Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, and Burghardt RC. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 2004; 128: p. 657-68.
23. Telgmann R, Bathgate RA, Jaeger S, Tillmann G, and Ivell R. Transcriptional regulation of the bovine oxytocin receptor gene. *Biol Reprod* 2003; 68: p. 1015-1026.

CYANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS: ROL DE LAS MICROCISTINAS EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL Y SU DETECCIÓN EN MUESTRAS DE AGUA

DS PÉREZ¹, AL SORACI², MO TAPIA²

¹Becaria Comisión Investigaciones Científicas, ²Laboratorio de Toxicología
Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

RESUMEN: Las cianobacterias o algas azul verdosas poseen características tanto de algas como de bacterias. Ante condiciones favorables, tales como, aguas con altos contenidos de nutrientes o residuos químicos, entre otros, ocurre un fenómeno denominado "floreamiento o bloom algal", durante el cual se advierte la formación de espuma y se alcanza una densidad celular sumamente elevada. Las cianobacterias producen una gran cantidad de efectos adversos sobre el recurso hídrico y los ecosistemas acuáticos, aunque lo más interesante, y a lo que se referirá fundamentalmente está revisión bibliográfica, es su capacidad de generar toxinas que se liberan durante la finalización del bloom y la muerte celular. Las cianotoxinas son consideradas las toxinas más importantes de los cuerpos de agua, y la microcistina LR, una hepatotoxina de toxicidad muy elevada, es la más frecuentemente hallada. La hepatotoxicosis aguda y muerte inducida por microcistinas sobre un gran número de especies han generado estudios sobre su toxicidad. Los métodos de detección con los que contamos actualmente para estudiar la presencia de las toxinas en agua son numerosos, siendo la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) la metodología más comúnmente utilizada con este propósito. Se han establecido límites provisionales de consumo para dicha hepatotoxina, aunque la mayoría de los países carece de una legislación firme al respecto.

PALABRAS CLAVES: cianobacterias, florecimiento algal, toxicidad, hepatotoxinas, métodos de detección.

CYANOBACTERIA AND CYANOTOXINS: ROLE OF MICROCISTYNS ON HUMAN AND ANIMAL HEALTH AND THEIR DETECTION IN WATER SAMPLES

ABSTRACT: Cyanobacteria or blue-green algae have characteristics both of bacteria and algae. In the presence of favorable conditions and, generally, in waters with high contents of nutrients or chemical residues, a phenomenon called "harmful algal bloom" occurs. During this phenomenon, the formation of foam and an extremely high cellular density are observed. Cyanobacteria produce a great quantity of adverse effects on hydrologic resource and aquatic ecosystems, although more interestingly yet, and as we will mainly refer in this review, is their capacity for generating toxins that will be released when blooms ends and cells die. Cyanotoxins are considered the most important toxins in water bodies. Among them, microcystin LR, a highly toxic hepatotoxin, is the most common. The acute hepatotoxicosis and death induced by microcystins on a high number of species have generated several studies on their toxicity. The methods of detection available to study the presence of toxins in water are numerous; being the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) the most widely used methodology. Provisional limits of consume for the mentioned hepatotoxin are established. However, there is still a worldwide lack of firm legislations on the subject.

KEYWORDS: cyanobacteria, harmful algal bloom, toxicity, hepatotoxins, detection methods.

Fecha de recepción: 07/11/07

Fecha de aprobación: 17/03/08

Dirección para correspondencia: Denisa S. Pérez, Becaria Comisión de Investigaciones Científicas, Laboratorio de Toxicología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Campus Universitario, Tandil (7000), Buenos Aires, Argentina. Tel/Fax: +54-2293-439850.

E mail: denisa@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Características generales de las cianobacterias: Son los organismos del fitoplancton más comúnmente identificados y se encuentran, principalmente, en cuerpos de agua con altos niveles tróficos (25). Se consideran una unión entre procariotas y eucariotas fotosintéticos con capacidad de sintetizar clorofila (19). Presentan características tanto de bacterias (pared celular de tipo procariota, ausencia de membrana nuclear y de orgánulos subcelulares) (23, 24, 25) como de algas (tamaño, maquinaria fotosintética) (19). Se las denomina cianobacterias, algas verde azuladas, cianofíceas (19, 23, 25) o cianoprocaríotas (24). Algunas son unicelulares, otras multicelulares y la mayoría filamentosas (23), haciéndose visibles al formar colonias (19). Son excelentes fuentes de vitaminas y proteínas (9), bio-fertilizantes (9, 23), fuentes de combustibles renovables, agentes de control de contaminación y agentes de biorremediación (9). Presentan particularidades que las hacen únicas entre las bacterias y entre las algas: antigüedad evolutiva, (25), metabolismo aeróbico y carácter fotoautótrofo (4, 14), diversidad morfológica (25) y celular (24, 25), regulación de su posición en la columna de agua (4, 24) y facilidad de crecimiento (4, 25, 26). La producción de toxinas (19) y fundamentalmente, la hepatotoxicidad causada por un tipo de cianotoxinas (microcistinas), es el motivo de esta revisión bibliográfica.

“Floraciones de agua” o “blooms algales”: Los agrupamientos masivos de cianobacterias se denominan “*floraciones de agua*” o “*blooms algales*” (26) y se describen como un aumento significativamente mayor que el promedio en la biomasa del fitoplancton (25). Ocurren generalmente a fines de verano (4), en períodos de horas a días (7). Pueden diferenciarse en espumas flotantes en la superficie y brotes masivos generales en toda el agua (4). Debido a la presencia del pigmento azul que les da nombre, frecuentemente se observan discoloraciones azules, las cuales son evidentes cuando las células comienzan a deteriorarse. Las floraciones pueden ser desarrolladas por diatomeas, algas verdes, dinoflagelados y cianobacterias (7). Generalmente, están relacionados con una o dos especies y se identifican por el tipo de fitoplancton dominante (25). Existen numerosas especies de cianobacterias que desarrollan floraciones en ambientes de agua dulce, salobre o marina (7), aunque las principales son *Anabaena circinalis* y *Microcystis aeruginosa*, ambas potencialmente tóxicas (11, 15). Su registro histórico es reciente y adquieren importancia por el impacto económico que representan (25). La presencia de cianobacterias tóxicas ha sido reportada al menos en 44 países (11). Desde hace mucho tiempo se tiene conoci-

miento sobre su presencia, aunque solo se las asociaba con la muerte de animales domésticos (25). Recientemente, en Brasil, la muerte de 88 personas y el daño renal en 50 pacientes que requirieron hemodiálisis, se correlacionó con la presencia de cianotoxinas en el agua de consumo (11, 14, 23, 25, 27). Si bien en la República Argentina se han registrado varios accidentes tóxicos ocasionados por la presencia de cianobacterias, el primer registro fue en 1954, en la laguna de San Miguel del Monte con la muerte masiva de peces en concordancia con un florecimiento algal (10). En nuestro país han sido enumerados los ambientes de aguas continentales con riesgo de intoxicación por cianobacterias, aunque la ocurrencia de especies cianotóxicas en agua de red no ha sido ampliamente estudiada (11). En la Fig.1 se encuentran resumidos los factores involucrados en la producción de toxinas y las causas y consecuencias de las floraciones.

Cianotoxinas y otros compuestos cianobacterianos: Las cianotoxinas son consideradas los compuestos más tóxicos y preocupantes en las masas de agua, tanto por su elevada distribución como por su alta toxicidad. Son metabolitos secundarios (24) que se generan y acumulan durante la producción de fotopigmentos. Ante condiciones ambientales desfavorables las cianobacterias mueren y liberan sus contenidos al medio (26). La naturaleza química de las toxinas puede ser muy diversa: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos, aunque normalmente se clasifican por los efectos que producen: Toxinas Irritantes (19), Citotoxinas (Cilindrospermopsina) (19, 24), Dermatotoxinas (Aplisiatoxina y Lyngbyatoxina) (26), Neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a (s) y saxitoxina) (19) y Hepatotoxinas (microcistinas y nodularinas) (16, 22, 26). Las cianobacterias son capaces de generar dos compuestos volátiles, la *geosmina* y el *metilisorboreol*, los cuales suelen contribuir a importantes cambios en las características organolépticas del agua e incluso de los organismos acuáticos. Asimismo, una serie de sustancias suelen acompañar la descomposición de las cianobacterias. Pueden ser metabolitos producidos por ellas o productos de su degradación. Entre éstos se encuentran: *trihalometanos*, *benceno*, *tolueno*, *etilbenceno* y *xilenos* (11).

Vías de exposición: Los peligros para la salud surgen principalmente de dos vías de exposición: **a) Contacto directo** con partes expuestas del cuerpo (oídos, ojos, boca, garganta) o áreas cubiertas por el traje de baño (acumulan algas y fomentan rompimiento celular y liberación de contenidos). **b) Ingestión accidental** al tragar o inhalar agua (riesgo de intoxicación) (19). El consumo de suplementos dietarios algales contaminados con toxinas también es un riesgo (14).

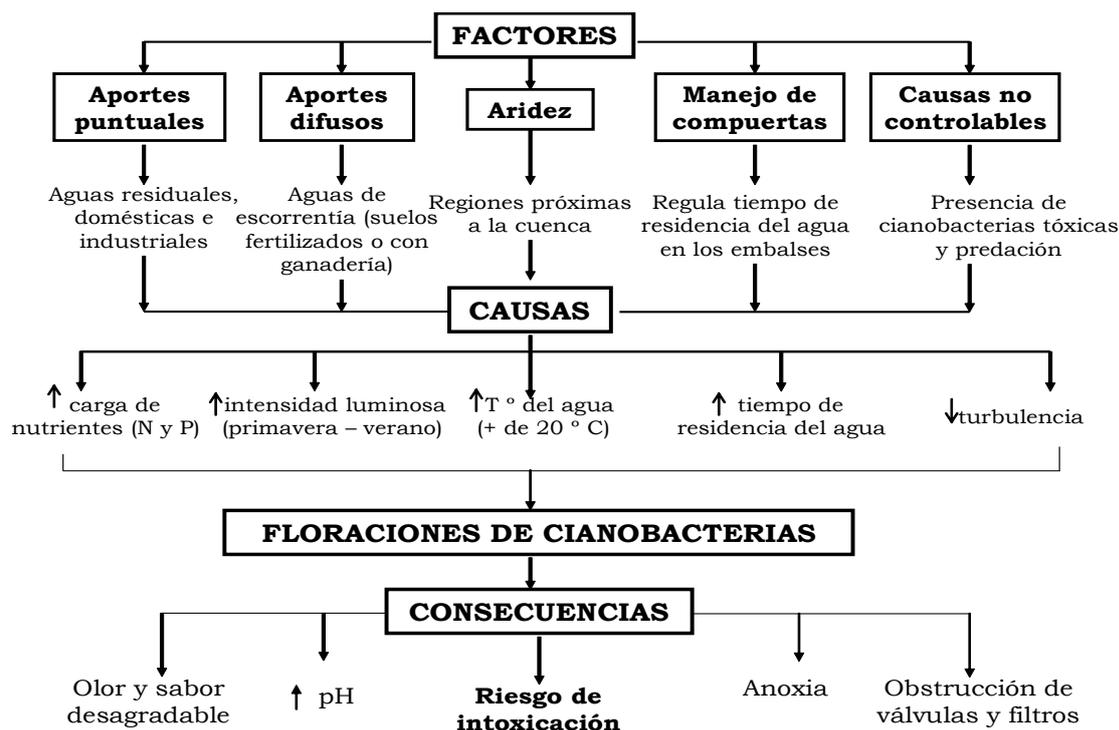


Figura 1: Diagrama simplificado de los factores que determinan las causas de las floraciones de cianobacterias y los efectos de éstas sobre los sistemas acuáticos y su biota.

Figure 1: Simplified diagram of the factors that determine the causes of the harmful algal blooms and their effects on the aquatic systems and their biota.

Vigilancia y medidas de control:

Medidas a corto plazo: Informar sobre el riesgo producido por cianobacterias y brindar información adicional sobre otros parámetros de calidad del agua. Incluir información sobre el grado de contacto con el agua en deportes acuáticos. Advertir que las actividades recreativas estarán restringidas solo temporal y localmente, y que el agua puede tener una calidad aceptable en un lugar cercano como por ejemplo, el mismo lago.

Medidas a largo plazo: Restaurar la calidad del agua a niveles ideales de transparencia mayores a 2 m (lectura del disco de Secchi) y eliminar los florecimientos de cianobacterias. Esto se logra al mantener las concentraciones de fósforo por debajo de 0,01 µg/l ya que a estas concentraciones, es poco probable que ocurran densidades cianobacterianas que presenten un riesgo moderado a alto para la salud (19).

MICROCISTINAS (MC)

Estructura química: Son heptapéptidos cíclicos no ribosomales (16) con particularidades solo halladas en las hepatotoxinas cianobacterianas (20). Su estructura general es la de un ciclo compuesto: (1) D-alanina, (2) aminoácido variable, (3) ácido metilaspártico (-Me-Asp), (4) aminoácido variable, (5) cadena lateral de ami-

noácidos específica (Adda), (6) Ácido D-glutámico y (7) N-metildehidroalanina (Mdha) (4, 22). La Fig. 2 muestra la estructura química de las MC. Actualmente hay identificadas más de 80 MC (16). Las variaciones más frecuentes son las que se producen por sustituciones de L-aminoácidos en las posiciones 2 (X) y 4 (Y) (14, 18, 27) y por desmetilaciones de los aminoácidos en posición 3 y/o 7, aunque se han observado variaciones en cada aminoácido. Los L aminoácidos, Adda y el D-glu libre, juegan un papel muy importante en la hepatotoxicidad. Los aminoácidos en las posiciones X e Y, se indican con un sufijo de dos letras, por ejemplo MC-LR contiene leucina (L) en posición 2 y arginina (R) en posición 4. En la posición X los L-aminoácidos más comunes son leucina (L), arginina (R) y tirosina (Y). En la posición Y, el aminoácido más común es la arginina (18). Las más habituales son la MC-LR, MC-RR y MC-YR (26). En aguas medioambientales las MC son neutras o aniónicas y relativamente polares, aunque contienen algunas partes más hidrofóbicas (18, 20). Según los aminoácidos existentes en las posiciones X e Y se pueden clasificar en 3 grupos de toxicidad: Toxicidad Elevada (MC-LR > MC-LA > MC-YR), Toxicidad Moderada (MC-WR, MC desmetiladas en Mdha y (-Me-Asp)) y Toxicidad Baja (MC-LY < MC-RR < MC-M (O) R) (18).

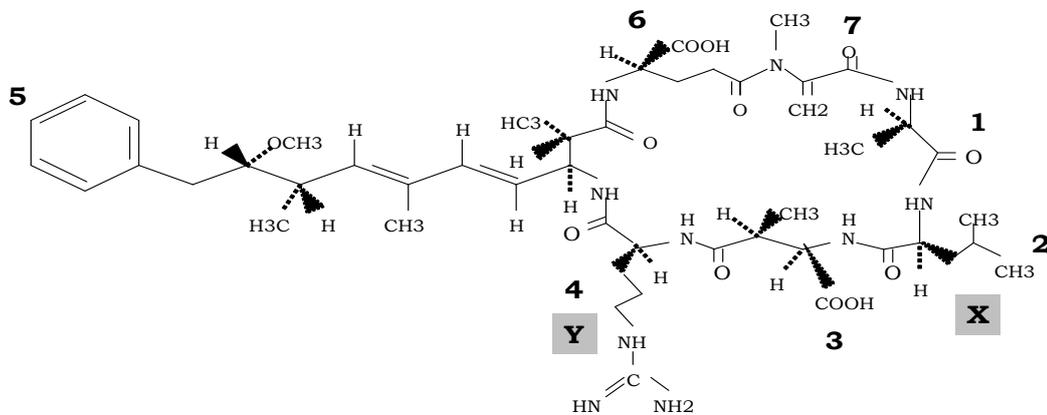


Figura 2. Estructura química de las MC.
Figure 2. Chemical structure of MC.

Estabilidad, degradación y remoción:

Son extremadamente estables (hidrólisis enzimática, pH extremos, 300° C) (4, 14) y no son destruidas por los oxidantes comunes (26). Para evaluar la pérdida de toxicidad en la naturaleza deben tenerse en cuenta los siguientes factores: *dilución* (resultados contradictorios), *absorción* (baja, aumenta a pH bajo), *descomposición térmica con ayuda del pH* (resisten 10 semanas a 40 °C y pH 10) (22), *fotólisis* (genera productos no tóxicos) (4, 22) y *degradación biológica* (4, 22, 25). Para su remoción en el tratamiento de aguas, se debe eliminar la estratificación, minimizar la incorporación de nutrientes (4, 21), reducir los tiempos de residencia (21), optar por aguas profundas (menor probabilidad de encontrar cianobacterias) y no utilizar alguicidas (sulfato de cobre) ya que provocan muerte celular y liberación de toxinas (4) (aunque algunos autores recomiendan aplicarlos y restringir el uso del agua (3, 21) por aproximadamente 5 días) (3). Para degradar completamente las microcistinas se requiere un tratamiento a reflujo con ácido 6 N hidroxilórico y Ácido Trifluoroacético (11). Los sistemas de potabilización del agua que funcionan en las plantas potabilizadoras no son los adecuados para retener cianotoxinas (13). Los procesos que más comúnmente se combinan para eliminarlas son: *Coagulación-filtración*, *oxidación con cloro*, *ozonización*, *adsorción con carbón activado* (25) y *ósmosis inversa*. El tratamiento con ozono aplicado simultáneamente con la luz ultravioleta (UV) implica un proceso de oxidación cuya efectividad en el tratamiento de aguas resulta interesante (13).

Mecanismo de hepatotoxicidad:

Las principales células “blanco” de las MC son *hepatocitos* y *macrófagos* (3, 18, 19), aunque también se han observado efectos adversos en intestino (12). La vía principal de acceso a las células es el conducto de ácido biliar, que se encuentra en células hepáticas y epitelio intestinal, (3, 18, 19), lo cual explicaría la especificidad hepática (18). La permeabilidad de otras membranas celulares a las MC es aún controversial (19). Aparentemente ingresarían, preferentemente desde el íleon, reflejando la actividad de los abundantes transportadores de bilis en esta localización (3, 18). Algunos inhibidores de los transportadores pueden antagonizar los efectos tóxicos de las MC, siendo la rifampina el más efectivo (14). Son primariamente hepatotóxicas en mamíferos y peces (18) e inducen alteraciones de los microfilamentos de actina, primero en la periferia y luego cerca del centro de la célula. Como resultado de la pérdida de soporte celular, los hepatocitos se redondean (3, 12) causando destrucción de los sinusoides hepáticos con la consecuente hemorragia intrahepática letal en horas y/o insuficiencia hepática (en horas o días) (3). Su mecanismo de toxicidad puede describirse en dos niveles:

A) Inhibición de fosfatasa de proteínas:

A nivel subcelular son inhibidores específicos de las fosfatasa tipo 1 (PP1) y tipo 2 (PP2A) (8, 18), las cuales regulan multitud de procesos biológicos. Esta inhibición altera el equilibrio enzimático, observándose un aumento de fosfoproteínas que activa la cascada de las caspasas y desencadena el proceso de apoptosis (con cambios morfológicos asociados en el hepatocito y consecuente muerte celular). También ocurre una reorganización del

citoesqueleto, debido a que afecta la organización de los microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos (18).

B) Estimulación del metabolismo del Ácido Araquidónico: El mecanismo de liberación de metabolitos del ácido araquidónico por las MC aún no se conoce totalmente, aunque se sabe que lo estimulan por la vía de la ciclooxigenasa. Ocurre síntesis y liberación de prostaciclina (6-ceto F1 α) y tromboxano B2 (TXB2), aunque no se produce liberación de prostaglandina F2 α o E2. El TXB2 deriva del TXA2, el cual es inestable y uno de los más fuertes mediadores de la agregación plaquetaria. La 6-ceto F1 α deriva de la prostaglandina I2 y actúa como inhibidora de dicha agregación. En macrófagos alveolares inducen la liberación de prostaglandina F2 α , PGE2, y TXB2, sugiriéndose que estos macrófagos sintetizan y liberan mediadores químicos en respuesta a la exposición a las MC (18).

Especies susceptibles: Humanos, bovinos, ovinos, cerdos, perros, peces, anfibios, aves acuáticas, murciélagos, cebras, rinocerontes y aparentemente los equinos son susceptibles a la ingestión oral de MC (3). Los monogástricos son menos sensibles que los rumiantes (29). Los roedores de laboratorio son más resistentes a dosis orales, sin embargo, luego de administraciones parenterales (IP) son altamente susceptibles por lo que se los ha utilizado en bioensayos (3).

Toxicidad: Son en general extremadamente tóxicas por exposición aguda. La DL50 por vía

IP de MC LR oscila entre 25 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ratones). El promedio es de 50 a 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La DL50 por vía oral es mucho mayor (5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (18). Tras la ingestión de MC pueden presentarse tres tipos de toxicidad:

a) Toxicidad Aguda: Causan hepatotoxicosis aguda (3). En la Fig.3 se describen los signos clínicos, los datos obtenidos en la patología clínica y la terapia a emplear. La intoxicación subaguda, con concomitantes cambios reparativos y degenerativos en el hígado, puede ser más difícil de determinar (29).

b) Toxicidad Crónica: Por la poca disponibilidad y el alto costo de las toxinas los estudios de toxicidad subcrónicos y crónicos en mamíferos son muy escasos (18). Se ha observado que la toxicidad de las MC es acumulativa (19). En animales de experimentación ocurre daño hepático crónico tras una administración oral continuada (18). En ratones expuestos a dosis subletales y subcrónicas se observa alteración del tejido hepático, alteraciones en el metabolismo lipídico (1, 27) y liberación de radicales libres (1). Luego de finalizada la exposición, se observa recuperación del daño celular y tisular (1, 27). Recientemente, algunos estudios han indicado que las MC también se acumulan en las gónadas y se han observado una variedad de efectos tóxicos sobre el tracto reproductivo de ratones (8). En peces, la exposición crónica condujo a alteraciones iónicas y a una disminución del crecimiento (18). Los bo-

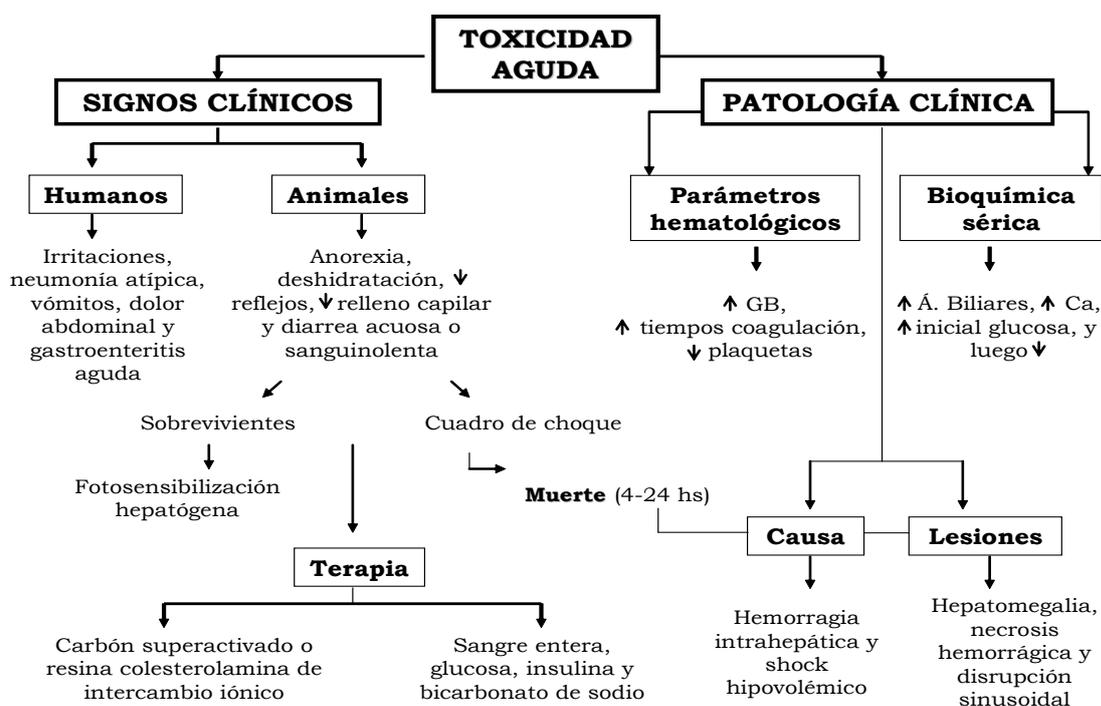


Figura 3. Signos, patología y terapia de la toxicidad aguda.
Figure 3. Signs, pathology and therapy of the acute toxicity.

vinos no expuestos letalmente pueden tener una rápida recuperación. También se ha descrito una disminución de la lactación (3). En humanos, debido a la falta de síntomas aparentes durante la exposición moderada a aguas recreativas, las personas no son conscientes del riesgo y pueden continuar la exposición e incrementar así el riesgo de daño hepático crónico (19).

c) Mutagenesis, carcinogenesis y teratogenesis: La interferencia de las MC en la estructura y mitosis celular permite explicar la actividad generadora de tumores (19). Se ha confirmado su rol como promotoras de cáncer primario de hígado (PLC) (1, 18). Extractos de MC LR muestran una fuerte mutagenicidad en el Ensayo de Ames. En cultivo primario de hepatocitos de rata inducen daños en el ADN. En médula ósea de ratón se evidencia aumento de los eritrocitos policromáticos micronucleados (18). Son muy escasos los estudios sobre los posibles efectos genotóxicos. Debido a que las MC atraviesan la barrera placentaria se ha observado en ratones y animales acuáticos toxicidad tanto materna (disminución de peso corporal y daño hepático) como embrionaria y fetal (muerte embrionaria, malformaciones y retardo en el crecimiento) (5). En humanos se ha encontrado relación entre la exposición crónica por consumo de agua con MC en el primer trimestre de embarazo y un aumento de defectos congénitos (18).

Detección de microcistinas en agua:

Toma de muestra: Se realiza generalmente luego del bloom algal, durante el verano tardío y el otoño temprano. Los puntos de muestreo deben ser representativos de todo el cuerpo de agua, muestreando áreas en que puedan afectar a hombres y/o ganado. Para analizar MC libres en agua la recolección debe realizarse con una botella de vidrio color caramelo (con luz UV se isomerizan) y para analizar el contenido de MC en las algas debe utilizarse una malla de plancton. **Extracción y purificación:** Generalmente se realiza un paso de filtración. Para determinar la concentración total de MC, la muestra se somete a ultrasonido, liofilización o congelación-descongelación para romper el alga y obtener las toxinas libres. Se ha reportado que la mezcla de metanol-agua 50:50 (v/v) es efectiva para extraer MC desde células algales obteniendo más de un 90 % de recuperación (22). También puede utilizarse metanol acuoso acidificado (17), metanol o agua puros y ácido acético diluido. El pH es también un factor importante. La mayor recuperación de MC RR se encontró a pH 10. Para extraer las MC disueltas en el agua el método más comúnmente usado es la extracción de fase sólida (SPE) ya que permite realizar simultáneamente extracción y clean-up. Varios materiales y solventes han sido testeados

para este propósito, siendo el octadecyl silica (C18) y metanol (o mezclas acuosas con metanol) la combinación más usada (22). Además de los cartuchos SPE, los inmunoabsorbentes y polímeros impresos molecularmente (HIP's) han sido recientemente desarrollados para aumentar la selectividad de la extracción y clean-up de aguas conteniendo MC (22, 17).

Métodos de detección: Se cuenta con Métodos biológicos y Análisis Físico-Químicos:

Métodos Biológicos (Bioensayos): **a)** Ensayo en ratones: Debido a su elevado costo, a su sensibilidad y reproducibilidad limitadas (22), a los pocos laboratorios aprobados y a limitaciones éticas para su aplicación, este método no es adecuado para grandes programas de selección o monitoreo (19, 24). **b)** Bioensayos en organismos acuáticos: Se utilizan los géneros *Daphnia* o *Artemia*, dependiendo del medio de origen de la muestra. También se han desarrollado ensayos en peces y ranas (26). **c)** Ensayos alternativos: Los cultivos de hepatocitos de rata presentan una buena correlación con el ensayo de ratón. Los tests con fibroblastos (V79 de hamster) para MC generan falsos positivos y falsos negativos que enmascaran los resultados (26). **d)** Ensayos enzimáticos: Inhibición de la fosfatasa. Utiliza los procesos biológicos afectados por las toxinas para desarrollar ensayos in vitro de gran sensibilidad. Existe una buena correlación lineal entre los resultados obtenidos por HPLC y los obtenidos por el método de PP2A (26). **e)** Técnicas inmunológicas: Se han desarrollado anticuerpos monoclonales y kits de ELISA para MC las cuales visualizan los efectos mediante una reacción de peroxidasa. Son rápidos, sensibles, específicos y de procedimiento sencillo, con un nivel de detección de microgramos (4). El ELISA puede ser usado como un ensayo de screening (22). Mediante esta metodología se han detectado falsos positivos para MC LR (26). **f)** Técnicas genéticas: Determinadas secuencias de material genético (rRNA y DNA) permiten diferenciar géneros e incluso cepas tóxicas dentro de una misma especie. Pueden identificarse mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Rif-Lip), y sintetizarse en grandes concentraciones usando técnicas de PCR. Permiten desarrollar sistemas de monitoreo y detección a largo plazo y por lo tanto alertar de una futura proliferación cianobacteriana (26). **g)** Ensayos con bacterias luminiscentes: (Microtox). Inicialmente promisorios debido a su respuesta a extractos de cianobacterias, sin embargo se ha demostrado que las respuestas no se deben a las hepatotoxinas presentes (4). **Análisis Físico-Químicos:** **a)** Cuantificación de la biomasa: Se utilizan técnicas convencionales como clorofila "a", recuento microscópico, peso seco, carbono orgánico particulado, o ATP/carbono orgánico. También es posible estimar las

concentraciones de otros pigmentos fotosintéticos que, al encontrarse solo en cianobacterias, sirven como indicadores de su presencia en el medio (26). **b)** Electroforesis capilar: No es un método comúnmente usado para el análisis de MC ya que requiere pre-concentración de la muestra para lograr el límite de detección deseado (22). A diferencia del HPLC no tiene aún el alcance necesario para hacer monitoreos rutinarios de agua (4). Variantes de electroforesis capilar micelar son utilizadas también para detectar el ácido okadaico de cianobacterias (26). **c)** HPLC: Es el método más común para la determinación de MC. Generalmente se utiliza la separación líquida combinada con detector UV o espectrometría de masa (MS) (22). Al usar **HPLC UV** debe tenerse en cuenta que la mayoría de las MC absorben un máximo de 238 nm. Aquellas que poseen aminoácidos aromáticos, (MC LW) absorben una cantidad máxima de luz de 222 nm (4). El detector UV presenta desventajas sobre el MS, ya que no es suficientemente sensitivo y selectivo. Muchas interferencias neutrales se absorben a la misma región UV que las MC y muchas MC (aproximadamente 60) tienen un espectro UV muy similar (20). Puede utilizarse también un detector PDA (Photo-diode array) que no solo responde ante la absorción UV sino al espectro típico de las toxinas, permitiendo distinguir entre espectros UV relacionados cercanamente. Los límites de detección de este método son inferiores a 1 µg/l (4). No es una técnica específica por lo cual es necesario confirmar la presencia de MC mediante técnicas accesorias (26). **LC MS** se utiliza luego de la separación HPLC y provee una mejor solución al problema de identificación de los distintos tipos de MC ya que provee información estructural debido a que cada una produce iones característicos en su espectro de masa (2). Presenta un límite de detección de aproximadamente 0,02 µg/l de MC individuales (4). Su sensibilidad y selectividad pueden mejorarse usando *SIM* (*Selected Ion Monitoring*), *SRM* (*Selected Reaction Monitoring*). Algunos autores aumentan su selectividad usando *MS² + ESI* (*Electrospray Tandem Mass Spectrometry*), *LC-ion trap* y *IT-MS + ESI*. Usando triple cuadrupolos (*MS² + ESI*) se identificaron las variantes dimetiladas y didimetiladas. Con el uso de LC-MS (+ESI) el espectro de masa de los iones (M+H)⁺ revela dos tipos distintos de patrones de fragmentación, con diferencias entre los productos que contienen arginina (MC LR, RR e YR) y MC LA que no tiene residuo de arginina (22). En el análisis de MC en agua también puede aplicarse un **láser de matriz asistida (MALDI-TOF-MS: desorption/ionization, time of flight, mass spectrometry)** (2, 22). En los blooms de *Planktothrix*, las variantes dimetiladas de MC son dominantes y este puede ser un buen soporte al HPLC para la identificación (22). **d)** GC: (Gas

Chromatography). Es un método basado en la oxidación de MC produciendo ácido 3-metoxi-2 metil-fenilbutanoico (4, 14). Con ella es posible alcanzar un límite de detección de 0,43 ng, según la concentración del tóxico (4).

Legislación, niveles de riesgo y niveles de seguridad: En 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció el nivel máximo aceptable para el consumo diario de MC LR en 1 µg/l (6, 26) y este valor es también la concentración máxima aceptable para prevenir la inducción de tumores (25). Es un valor provisional de referencia (debido a la poca información disponible) (4, 6, 16), que comprende tanto las MC intra como extracelulares (4). Algunos autores proponen un valor de 0,01 µg/l en casos de exposición crónica, por la posible correlación entre cáncer primario de hígado y presencia de MC en agua (18). Otro estudio considera 0,5 µg/l para MC LR, o 1 µg/l del total de MC en agua potable (25). Tanto el Codex Alimentarius como el Código Alimentario Argentino, no hacen mención alguna sobre las MC y sus valores admisibles en agua potable (4). Uno de los pocos países que tiene legislación concreta respecto a las cianotoxinas en aguas de consumo es España, pero no recomienda ninguna metodología ni establece las variantes de MC a medir, lo que dificulta su cumplimiento. No existe legislación en cuanto a las aguas de recreo, sin embargo la OMS sugiere prohibir el acceso a la zona recreativa en presencia de más de 20000 células de cianobacterias potencialmente tóxicas por ml de agua (24). Los límites australianos, país que se dedica intensivamente al estudio de problemas con cianobacterias (4), y cuyas pérdidas económicas debidas a blooms algales se encuentran entre los 180 a 240 millones de dolares anuales (28), determinan un máximo admitido de 1,3 µg/l. Esta diferencia con el valor establecido por la OMS se debe a que el peso corporal estándar es de 60 kg para la OMS y de 70 kg para Australia (4). Un valor guía único no es apropiado. Deben definirse una serie de valores guía asociados con la severidad y probabilidad elevada de los efectos sobre la salud en tres niveles de riesgo [**probabilidad leve o baja:** 20000 células cianobacterianas/ml, 10 µg de clorofila "a" (19) o 4 µg/l de MC (19, 30), **moderada:** 100000 células cianobacterianas/ml, 50 µg/l de clorofila "a" (19) o 20 µg/l de MC (19, 30) y **elevada:** 1000000 células cianobacterianas/ml o 2 mg/l de MC (19)]. Debe tenerse en cuenta que *Planktothrix agardhii* alcanza densidades de 250 µg/l de clorofila "a", o incluso mayores, sin formación de espuma. Además debe considerarse que el riesgo para la salud aumenta cuando la persona expuesta es especialmente susceptible, por ejemplo, debido a una hepatitis B crónica (19), lesiones renales o alcoholismo (18). En

cuanto a los niveles de seguridad para MC LR, el NOAEL (Nivel sin efectos adversos observados) es de 40 µg/kg/día (12), el LOAEL (Nivel de efectos adversos bajo) se determinó en 0,067 µg/kg/día y la IDT (Ingesta diaria tolerable) es de 0,04 µg/kg/día tanto en agua (18) como en leche (20).

Conclusiones: La ocurrencia de florecimientos cianobacterianos es un serio problema medioambiental, no solo por los graves efectos que ocasionan sobre el recurso hídrico y el ecosistema, sino fundamentalmente, porque éstas producen de forma habitual toxinas que pueden tener efectos nocivos sobre la salud de personas y animales expuestos. Es sabido que el aumento de la eutrofización de los ambientes acuáticos eleva las chances de que ocurra un bloom, pero poco se conoce actualmente sobre las condiciones que promueven la producción de toxinas. De las cianotoxinas generadas en el metabolismo algal, las hepatotoxinas son las más abundantes y habituales, y las MC las más comunes de este grupo. Los métodos de detección para dichas toxinas varían desde el bioensayo, que solo permite advertir la presencia de la toxina, hasta los más sofisticados equipos de HPLC, con límites de detección inferiores a 0,02 µg/l y capaces de caracterizar las estructuras de los productos de degradación en muestras medioambientales. El valor de 1 µg/l de MC LR establecido por la OMS es un valor provisional de referencia, pero un valor guía único no es apropiado. Debido a que las cianotoxinas se consideran la fuente de riesgo más importante asociada al agua de consumo y recreacional, la solución del problema requiere acciones integradas en tres aspectos fundamentales: investigación, soluciones técnicas y gestión adecuada del recurso hídrico.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrinolo D. Primeras evidencias de recuperación de hígados afectados por hepatotoxinas producidas por cianobacterias presentes en el Río de la Plata. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 2006; Supl. 3, p. 149.
- Barco M, Rivera J, Caixach J. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2002; 959: 103-111.
- Beasley VR, Cook WO, Dahlem AM, Hooser SB, Randall AL, Valentine WM. Algae intoxication in livestock and waterfowl. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1989 5(2): 345-361.
- Braga NB. Tóxicos de origen cianobacteriano. Disponible en: <http://www.zoetnocampo.com/Documentos/ciano/cianobacterias.htm>
- Bu YZ, Li XY, Zhang BJ, Chung IK, Lee JA. Microcystins cause embryonic toxicity in mice. *Toxicon*, 2006; 48: 966-972.
- Burch MD. Chapter 36: Effective doses, guidelines & regulations. *Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine & Biology*, H. Kenneth Hudnell (ed.), 2007; p. 819-841.
- De León L. Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: Causas y Consecuencias. *Perfil Ambiental del Uruguay*, 2002; p. 28-37.
- Ding XSh, Li XY, Duan HY, Chung IK, Lee JA. Toxic effects of Microcystis cell extracts on the reproductive system of male mice. *Toxicon*, 2006; 48: 973-979.
- El-Bestawy EA, El-Salam AZA, Hansy AER. Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2007; 59: 180-192.
- Etchenique RO, Giannuzzi L, Ferrari LA, González DA. Estudio sobre la calidad de agua de red en Bahía Blanca, Argentina. *13º Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente*, 2003; p 1-18.
- Etchenique RO. Cianobacterias. Algas causantes de toxicidad. *Mesa Redonda-Agua. Congreso de Zoonosis*, La Plata, Argentina, 2006.
- Falconer IR. Chapter 27: Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. *Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine & Biology*, H. Kenneth Hudnell (ed.), 2007; p. 593-598.
- Giannuzzi L. Estrategias tecnológicas para la remoción de Cianobacterias y Cianotoxinas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 2006; Supl. 3, p. 151.
- Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing Potential Health Risks from Microcystin Toxins in Blue-Green Algae Dietary Supplements. *Environmental Health Perspectives*, 2000; Vol. 108, Nº5: 435-439.
- Guerrero JM. Monitoreo de Cianobacterias potencialmente toxigénicas en el embalse Paso de las Piedras y en la zona costera del Río de la Plata (Prov. De Buenos Aires). *Mesa Redonda-Agua. Congreso de Zoonosis*, La Plata, Argentina, 2006.
- Jungblut AD, Hoeger SJ, Mountfort D, Hitzfeld, BC, Dietrich DR, Neilan, BA. Characterization of microcystin production in an Antarctic cyanobacterial mat community. *Toxicon*, 2006; 47: 271-278.
- Meriluoto JAO, Spoof LEM. Chapter 21: Cyanotoxins: sampling, sample processing and toxin uptake. *Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine & Biology*, H. Kenneth Hudnell (ed.), 2007; p. 467-483.
- Moreno I, Repetto G, Cameán A: Interés toxicológico de las microcistinas, *Rev. Toxicol*, 2003; 20: 159-165.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), Capítulo 7: Algas y cianobacterias en aguas dulces. *Guías para ambientes seguros en aguas recreativas. Volumen 1: Aguas costeras y aguas dulces*, 1998; Ginebra, CH.
- Orr PT, Jones GJ, Hunter RA, Berger K, De Paoli DA,

D. Pérez y col.

Orr, ChLA. Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk, *Toxicon*, 2001; 39: 1847-1854.

21. Paerl HW. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. Manuscript prepared for the EPA ISOC CyanoHab meeting held in 2005; Raleigh, NC.

22. Pérez S, Aga DS. Recent advances in the sample preparation liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005; Vol. 24, No. 7: 658-670.

23. Prosperi CH. Cyanobacteria in human affairs. *Interciencia*, 2000; p. 303-306.

24. Quesada Corral A, Carrasco D, Cirés S. Cianobacterias en aguas de consumo y de recreo: Un problema de todos, *Ponencia en Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX)*, 2006.

25. Roset J, Aguayo S, Muñoz MJ: Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión, *Rev. Toxicol*, 2001; 18: 65-71.

26. Ramírez García P, Martínez Romero E, Martínez Salgado MD, Eslava Campos, CA. Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana, *Instituto Nacional de Ecología*, 2004; p. 1-18.

27. Sedan D, Telese L, Giannuzzi L, Andrinolo D, Aura C. Recuperación del daño hepático producido por intoxicaciones subcrónicas con la cianotoxina microcystina LR, un inhibidor de PP2A. Disponible en: www.cori.unicamp.br/jornadas/completos/UNLP/Sedan-Telese.pdf

28. Steffensen DA. Chapter 37: Economic cost of cyanobacterial blooms. *Proceedings of the Interagency, Internacional Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine & Biology*, H. Kenneth Hudnell (ed.), 2007; p. 843-853.

29. Stewart I, Seawright AA, Shaw GR. Chapter 28: Cyanobacterial poisoning in livestock, wild animals and birds - an overview. *Proceedings of the Interagency, Internacional Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine & Biology*, H. Kenneth Hudnell (ed.), 2007; p. 599-623.

30. Stone D. Cyanobacteria and their toxins. Disponible en: www.oregon.gov/DHS/ph/envtox/docs/algaetoxins.pdf